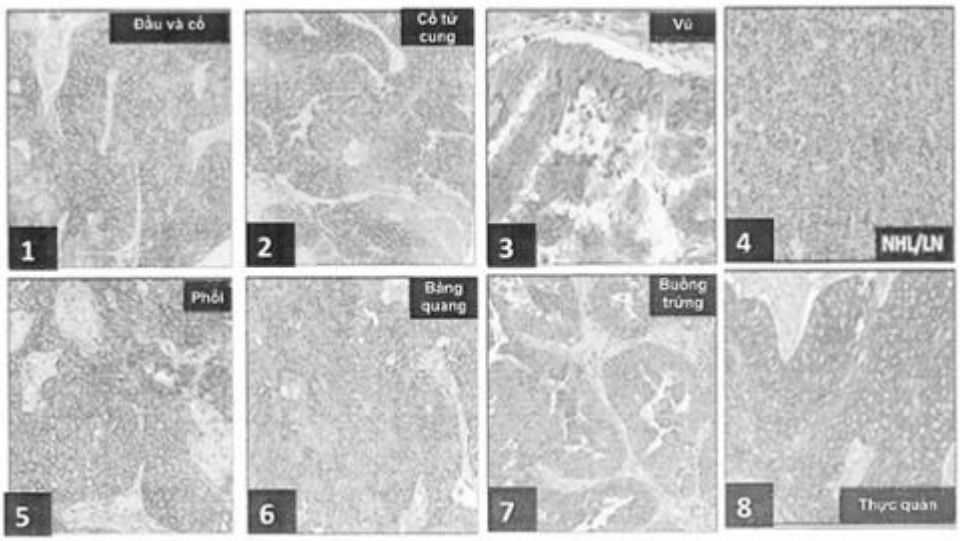
(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(11) **1-0038769**
(51)[2020.01] **A61K 47/68**; C07K 16/28; A61P 35/00 (13) **B**

(21) 1-2020-02151 (22) 12/10/2018
(86) PCT/US2018/055733 12/10/2018 (87) WO 2019/075417 18/04/2019
(30) 62/572,467 14/10/2017 US
(45) 26/02/2024 431 (43) 27/07/2020 388
(73) ABBVIE INC. (US)
1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064, United States of America
(72) SINGH, Shweta (GB); RICHARDSON, Jennifer Hope (US); SERWER, Laura Patterson (US); TERRETT, Jonathan Alexander (GB); MORGAN-LAPPE, Susan E. (US); HENRIQUES, Tracy (CA); RALSTON, Sherry L. (US); LEANNA, Marvin Robert (US); BADAGNANI, Ilaria (US); BOSE, Sahana (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ CÓ HOẠT TÍNH ĐƯỢC LIÊN HỢP

(57) Sáng chế đề cập chung đến kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà liên kết CD71 ở dạng hoạt tính của chúng. Các kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 này có thể được sử dụng trong nhiều chỉ định trị liệu, chẩn đoán và phòng ngừa. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể và dược phẩm chứa kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến thể liên hợp thuốc kháng thể có thể hoạt hóa (AADC: activatable antibody drug conjugate) mà liên kết CD71 ở trạng thái được hoạt hóa, và phương pháp tạo ra và sử dụng các kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 này trong nhiều chỉ định trị liệu, chẩn đoán và phòng ngừa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các liệu pháp dựa trên kháng thể đã được chứng minh là phương pháp điều trị hữu hiệu đối với một vài bệnh nhưng trong một số trường hợp, sự gây độc do sự biểu hiện đích rộng hạn chế hiệu quả trị liệu của chúng. Ngoài ra, các liệu pháp dựa trên kháng thể đã thể hiện các giới hạn khác chẳng hạn như sự thanh thải nhanh từ hệ tuần hoàn sau khi dùng.

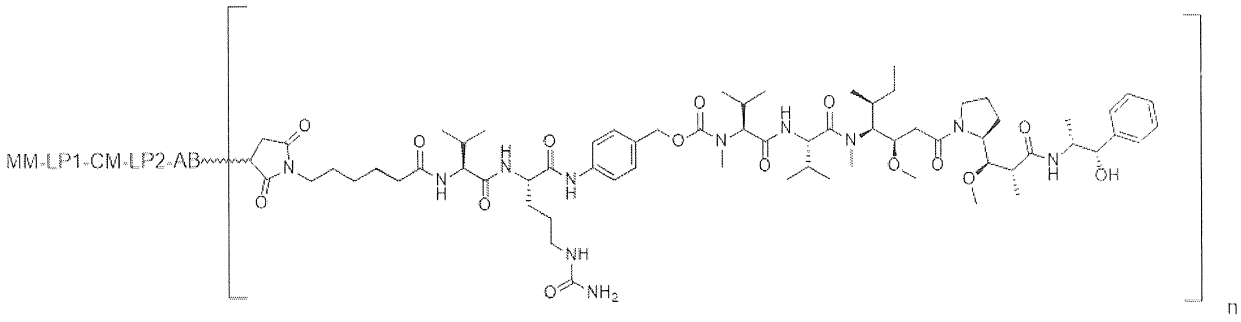
Trong lĩnh vực liệu pháp phân tử nhỏ, các chiến lược đã được phát triển để tạo ra tiền dược chất của thực thể hóa học hoạt tính. Tiền dược chất này được dùng ở dạng tương đối không hoạt tính (hoặc ít hoạt tính hơn đáng kể). Khi được dùng, tiền dược chất được chuyển hóa *in vivo* thành hợp chất hoạt tính. Các chiến lược tiền dược chất này có thể mang lại khả năng chọn lọc tăng lên của thuốc đối với đích dự kiến của nó và mang lại sự giảm đi của các tác dụng có hại.

Theo đó, trong lĩnh vực này có nhu cầu liên tục về các liệu pháp dựa trên kháng thể đối với kháng thể mà bắt chước các đặc điểm mong muốn của tiền dược chất phân tử nhỏ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà liên kết đặc hiệu CD71, còn gọi là protein thụ thể transferrin 1 (TfR1: transferrin receptor protein 1).

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng:



Công thức (I)

trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự CDRH1 có chứa SEQ ID NO: 9, trình tự CDRH2 có chứa SEQ ID NO: 10, và trình tự CDRH3 có chứa SEQ ID NO: 11; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự CDRL1 có chứa SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO:13, trình tự CDRL2 có chứa SEQ ID NO: 14, và trình tự CDRL3 có chứa SEQ ID NO: 15; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) LP1 là gốc liên kết thứ nhất có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207; (iv) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (v) LP2 là gốc liên kết thứ hai có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38; và (b) trong đó "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh liên quan của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) LP1 là gốc liên kết thứ nhất có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207; (iv) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (v) LP2 là gốc liên kết thứ hai có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38; và (b) trong đó "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương

án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

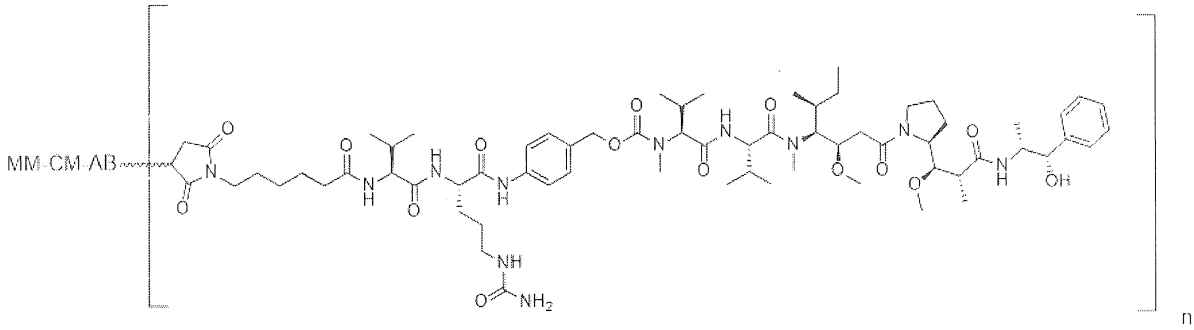
Theo khía cạnh liên quan của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) LP1 là gốc liên kết thứ nhất có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207; (iv) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (v) LP2 là gốc liên kết thứ hai có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38; và (b) trong đó "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh liên quan của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng trong đó MM-LP1-CM-LP2-AB là kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 169, và trong đó "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh liên quan của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng trong đó MM-LP1-CM-LP2-AB là

kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 170 trong đó "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh liên quan của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng:



Công thức (II)

trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự CDRH1 có chứa SEQ ID NO: 9, trình tự CDRH2 có chứa SEQ ID NO: 10, và trình tự CDRH3 có chứa SEQ ID NO: 11; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự CDRL1 có chứa SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO:13, trình tự CDRL2 có chứa SEQ ID NO: 14, và trình tự CDRL3 có chứa SEQ ID NO: 15; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; và (iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (b) trong đó "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh liên quan của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; và (iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (b) trong đó "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh liên quan của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; và (iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (b) trong đó "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh liên quan của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng trong đó MM-LP1-CM-LP2-AB là kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 169, và trong đó "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB có chứa isotyp IgG1.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh liên quan của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng trong đó MM-LP1-CM-LP2-AB là kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 170, và trong đó "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng, trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự CDRH1 có chứa SEQ ID NO: 9, trình tự CDRH2 có chứa SEQ ID NO: 10, và trình tự CDRH3 có chứa SEQ ID NO: 11; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự CDRL1 có chứa SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO:13, trình tự CDRL2 có chứa SEQ ID NO: 14, và trình tự CDRL3 có chứa SEQ ID NO: 15; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) LP1 là gốc liên kết thứ nhất có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207; (iv) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (v) LP2 là gốc liên kết thứ hai có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38; và (b) trong đó "n" bằng 2; phương pháp này có chứa bước (i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-LP1-CM-LP2-AB bằng tác nhân khử; và (ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa

được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng, trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) LP1 là gốc liên kết thứ nhất có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207; (iv) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (v) LP2 là gốc liên kết thứ hai có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38; và (b) trong đó "n" bằng 2; phương pháp này có chứa bước (i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-LP1-CM-LP2-AB bằng tác nhân khử; và (ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng, trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) LP1 là gốc liên kết thứ nhất có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207; (iv) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (v) LP2 là gốc liên kết thứ hai có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38; và (b) trong đó "n" bằng 2; phương pháp này có chứa bước (i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-LP1-CM-LP2-AB bằng tác nhân khử; và (ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng

không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng trong đó MM-LP1-CM-LP2-AB là kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 169; và (b) trong đó "n" bằng 2; phương pháp này có chứa bước (i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-LP1-CM-LP2-AB bằng tác nhân khử; và (ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng trong đó MM-LP1-CM-LP2-AB là kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 170; và (b) trong đó "n" bằng 2; phương pháp này có chứa bước (i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-LP1-CM-LP2-AB bằng tác nhân khử; và (ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng, trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự CDRH1 có chứa SEQ ID NO: 9, trình tự CDRH2 có chứa SEQ ID NO: 10, và trình tự

CDRH3 có chứa SEQ ID NO: 11; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự CDRL1 có chứa SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO:13, trình tự CDRL2 có chứa SEQ ID NO: 14, và trình tự CDRL3 có chứa SEQ ID NO: 15; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (b) trong đó "n" bằng 2; phương pháp này có chứa bước (i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-LP1-CM-LP2-AB bằng tác nhân khử; và (ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng, trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (b) trong đó "n" bằng 2; phương pháp này có chứa bước (i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-LP1-CM-LP2-AB bằng tác nhân khử; và (ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng, trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong

SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (b) trong đó "n" bằng 2; phương pháp này có chứa bước (i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-LP1-CM-LP2-AB bằng tác nhân khử; và (ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng trong đó MM-LP1-CM-LP2-AB là kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 169; và (b) trong đó "n" bằng 2; phương pháp này có chứa bước (i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-LP1-CM-LP2-AB bằng tác nhân khử; và (ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng trong đó MM-LP1-CM-LP2-AB là kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 170; và (b) trong đó "n" bằng 2; phương pháp này có chứa bước (i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-LP1-CM-LP2-AB bằng tác nhân khử; và (ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức

(I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất dược phẩm có chứa kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của một lần nhắc lại có Công thức (I) hoặc Công thức (II). Theo một số phương án dược phẩm có thể có chứa chất mang dược dụng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị, làm nhẹ bớt triệu chứng của, hoặc làm trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư ở đối tượng, phương pháp này có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) hoặc Công thức (II), hoặc dược phẩm có chứa kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của một lần nhắc lại có Công thức (I) hoặc Công thức (II) và một cách tùy ý, chất mang dược dụng, cho đối tượng cần chúng đối với bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có: bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư vú ER+, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính, bệnh ung thư kết trực tràng, u melanin, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, đa u tủy, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, ung thư biểu mô tế bào nhỏ đầu và cổ, bệnh ung thư tụy, u trung biểu mô, u lympho không Hodgkin, ung thư biểu mô tế bào gan, và u nguyên bào đệm.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa (a) kháng thể có thể hoạt hóa (AA) có chứa ở trạng thái không được phân cắt sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB, trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 động vật có vú và có chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 5 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 7; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ghép nối với AB ức chế sự liên kết của AB với CD71 khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156 ghép nối với AB trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (b) monometyl auristatin E (MMAE: monomethyl auristatin E), trong đó kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp vào hai đương lượng của MMAE. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức AA-(AG)p trong đó (a) AA là kháng thể có thể hoạt hóa có chứa ở trạng thái không được phân cắt sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB, trong đó (i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 động vật có vú và có chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 5 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 7; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ghép nối với AB ức chế sự liên kết của AB với CD71 khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156 ghép nối với AB trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (b) AG là tác nhân được liên hợp vào AA, trong đó tác nhân này là MMAE và trong đó p bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa (a) liên hợp ít nhất là một MMAE với kháng thể có thể hoạt hóa (AA) bằng cách đó tạo ra hợp phần có chứa AA-(MMAE)p, trong đó p nằm trong khoảng từ 1 đến 8; và (b) làm giàu hợp phần đối với các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó p bằng 2, trong đó AA có chứa ở trạng thái không được phân cắt có chứa sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 động vật có vú và có chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 5 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 7; (ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ghép nối với AB ức chế sự liên kết của AB với CD71 khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; (iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156 ghép nối với AB trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và (b) AG là tác nhân được liên hợp vào AA, trong đó tác nhân này là MMAE và trong đó p bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp bất kỳ, hoặc dược phẩm, như bộc lộ trong bản mô tả này, để sử dụng làm thuốc.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp bất kỳ, hoặc dược phẩm, như bộc lộ trong bản mô tả này, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư, tùy ý trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có: bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư vú ER+, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính, bệnh ung thư kết trực tràng, u melanin, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, đa u tủy, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, ung thư biểu mô tế bào nhỏ đầu và cổ, bệnh ung thư tụy, u trung biểu mô, u lympho không Hodgkin, ung thư biểu mô tế bào gan, và u nguyên bào đệm. Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất bộ kit có chứa ít nhất là một kháng thể có thể hoạt hóa như bộc lộ trong bản mô tả này. Bộ kit có thể còn chứa một hoặc nhiều vcMMAE, và/hoặc tác nhân khử.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1, như thảo luận trong Ví dụ 5, minh họa thử nghiệm hóa mô miễn dịch (IHC: immunohistochemical) ví dụ để xác định mức độ của sự biểu hiện CD71 trong các kiểu mô ung thư nguyên phát và di căn khác nhau. Các kết quả ví dụ được thể hiện trên hình vẽ này và ví dụ cho thấy rằng CD71 được biểu hiện ở mức độ cao trong khối u nguyên phát của nhiều bệnh ung thư ở người.

Fig.2, như thảo luận trong Ví dụ 5, minh họa các nghiên cứu ví dụ của mức độ biểu hiện của CD71 trong nhiều mẫu ung thư di căn có nguồn gốc từ bệnh nhân. Các kết quả ví dụ được thể hiện trên hình vẽ này và ví dụ cho thấy rằng CD71 được biểu hiện ở mức độ cao trong khối u di căn trong nhiều bệnh ung thư ở người.

Fig.3A và Fig.3B, như thảo luận trong Ví dụ 4, minh họa thử nghiệm *in vitro* ví dụ của khả năng của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 không được liên hợp và được liên hợp theo sáng chế để liên kết CD71 tái tổ hợp ở người hoặc khỉ cynomolgus khi kháng thể có thể hoạt hóa là nguyên vẹn hoặc được hoạt hóa theo cách phân hủy protein (được chỉ ra dưới dạng "ACT"). Các kết quả ví dụ được thể hiện trên các hình vẽ này và ví dụ cho thấy rằng kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 liên kết với CD71 ở mức độ có thể so sánh được với đối ứng kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 không được liên hợp của nó, và cũng đều liên kết CD71 với ái lực tăng lên tương đương khi hoạt hóa bằng proteaza.

Fig.3C và Fig.3D, như thảo luận trong Ví dụ 4, minh họa thử nghiệm *in vitro* ví dụ của khả năng của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 không được liên hợp và được liên hợp theo sáng chế để liên kết CD71 người hoặc khỉ cynomolgus trên bề mặt tế bào khi kháng thể có thể hoạt hóa là nguyên vẹn hoặc được hoạt hóa theo cách phân hủy protein (được chỉ ra dưới dạng "ACT"). Các kết quả ví dụ được thể hiện trên các hình vẽ này và ví dụ cho thấy rằng kháng thể có thể hoạt hóa

được liên hợp kháng-CD71 liên kết với CD71 bề mặt tế bào ở mức độ có thể so sánh được với đối ứng kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 không được liên hợp của nó, và cũng đều liên kết CD71 bề mặt tế bào với ái lực tăng lên tương đương khi hoạt hóa bằng proteaza.

Các Fig.4A, 4B, và 4C, như thảo luận trong Ví dụ 6, minh họa các nghiên cứu hiệu quả ví dụ của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 (AADC) theo sáng chế trong mô hình ghép khác loài chuột nhắt (TF01-3011-MMAE kháng-CD71 so với TF02.13-2011-MMAE kháng-CD71). Các kết quả ví dụ này được thể hiện trên các hình vẽ này và ví dụ mà AADC với gốc che giấu ái lực thấp hơn (TF02.13) chứng tỏ hiệu quả cao hơn so với AADC với gốc che giấu ái lực cao hơn (TF01).

Fig.5, như thảo luận trong Ví dụ 7, minh họa nghiên cứu thử nghiệm ví dụ của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 (AADC) theo sáng chế trong mô hình ghép khác loài chuột nhắt. Các kết quả ví dụ được thể hiện trên hình vẽ này và ví dụ chứng tỏ rằng hiệu quả của AADC được chỉ ra (TF02.13-2011-vcMMAE kháng-CD71) với cơ chất có thể phân cắt ít hơn về cơ bản giống như hiệu quả của AADC (TF02.13-3011-vcMMAE kháng-CD71) với cơ chất có thể phân cắt nhiều hơn được thể hiện trên các hình vẽ Fig.4B và Fig.4C.

Các Fig.6A, 6B, 6C, và 6D, như thảo luận trong Ví dụ 8, minh họa các nghiên cứu hiệu quả ví dụ của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 (AADC) với DAR khác nhau (TF02.13-2011-vcMMAE kháng-CD71 với DAR ~3 so với kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 với DAR ~2) theo sáng chế trong mô hình ghép khác loài chuột nhắt. Các kết quả ví dụ được thể hiện trên các hình vẽ này và ví dụ chứng tỏ rằng hiệu quả của các AADC ngang bằng về liều lượng (TF02.13-2011-vcMMAE kháng-CD71) có DAR khác nhau thể hiện hiệu quả có thể so sánh được.

Các Fig.7A, 7B, và 7C, như thảo luận trong Ví dụ 9, thể hiện sơ đồ dòng chảy công việc ví dụ để phân tích sản phẩm chuyển hóa bắt nguồn từ việc dùng kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 (AADC) theo sáng chế.

Các Fig.8A, 8B, 9A, 9B, 10, và 11, như thảo luận trong các Ví dụ 11-14, minh họa các khoảng thời gian ví dụ của sản phẩm phụ chuyển hóa sau khi dùng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 (AADC) theo sáng chế trong mô hình động vật. Các kết quả ví dụ được thể hiện trên các hình vẽ này và ví dụ chứng tỏ rằng lượng của AADC tổng số và nguyên vẹn theo sáng chế (kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2) được duy trì ở các con vật trong suốt quá trình dùng liều lượng ở lượng tỉ lệ với liều lượng, và lượng của MMAE mà được liên hợp vào kháng thể có thể hoạt hóa cao hơn đáng kể so với lượng của MMAE không được liên hợp trong suốt quá trình dùng liều lượng và ở tất cả các mức liều lượng.

Fig.12, như thảo luận trong Ví dụ 17, minh họa sự chuẩn độ ví dụ của vật phẩm thử nghiệm được chỉ ra đối với mảnh protein iC3b, thể hiện khả năng của chúng để hoạt hóa luồng bổ thể. Các kết quả ví dụ được thể hiện trên hình vẽ này và ví dụ chứng tỏ rằng AADC theo sáng chế (kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2) chứng tỏ khả năng thấp hơn đối với sự hoạt hóa bổ thể so với kháng thể có thể hoạt hóa không được liên hợp của nó.

Fig.13, như thảo luận trong Ví dụ 19, minh họa hiệu quả ví dụ của AADC theo sáng chế (kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2) trong mô hình ghép khác loài chuột nhắt sử dụng dòng tế bào kết trực tràng người. Các kết quả ví dụ được thể hiện trên hình vẽ này và ví dụ chứng tỏ rằng AADC theo sáng chế thể hiện sự ức chế phát triển khối u đáng kể ở tất cả các liều lượng, với sự thoái triển hoàn toàn quan sát được ở các liều lượng cao nhất.

Fig.14, như thảo luận trong Ví dụ 20, minh họa hiệu quả ví dụ của AADC theo sáng chế (kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2) trong mô hình ghép khác loài chuột nhắt sử dụng khối u có nguồn gốc từ người bệnh (DLBCL: human patient-derived tumor). Các kết quả ví dụ được thể hiện trên hình vẽ này và ví dụ chứng tỏ rằng AADC theo sáng chế thể hiện sự ức chế phát triển khối u đáng kể sau lần dùng đơn lẻ, với đáp ứng hoàn toàn quan sát được trong một số trường hợp. Các Fig.15A, 15B, và 15C, như thảo luận trong Ví dụ 21, minh họa hiệu quả ví dụ của AADC theo sáng chế (kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2) ở mô hình mảnh ghép khác loài có nguồn gốc từ chuột bị bệnh (PDX: patient-derived xenograft). Các kết quả ví dụ được thể hiện trên các hình vẽ này và ví dụ chứng tỏ rằng AADC theo sáng chế chứng tỏ hiệu quả, bao gồm đáp ứng hoàn chỉnh trong một số trường hợp, trong các mô hình PDX có nguồn gốc từ nhiều loại bệnh ung thư ở người.

Fig.16, như thảo luận trong Ví dụ 22, minh họa hiệu quả ví dụ của AADC theo sáng chế (kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2) ở mô hình mảnh ghép khác loài có nguồn gốc từ chuột bị bệnh. Các kết quả ví dụ được thể hiện trên hình vẽ này và ví dụ chứng tỏ rằng AADC theo sáng chế chứng tỏ hiệu quả, bao gồm đáp ứng hoàn chỉnh trong một số trường hợp, đối với mô hình bệnh ung thư tụy PDX.

Fig.17, như thảo luận trong Ví dụ 10, tóm tắt kết quả mà thể hiện kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 người với độc tố được liên hợp (AADC) theo sáng chế (kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2) được dung chịu tốt và ổn định ở khỉ cynomolgus, ngay cả ở liều lượng tương đối cao hơn, so với thể liên hợp thuốc kháng thể (ADC) kháng-CD71 bố mẹ tương ứng, AADC có cơ chất với khả năng thanh thải lớn hơn, và AADC có DAR cao hơn.

Các Fig.18A, 18B, và 18C, như thảo luận trong Ví dụ 27, thể hiện biên dạng được tách bằng HIC của các loài có mặt trong TF02.13-2011-vcMMAE kháng-CD71 không được tinh chế và kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 được tinh chế, cũng như là tốc độ thanh thải của chúng

ở chuột nhắt. Các hình vẽ và ví dụ này cho thấy rằng kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 di chuyển dưới dạng loại đơn lẻ của thể liên hợp và có tốc độ thanh thải thấp hơn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 mà liên kết đặc hiệu CD71 ở trạng thái được hoạt hóa. CD71 còn được gọi là protein thụ thể transferrin 1 (TfR1). Nhìn chung, sáng chế đề cập đến kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 có chứa gốc che giấu, gốc có thể phân cắt, cầu nối vc, và độc tố MMAE. Gốc che giấu (MM) làm giảm khả năng của vị trí liên kết kháng thể để liên kết với kháng nguyên đích CD71 của nó khi kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt; gốc có thể phân cắt (CM) là cơ chất có thể hoạt hóa bằng proteaza mà được phân cắt trong vi môi trường khối u dẫn đến việc loại bỏ của gốc che giấu và sự hoạt hóa đồng thời của CDR nhắm đích kháng-CD71. Cụ thể là, sáng chế mô tả sự lựa chọn của kháng thể đơn dòng có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 mà có hiệu quả và khả năng dung chịu tốt hơn so với kháng thể đơn dòng có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 khác đã biết khác trong lĩnh vực nhờ nó có sự kết hợp độc nhất của gốc che giấu ái lực thấp hơn, cơ chất gốc có thể phân cắt ít hơn, và tải lượng thuốc thấp bằng 2 mà cùng nhau dẫn đến hiệu quả và khả năng dung chịu được cải thiện đáng kể trong mô hình khối u chuột nhắt. Ngoài ra, kháng thể đơn dòng có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 cũng đáng ngạc nhiên là thiếu khả năng để liên kết với thụ thể FcγRIIb ức chế, không giống như kháng thể khác chứa Fc IgG1 kiểu dại, mà là điều quan trọng bởi vì việc liên kết với thụ thể này được biết là làm ức chế các quy trình phụ thuộc canxi chẳng hạn như sự mất hạt, sự thực bào, sự gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC: antibody dependent cell-mediated cytotoxicity), sự giải phóng xytokin, và sự hoạt hóa tiền viêm, tất cả chúng được mong đợi là dẫn đến hiệu quả giảm đi nếu thụ thể FcγRIIb được hoạt hóa.

CD71 là thụ thể bề mặt tế bào mà được biểu hiện trên tế bào đang phân chia, bao gồm tế bào ung thư. Nó được biểu hiện ở mức độ cao ở phạm vi rộng của các loại tế bào ung thư, và CD71 được nội tại hóa, do đó làm cho nó là đích hấp dẫn đối với việc trị liệu ung thư được nhắm đích bằng cách sử dụng độc tố được liên hợp được định hướng kháng thể. Gốc che giấu (MM: masking moiety) có ái lực cao hơn và thấp hơn, cũng như là gốc có thể phân cắt (CM) có khả năng thanh thải nhỏ hơn hoặc lớn hơn, được xác định và được sử dụng để tạo cấu trúc nhiều kháng thể có thể hoạt hóa và sau đó là kháng thể được liên hợp vcMMAE (*tức là* thể liên hợp thuốc kháng thể có thể hoạt hóa hoặc AADC). Các nghiên cứu hiệu quả ví dụ của các kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp này trong mô hình ghép khác loài chuột nhắt cho thấy rằng AADC với gốc che giấu ái lực cao hơn (ví dụ như, CD71-TF01-3011-vcMMAE) chứng tỏ hiệu quả thấp hơn so với AADC với

thành phần che giấu ái lực thấp hơn (ví dụ như, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE). Hơn nữa, các nghiên cứu hiệu quả khác sử dụng AADC có cùng thành phần che giấu ái lực thấp hơn nhưng với cơ chất có khả năng phân cắt khác cho thấy rằng mặc dù hiệu quả giống nhau, ở động vật linh trưởng không phải là người AADC với cơ chất có thể phân cắt ít hơn (CD71-TF02.13-2011-vcMMAE) được dung chịu tốt hơn và với mức độ thấp hơn của AADC tuần hoàn ở dạng hoạt hóa khi so với AADC với cơ chất có thể phân cắt tốt hơn (CD71-TF02.13-3011-vcMMAE), do đó tạo ra chỉ số trị liệu cao hơn. Ngoài ra các nghiên cứu cho thấy rằng AADC có tỉ lệ thuốc-với-kháng thể có thể hoạt hóa thấp hơn (*ví dụ như*, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2, trong đó DAR bằng 2) được dung chịu tốt hơn ở liều lượng cao hơn khi so với cùng kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp, với DAR cao hơn (tức là DAR ~ 3). Hơn nữa, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2 thể hiện hiệu quả tương đương với liều lượng ở liều ngang bằng đối với AADC DAR cao hơn trong nhiều mô hình chuột nhắt CDX và PDX của bệnh ung thư ở người. Cuối cùng, CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2 thể hiện khả năng dung chịu đáng kể đối với đối ứng không được che giấu của nó, mà không được dung chịu thậm chí ở liều lượng thấp.

Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng có thể hoạt hóa được liên hợp được nội tại hóa bằng tế bào chứa CD71. Việc sử dụng thuật ngữ "CD71" được dự định để bao hàm sự biến đổi bất kỳ của chúng, chẳng hạn như, để làm ví dụ mà không làm giới hạn sáng chế, CD-71 và/hoặc CD 71, và tất cả các biến đổi được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này.

CD71 là glycoprotein xuyên màng mà chủ yếu liên kết transferrin. CD71 là thiết yếu đối với tình trạng nội cân bằng tế bào. CD71 được tái tuần hoàn liên tục thông qua sự nhập bào qua trung gian phối tử, trong đó phối tử chính là transferrin. CD71 còn được biết là được biểu hiện rộng khắp trên tế bào đang phân chia.

Sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính bất thường của CD71 và việc truyền tín hiệu liên quan đến CD71 đã được kéo theo trong sự phát sinh bệnh của nhiều bệnh và rối loạn, chẳng hạn như bệnh ung thư. CD71 được biểu hiện quá mức ở nhiều bệnh ung thư, bao gồm cả bệnh ung thư thể rắn và bệnh ung thư máu. CD71 có sự biểu hiện bề mặt tế bào rộng. CD71 ở tế bào ác tính làm trung gian cho sự hấp thụ sắt cao hơn cần cho sự phân chia tế bào. CD71 cũng liên quan đến tiên lượng kém ở bệnh bạch cầu. CD71 là đích mong muốn bởi vì nó phổ biến ở nhiều chỉ định ung thư.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp mà hữu dụng trong phương pháp điều trị, ngăn ngừa, làm trì hoãn sự tiến triển, làm cho tốt hơn và/hoặc làm nhẹ bớt triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bất thường. Ví dụ như, kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được sử dụng trong phương pháp điều trị, ngăn ngừa, làm trì hoãn sự tiến triển, làm cho tốt hơn và/hoặc làm nhẹ bớt triệu chứng của bệnh ung thư hoặc tình trạng có khối u khác.

Sáng chế đề xuất kháng kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp mà hữu dụng trong phương pháp điều trị, ngăn ngừa, làm trì hoãn sự tiến triển, làm cho tốt hơn và/hoặc làm nhẹ bớt triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn kết hợp với tế bào biểu hiện CD71. Theo một số phương án, tế bào được kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bất thường. Theo một số phương án, tế bào được kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bình thường. Ví dụ như, kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được sử dụng trong phương pháp điều trị, ngăn ngừa, làm trì hoãn sự tiến triển, làm cho tốt hơn và/hoặc làm nhẹ bớt triệu chứng của bệnh ung thư hoặc tình trạng có khối u khác.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp mà hữu dụng trong phương pháp điều trị, ngăn ngừa, làm trì hoãn sự tiến triển, làm cho tốt hơn và/hoặc làm nhẹ bớt triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn trong đó tế bào bị bệnh biểu hiện CD71. Theo một số phương án, tế bào bị bệnh được kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bất thường. Theo một số phương án, tế bào bị bệnh được kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bình thường. Ví dụ như, kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được sử dụng trong phương pháp điều trị, ngăn ngừa, làm trì hoãn sự tiến triển, làm cho tốt hơn và/hoặc làm nhẹ bớt triệu chứng của bệnh ung thư hoặc tình trạng có khối u khác.

Kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu CD71 ghép nối với gốc che giấu (MM), sao cho việc ghép nối của MM làm giảm khả năng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng để liên kết CD71. Theo một số phương án, MM được ghép nối thông qua trình tự mà bao gồm cơ chất cho proteaza, ví dụ như, proteaza mà được đồng định vị với CD71 ở vị trí điều trị ở đối tượng.

Kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa ví dụ theo sáng chế bao gồm, ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa mà bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mà là, hoặc có nguồn gốc từ, trình tự biến đổi chuỗi nặng và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện dưới đây (các trình tự CDR được thể hiện bằng cách in đậm và gạch chân):

muM21 VH:

EVQLQESGTVLARPGASVKMSCKAS**GYTFTSYWMH**WVKQRPGQGLEWIG**AIY PGNSETG**YNQNFKGKAKLTAVTSASTAYMDLSSLTNEDSAVYYCTR**ENWDPGF AF**WGQGTLITVSA (SEQ ID NO: 1)

VL muM21:

DIVMTQTPAIMSASPGEKVTITC**SASSSVYYMY**WFQQKPGTSPKLWIY**STSNLAS** GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYC**QQRRNYPYT**FGGGTKLEIKRA (SEQ ID NO: 2)

Chuỗi nặng biến đổi hu2vHa

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTSYWMH**WVRQAPGQGLEWMG**AI YPGNSETG**YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**ENWDPG FAF**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 3)

Chuỗi nặng biến đổi hu2vHb

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKAS**GYTFTSYWMH**WVRQAPGQGLEWIG**AIY PGNSETG**YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**ENWDPGF AF**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 4)

Chuỗi nặng biến đổi hu2vHc

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKAS**GYTFTSYWMH**WVRQAPGQGLEWIG**AIY PGNSETG**YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**ENWDPGF AF**WGQGTLITVSS (SEQ ID NO: 5)

Chuỗi nhẹ biến đổi hu21vKa

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSVYYMY**WYQQKPGKAPKLLIY**STSNLAS** GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQRRNYPYT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 6)

Chuỗi nhẹ biến đổi hu21vKb

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSVYYMY**WFQQKPGKAPKLWIY**STSNLAS** GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYC**QQRRNYPYT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 7)

Chuỗi nhẹ biến đổi hu21vKc

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT**CRASSSVYYMY**WFQQKPGKAPKLWIY**STSNLAS** GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYC**QQRRNYPYT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 8)

Kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa ví dụ theo sáng chế bao gồm, ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa mà bao gồm dạng kết hợp của trình tự vùng xác định bổ sung 1 chuỗi nặng biến đổi (CDR1 VH, còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng CDRH1), trình tự vùng xác định bổ sung 2 chuỗi nặng biến đổi (CDR2 VH, còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng CDRH2), trình tự vùng xác định bổ sung 3 chuỗi nặng biến đổi (CDR3 VH, còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng CDRH3), trình tự vùng xác định bổ sung 1 chuỗi nhẹ biến đổi (CDR1 VL, còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng CDRL1), trình tự vùng xác định bổ sung 2 chuỗi nhẹ biến đổi (CDR2 VL, còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng CDRL2), và trình tự vùng xác định bổ sung 3 chuỗi nhẹ biến đổi (CDR3 VL, còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng CDRL3), trong đó ít nhất là một trình tự CDR được chọn từ nhóm gồm có trình tự CDR1 VH có chứa trình tự axit amin GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); trình tự CDR2 VH có chứa trình tự axit amin AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); trình tự CDR3 VH có chứa trình tự axit amin ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); trình tự CDR1 VL có chứa trình tự axit amin SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) hoặc CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); trình tự CDR2 VL có chứa trình tự axit amin STSNLAS (SEQ ID NO: 14); và trình tự CDR3 VL có chứa trình tự axit amin QQRRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có chứa dạng kết hợp của trình tự CDR1 VH, trình tự CDR2 VH, trình tự CDR3 VH, trình tự CDR1 VL, trình tự CDR2 VL, và trình tự CDR3 VL, trong đó ít nhất là một trình tự CDR được chọn từ nhóm gồm có trình tự CDR1 VH mà bao gồm trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn đối với trình tự CDR1 VH có chứa trình tự axit amin GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); trình tự CDR2 VH mà bao gồm trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn đối với trình tự CDR2 VH có chứa trình tự axit amin AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); trình tự CDR3 VH mà bao gồm trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn đối với trình tự CDR3 VH có chứa trình tự axit amin ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); trình tự CDR1 VL mà bao gồm trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn đối với trình tự CDR1 VL có chứa trình tự axit amin ASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) hoặc CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); trình tự CDR2 VL mà bao gồm trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn đối với trình tự CDR2 VL có chứa trình tự axit amin STSNLAS (SEQ ID NO: 14; và trình tự CDR3 VL mà bao gồm trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%

hoặc lớn hơn đối với trình tự CDR3 VL có chứa trình tự axit amin QQRRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có chứa dạng kết hợp của trình tự CDR1 VH, trình tự CDR2 VH, trình tự CDR3 VH, trình tự CDR1 VL, trình tự CDR2 VL, và trình tự CDR3 VL, trong đó trình tự CDR1 VH có chứa trình tự axit amin GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); trình tự CDR2 VH có chứa trình tự axit amin AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); trình tự CDR3 VH có chứa trình tự axit amin ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); trình tự CDR1 VL có chứa trình tự axit amin SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) hoặc CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); trình tự CDR2 VL có chứa trình tự axit amin STSNLAS (SEQ ID NO: 14); và trình tự CDR3 VL có chứa trình tự axit amin QQRRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có chứa dạng kết hợp của trình tự CDR1 VH, trình tự CDR2 VH, trình tự CDR3 VH, trình tự CDR1 VL, trình tự CDR2 VL, và trình tự CDR3 VL, trong đó trình tự CDR1 VH có chứa trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn đối với trình tự axit amin GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); trình tự CDR2 VH có chứa trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn đối với trình tự axit amin AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); trình tự CDR3 VH có chứa trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn đối với trình tự axit amin ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); trình tự CDR1 VL có chứa trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn đối với trình tự axit amin SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) hoặc CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); trình tự CDR2 VL có chứa trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn đối với trình tự axit amin STSNLAS (SEQ ID NO: 14); và trình tự CDR3 VL trình tự mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn đối với có chứa trình tự axit amin QQRRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

Theo một số phương án, kháng thể của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế bao gồm kháng thể mà liên kết đặc hiệu CD71. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp bao gồm kháng thể đơn dòng mà liên kết CD71. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng như vậy mà liên kết CD71 là kháng thể đơn dòng được làm cho giống người hoặc hoàn toàn ở người.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi

nặng có chứa SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa SEQ ID NO: 5, và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có chứa SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit amin có chứa SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit amin có chứa SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit amin có chứa SEQ ID NO: 1 và 3-5, và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit amin có chứa SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin có chứa SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin có chứa SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin có chứa SEQ ID NO: 5, và trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin có chứa SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin chuỗi nặng có chứa trình tự

axit amin có chứa SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin có chứa SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin có chứa SEQ ID NO: 5, và trình tự axit nucleic mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin có chứa SEQ ID NO: 7.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế bằng cách nuôi cấy tế bào trong điều kiện mà dẫn đến sự biểu hiện của kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó tế bào có chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế hoặc vectơ theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu CD71 ghép nối với gốc che giấu (MM), sao cho việc ghép nối của MM làm giảm khả năng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng để liên kết CD71. Theo một số phương án, MM được ghép nối thông qua trình tự mà bao gồm cơ chất cho proteaza, ví dụ như, proteaza mà có hoạt tính ở mô bị bệnh và/hoặc proteaza mà được đồng định vị với CD71 ở vị trí điều trị ở đối tượng. Kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp sáng chế đề xuất, cũng được đề cập đến thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này với kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp CD71, ổn định trong hệ tuần hoàn, được hoạt hóa ở vị trí dự kiến của trị liệu và/hoặc chẩn đoán nhưng không ở mô bình thường, *ví dụ như*, mô khỏe mạnh hoặc mô khác không được nhắm đích để điều trị và/hoặc chẩn đoán, và, khi được hoạt hóa, thể hiện việc liên kết với CD71 mà ít nhất là có thể so sánh được với kháng thể không được cải biến, tương ứng, còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng kháng thể gốc.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị, ngăn ngừa và/hoặc làm trì hoãn sự khởi phát hoặc sự tiến triển, hoặc làm nhẹ bớt triệu chứng kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính bất thường của CD71 ở đối tượng bằng cách sử dụng kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà liên kết CD71, cụ thể là kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà liên kết và làm trung hòa hoặc theo

cách khác ức chế ít nhất là một hoạt tính sinh học của CD71 và/hoặc việc truyền tín hiệu qua trung gian CD71.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị, ngăn ngừa và/hoặc làm trì hoãn sự khởi phát hoặc sự tiến triển, hoặc làm nhẹ bớt triệu chứng kết hợp với sự có mặt, sự phát triển, sự tăng sinh, sự di căn, và/hoặc hoạt tính của tế bào mà biểu hiện CD71 hoặc biểu hiện bất thường CD71 ở đối tượng bằng cách sử dụng kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà liên kết CD71, cụ thể là kháng thể có thể hoạt hóa mà liên kết, nhắm đích, làm trung hòa, giết chết, hoặc theo cách khác ức chế ít nhất là một hoạt tính sinh học của tế bào mà biểu hiện hoặc biểu hiện bất thường CD71.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị, ngăn ngừa và/hoặc làm trì hoãn sự khởi phát hoặc sự tiến triển, hoặc làm nhẹ bớt triệu chứng kết hợp với sự có mặt, sự phát triển, sự tăng sinh, sự di căn, và/hoặc hoạt tính của tế bào mà biểu hiện CD71 ở đối tượng bằng cách sử dụng kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà liên kết CD71, cụ thể là kháng thể có thể hoạt hóa mà liên kết, nhắm đích, làm trung hòa, giết chết, hoặc theo cách khác ức chế ít nhất là một hoạt tính sinh học của tế bào mà biểu hiện CD71.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị, ngăn ngừa và/hoặc làm trì hoãn sự khởi phát hoặc sự tiến triển, hoặc làm nhẹ bớt triệu chứng kết hợp với sự có mặt, sự phát triển, sự tăng sinh, sự di căn, và/hoặc hoạt tính của tế bào mà biểu hiện bất thường CD71 ở đối tượng bằng cách sử dụng kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà liên kết CD71, cụ thể là kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà liên kết, nhắm đích, làm trung hòa, giết chết, hoặc theo cách khác ức chế ít nhất là một hoạt tính sinh học của tế bào mà biểu hiện bất thường CD71.

Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái được hoạt hóa liên kết CD71 và bao gồm (i) kháng thể (AB) mà liên kết đặc hiệu với CD71; (ii) gốc che giấu (MM) mà, khi kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt, ức chế sự liên kết của AB với CD71; và (c) gốc có thể phân cắt (CM) ghép nối với AB, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt có sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB hoặc AB-CM-MM.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa peptit nối giữa MM và CM.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa peptit nối giữa CM và AB.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa peptit nối thứ nhất (LP1) và peptit nối thứ hai (LP2), và trong đó kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái

không được phân cắt có sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-LP1-CM-LP2-AB hoặc AB-LP2-CM-LP1-MM. Theo một số phương án, hai peptit nối không cần phải giống nhau.

Theo một số phương án, ít nhất là một trong số LP1 hoặc LP2 có chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có $(GS)_n$, $(GGS)_n$, $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO: 24) và $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 25), trong đó n là số nguyên bằng ít nhất là một.

Theo một số phương án, ít nhất là một trong số LP1 hoặc LP2 có chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có GGSG (SEQ ID NO: 26), GGSGG (SEQ ID NO: 27), GSGSG (SEQ ID NO: 28), GSGGG (SEQ ID NO: 29), GGGSG (SEQ ID NO: 30), và GSSSG (SEQ ID NO: 31).

Theo một số phương án, LP1 có chứa trình tự axit amin GGGSSGGS (SEQ ID NO: 207), GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 32), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 33), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 34), GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 35), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 36), GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 37).

Theo một số phương án, LP2 có chứa trình tự axit amin GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 38), GSSGT (SEQ ID NO: 39) hoặc GSSG (SEQ ID NO: 40).

Theo một số phương án, AB có hằng số phân ly bằng khoảng 100 nM hoặc nhỏ hơn đối với việc liên kết với CD71 động vật có vú. Theo một số phương án, AB có hằng số phân ly bằng khoảng 10 nM hoặc nhỏ hơn đối với việc liên kết với CD71 động vật có vú. Theo một số phương án, AB có hằng số phân ly bằng khoảng 5 nM hoặc nhỏ hơn đối với việc liên kết với CD71. Theo một số phương án, AB có hằng số phân ly bằng khoảng 1 nM hoặc nhỏ hơn đối với việc liên kết với CD71. Theo một số phương án, AB có hằng số phân ly bằng khoảng 0,5 nM hoặc nhỏ hơn đối với việc liên kết với CD71. Theo một số phương án, AB có hằng số phân ly bằng khoảng 0,1 nM hoặc nhỏ hơn đối với việc liên kết với CD71. Theo một số phương án, AB có hằng số phân ly nằm trong khoảng từ 0,01 nM đến 100 nM, từ 0,01 nM đến 10 nM, từ 0,01 nM đến 5 nM, từ 0,01 nM đến 1 nM, từ 0,01 đến 0,5 nM, từ 0,01 nM đến 0,1 nM, từ 0,01 nM đến 0,05 nM, từ 0,05 nM đến 100 nM, từ 0,05 nM đến 10 nM, từ 0,05 nM đến 5 nM, từ 0,05 nM đến 1 nM, từ 0,05 đến 0,5 nM, từ 0,05 nM đến 0,1 nM, từ 0,1 nM đến 100 nM, từ 0,1 nM đến 10 nM, từ 0,1 nM đến 5 nM, từ 0,1 nM đến 1 nM, từ 0,1 đến 0,5 nM, từ 0,5 nM đến 100 nM, từ 0,5 nM đến 10 nM, từ 0,5 nM đến 5 nM, từ 0,5 nM đến 1 nM, từ 1 nM đến 100 nM, từ 1 nM đến 10 nM, từ 1 nM đến 5 nM, từ 5 nM đến 100 nM, từ 5 nM đến 10 nM, hoặc từ 10 nM đến 100 nM, đối với việc liên kết với CD71 động vật có vú.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt liên kết đặc hiệu với CD71 động vật có vú với hằng số phân ly nhỏ hơn hoặc bằng 1 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 5 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 10 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 15 nM, nhỏ hơn hoặc

bằng 20 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 25 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 50 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 100 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 150 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 250 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 500 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 750 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 1000 nM, và/hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 2000 nM.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt liên kết đặc hiệu với CD71 động vật có vú với hằng số phân ly nằm trong khoảng từ 1 nM đến 2000 nM, từ 1 nM đến 1000 nM, từ 1 nM đến 750 nM, từ 1 nM đến 500 nM, từ 1 nM đến 250 nM, từ 1 nM đến 150 nM, từ 1 nM đến 100 nM, từ 1 nM đến 50 nM, từ 1 nM đến 25 nM, từ 1 nM đến 15 nM, từ 1 nM đến 10 nM, từ 1 nM đến 5 nM, từ 5 nM đến 2000 nM, từ 5 nM đến 1000 nM, từ 5 nM đến 750 nM, từ 5 nM đến 500 nM, từ 5 nM đến 250 nM, từ 5 nM đến 150 nM, từ 5 nM đến 100 nM, từ 5 nM đến 50 nM, từ 5 nM đến 25 nM, từ 5 nM đến 15 nM, từ 5 nM đến 10 nM, từ 10 nM đến 2000 nM, từ 10 nM đến 1000 nM, từ 10 nM đến 750 nM, từ 10 nM đến 500 nM, từ 10 nM đến 250 nM, từ 10 nM đến 150 nM, từ 10 nM đến 100 nM, từ 10 nM đến 50 nM, từ 10 nM đến 25 nM, từ 10 nM đến 15 nM, từ 15 nM đến 2000 nM, từ 15 nM đến 1000 nM, từ 15 nM đến 750 nM, từ 15 nM đến 500 nM, từ 15 nM đến 250 nM, từ 15 nM đến 150 nM, từ 15 nM đến 100 nM, từ 15 nM đến 50 nM, từ 15 nM đến 25 nM, từ 25 nM đến 2000 nM, từ 25 nM đến 1000 nM, từ 25 nM đến 750 nM, từ 25 nM đến 500 nM, từ 25 nM đến 250 nM, từ 25 nM đến 150 nM, từ 25 nM đến 100 nM, từ 25 nM đến 50 nM, từ 50 nM đến 2000 nM, từ 50 nM đến 1000 nM, từ 50 nM đến 750 nM, từ 50 nM đến 500 nM, từ 50 nM đến 250 nM, từ 50 nM đến 150 nM, từ 50 nM đến 100 nM, từ 100 nM đến 2000 nM, từ 100 nM đến 1000 nM, từ 100 nM đến 750 nM, từ 100 nM đến 500 nM, từ 100 nM đến 250 nM, từ 100 nM đến 150 nM, từ 150 nM đến 2000 nM, từ 150 nM đến 1000 nM, từ 150 nM đến 750 nM, từ 150 nM đến 500 nM, từ 150 nM đến 250 nM, từ 250 nM đến 2000 nM, từ 250 nM đến 1000 nM, từ 250 nM đến 750 nM, từ 250 nM đến 500 nM, từ 500 nM đến 2000 nM, từ 500 nM đến 1000 nM, từ 500 nM đến 750 nM, từ 500 nM đến 500 nM, từ 500 nM đến 250 nM, từ 500 nM đến 150 nM, từ 500 nM đến 100 nM, từ 500 nM đến 50 nM, từ 750 nM đến 2000 nM, từ 750 nM đến 1000 nM, hoặc từ 1000 nM đến 2000 nM.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái được hoạt hóa liên kết đặc hiệu với CD71 động vật có vú với hằng số phân ly nhỏ hơn hoặc bằng 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM, hoặc 10 nM.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái được hoạt hóa liên kết đặc hiệu với CD71 động vật có vú với hằng số phân ly nằm trong khoảng từ 0,01 nM đến 100 nM, từ 0,01 nM đến 10 nM, từ 0,01 nM đến 5 nM, từ 0,01 nM đến 1 nM, từ 0,01 đến 0,5 nM, từ 0,01 nM đến 0,1 nM, từ 0,01 nM đến 0,05 nM, từ 0,05 nM đến 100 nM, từ 0,05 nM đến 10 nM, từ 0,05 nM đến 5 nM, từ 0,05 nM đến 1 nM, từ 0,05 đến 0,5 nM, từ 0,05 nM đến 0,1 nM, từ 0,1 nM đến 100 nM, từ 0,1 nM đến 10 nM, từ 0,1 nM đến 5 nM, từ 0,1 nM đến 1 nM, từ 0,1 đến 0,5

nM, từ 0,5 nM đến 100 nM, từ 0,5 nM đến 10 nM, từ 0,5 nM đến 5 nM, từ 0,5 nM đến 1 nM, từ 1 nM đến 100 nM, từ 1 nM đến 10 nM, từ 1 nM đến 5 nM, từ 5 nM đến 100 nM, từ 5 nM đến 10 nM, hoặc từ 10 nM đến 100 nM.

Theo một số phương án, CD71 động vật có vú được chọn từ nhóm gồm có CD71 người, CD71 chuột nhắt, CD71 chuột cống, và CD71 khỉ cynomolgus. Theo một số phương án, AB liên kết đặc hiệu với CD71 người, CD71 chuột nhắt hoặc CD71 khỉ cynomolgus với hằng số phân ly nhỏ hơn 1 nM. Theo một số phương án, CD71 động vật có vú là CD71 người.

Theo một số phương án, AB có một hoặc nhiều đặc điểm sau đây: (a) AB liên kết đặc hiệu với CD71 người; và (b) AB liên kết đặc hiệu với CD71 người và CD71 khỉ cynomolgus.

Theo một số phương án, AB có một hoặc nhiều đặc điểm sau đây: (a) AB liên kết đặc hiệu CD71 người và CD71 khỉ cynomolgus; (b) AB ức chế sự liên kết của transferrin với CD71 động vật có vú; (c) AB ức chế sự liên kết của transferrin người với CD71 người; và (d) AB ức chế sự liên kết của transferrin khỉ cynomolgus với CD71 khỉ cynomolgus.

Theo một số phương án, AB phong bế khả năng của phối tử tự nhiên để liên kết với CD71 động vật có vú với EC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 5 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 10 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 50 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 100 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 500 nM, và/hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1000 nM. Theo một số phương án, AB phong bế khả năng của transferrin để liên kết với CD71 động vật có vú với EC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 5 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 10 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 50 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 100 nM, nhỏ hơn hoặc bằng 500 nM, và/hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1000 nM. Theo một số phương án, phối tử tự nhiên của CD71 là transferrin.

Theo một số phương án, AB phong bế khả năng của phối tử tự nhiên để liên kết với CD71 động vật có vú với EC_{50} nằm trong khoảng từ 5 nM đến 1000 nM, từ 5 nM đến 500 nM, từ 5 nM đến 100 nM 5 nM đến 50 nM, từ 5 nM đến 10 nM, từ 10 nM đến 1000 nM, từ 10 nM đến 500 nM, từ 10 nM đến 100 nM 10 nM đến 50 nM, từ 50 nM đến 1000 nM, từ 50 nM đến 500 nM, từ 50 nM đến 100 nM, từ 100 nM đến 1000 nM, từ 100 nM đến 500 nM, từ 500 nM đến 1000 nM. Theo một số phương án, AB phong bế khả năng của transferrin để liên kết với CD71 động vật có vú với EC_{50} nằm trong khoảng từ 5 nM đến 1000 nM, từ 5 nM đến 500 nM, từ 5 nM đến 100 nM 5 nM đến 50 nM, từ 5 nM đến 10 nM, từ 10 nM đến 1000 nM, từ 10 nM đến 500 nM, từ 10 nM đến 100 nM 10 nM đến 50 nM, từ 50 nM đến 1000 nM, từ 50 nM đến 500 nM, từ 50 nM đến 100 nM, từ 100 nM đến 1000 nM, từ 100 nM đến 500 nM, từ 500 nM đến 1000 nM. Theo một số phương án, phối tử tự nhiên của CD71 là transferrin.

Theo một số phương án, AB theo sáng chế ức chế hoặc làm giảm sự phát triển, sự tăng sinh, và/hoặc sự di căn của tế bào biểu hiện CD71 động vật có vú. Không dự định bị ràng buộc bởi lý thuyết bất kỳ, AB theo sáng chế có thể ức chế hoặc làm giảm sự phát triển, sự tăng sinh, và/hoặc

sự di căn của tế bào biểu hiện CD71 động vật có vú bằng cách liên kết đặc hiệu với CD71 và ức chế, phong bế, và/hoặc ngăn ngừa sự liên kết của phối tử tự nhiên với CD71 động vật có vú. Theo một số phương án, phối tử tự nhiên của CD71 động vật có vú là transferrin.

Theo một số phương án, MM có hằng số phân ly đối với việc liên kết với AB mà lớn hơn so với hằng số phân ly của AB đối với CD71.

Theo một số phương án, MM có hằng số phân ly đối với việc liên kết với AB mà không lớn hơn so với hằng số phân ly của AB đối với CD71.

Theo một số phương án, MM có hằng số phân ly đối với việc liên kết với AB mà nhỏ hơn so với hằng số phân ly của AB đối với CD71.

Theo một số phương án, hằng số phân ly (K_d) của MM về phía AB không lớn hơn so với 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 lần hoặc lớn hơn, hoặc từ 1 đến 5, từ 5 đến 10, từ 10 đến 100, từ 10 đến 1.000, từ 10 đến 10.000, từ 10 đến 100.000, từ 10 đến 1.000.000, từ 10 đến 10.000.000, từ 100 đến 1.000, từ 100 đến 10.000, từ 100 đến 100.000, từ 100 đến 1.000.000, từ 100 đến 10.000.000, từ 1.000 đến 10.000, từ 1.000 đến 100.000, từ 1.000 đến 1.000.000, từ 1.000 đến 10.000.000, từ 10.000 đến 100.000, từ 10.000 đến 1.000.000, từ 10.000 đến 10.000.000, từ 100.000 đến 1.000.000, hoặc từ 100.000 đến 10.000.000 lần hoặc lớn hơn so với hằng số phân ly của AB về phía đích.

Theo một số phương án, MM không cản trở hoặc cạnh tranh với AB để liên kết với CD71 khi kháng thể có thể hoạt hóa ở tình trạng được phân cắt.

Theo một số phương án, MM là polypeptit có chiều dài nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến 40 axit amin. Theo một số phương án, MM là polypeptit có chiều dài lên đến khoảng 40 axit amin.

Theo một số phương án, trình tự polypeptit MM khác với trình tự polypeptit của CD71. Theo một số phương án, trình tự polypeptit MM tương đồng không lớn hơn 50% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, trình tự polypeptit MM khác với trình tự polypeptit của CD71 và tương đồng không lớn hơn 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, hoặc 10% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB.

Theo một số phương án, việc ghép nối của MM với AB làm giảm khả năng của AB để liên kết CD71 sao cho hằng số phân ly (K_d) của AB khi ghép nối với MM về phía CD71 lớn hơn ít nhất là hai lần so với K_d của AB khi không ghép nối với MM về phía CD71.

Theo một số phương án, việc ghép nối của MM với AB làm giảm khả năng của AB để liên kết CD71 sao cho hằng số phân ly (K_d) của AB khi ghép nối với MM về phía CD71 lớn hơn ít nhất là năm lần so với K_d của AB khi không ghép nối với MM về phía CD71.

Theo một số phương án, việc ghép nối của MM với AB làm giảm khả năng của AB để liên kết CD71 sao cho hằng số phân ly (K_d) của AB khi ghép nối với MM về phía CD71 lớn hơn ít nhất là 10 lần so với K_d của AB khi không ghép nối với MM về phía CD71.

Theo một số phương án, việc ghép nối của MM với AB làm giảm khả năng của AB để liên kết CD71 sao cho hằng số phân ly (K_d) của AB khi ghép nối với MM về phía CD71 lớn hơn ít nhất là 20 lần so với K_d của AB khi không ghép nối với MM về phía CD71.

Theo một số phương án, việc ghép nối của MM với AB làm giảm khả năng của AB để liên kết CD71 sao cho hằng số phân ly (K_d) của AB khi ghép nối với MM về phía CD71 lớn hơn ít nhất là 40 lần so với K_d của AB khi không ghép nối với MM về phía CD71.

Theo một số phương án, việc ghép nối của MM với AB làm giảm khả năng của AB để liên kết CD71 sao cho hằng số phân ly (K_d) của AB khi ghép nối với MM về phía CD71 lớn hơn ít nhất là 100 lần so với K_d của AB khi không ghép nối với MM về phía CD71.

Theo một số phương án, việc ghép nối của MM với AB làm giảm khả năng của AB để liên kết CD71 sao cho hằng số phân ly (K_d) của AB khi ghép nối với MM về phía CD71 lớn hơn ít nhất là 1000 lần so với K_d của AB khi không ghép nối với MM về phía CD71.

Theo một số phương án, việc ghép nối của MM với AB làm giảm khả năng của AB để liên kết CD71 sao cho hằng số phân ly (K_d) của AB khi ghép nối với MM về phía CD71 lớn hơn ít nhất là 10.000 lần so với K_d của AB khi không ghép nối với MM về phía CD71.

Theo một số phương án, trong sự có mặt của CD71, MM làm giảm khả năng của AB để liên kết CD71 bằng ít nhất là 90% khi CM không được phân cắt, khi so với khi CM được phân cắt khi được thử nghiệm *in vitro* bằng cách sử dụng thử nghiệm thay thế đích chẳng hạn như, ví dụ như, thử nghiệm được mô tả trong Công bố PCT số WO 2010/081173, nội dung của chúng được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ.

Theo một số phương án, MM có chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 16 hoặc 18.

Theo một số phương án, proteaza mà phân cắt CM là có hoạt tính, ví dụ như, được điều hòa tăng hoặc theo cách khác không được điều hòa, trong mô bị bệnh, và proteaza phân cắt CM trong kháng thể có thể hoạt hóa khi kháng thể có thể hoạt hóa được bộc lộ ra với proteaza.

Theo một số phương án, proteaza được đồng định vị với CD71 trong mô, và proteaza phân cắt CM trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp khi kháng thể có thể hoạt hóa được bộc lộ ra với proteaza.

Theo một số phương án, CM được định vị trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp sao cho khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, sự liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp vào CD71 được làm giảm để xảy ra với hằng số phân ly

mà lớn hơn ít nhất là hai lần so với hằng số phân ly của việc liên kết AB không được cải biến với CD71, trong khi đó ở trạng thái được phân cắt (tức là, khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái được phân cắt), AB liên kết CD71.

Theo một số phương án, CM được định vị trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp sao cho khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, sự liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa với CD71 được làm giảm để xảy ra với hằng số phân ly mà lớn hơn ít nhất là năm lần so với hằng số phân ly của việc liên kết AB không được cải biến với CD71, trong khi đó ở trạng thái được phân cắt (tức là, khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái được phân cắt), AB liên kết CD71.

Theo một số phương án, CM được định vị trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp sao cho khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, sự liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa với CD71 được làm giảm để xảy ra với hằng số phân ly mà lớn hơn ít nhất là 10 lần so với hằng số phân ly của việc liên kết AB không được cải biến với CD71, trong khi đó ở trạng thái được phân cắt (tức là, khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái được phân cắt), AB liên kết CD71.

Theo một số phương án, CM được định vị trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp sao cho khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, sự liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp vào CD71 được làm giảm để xảy ra với hằng số phân ly mà ít nhất là 20 lần lớn hơn so với hằng số phân ly của việc liên kết AB không được cải biến với CD71, trong khi đó ở trạng thái được phân cắt (tức là, khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái được phân cắt), AB liên kết CD71.

Theo một số phương án, CM được định vị trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp sao cho khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, sự liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp vào CD71 được làm giảm để xảy ra với hằng số phân ly mà lớn hơn ít nhất là 40 lần so với hằng số phân ly của việc liên kết AB không được cải biến với CD71, trong khi đó ở trạng thái được phân cắt, AB liên kết CD71.

Theo một số phương án, CM được định vị trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp sao cho khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, sự liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp vào CD71 được làm giảm để xảy ra với hằng số phân ly mà lớn hơn ít nhất là 50 lần so với hằng số phân ly của việc liên kết AB không được cải biến với CD71, trong khi đó ở trạng thái được phân cắt, AB liên kết CD71.

Theo một số phương án, CM được định vị trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp sao cho khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, sự liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp vào CD71 được làm giảm để xảy ra với hằng số phân ly

mà lớn hơn ít nhất là 100 lần so với hằng số phân ly của việc liên kết AB không được cải biến với CD71, trong khi đó ở trạng thái được phân cắt, AB liên kết CD71.

Theo một số phương án, CM được định vị trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp sao cho khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, sự liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp vào CD71 được làm giảm để xảy ra với hằng số phân ly mà lớn hơn ít nhất là 200 lần so với hằng số phân ly của việc liên kết AB không được cải biến với CD71, trong khi đó ở trạng thái được phân cắt, AB liên kết CD71.

Theo một số phương án, CM là polypeptit có chiều dài lên đến 15 axit amin.

Theo một số phương án, CM là polypeptit mà bao gồm gốc có thể phân cắt thứ nhất (CM1) mà là cơ chất cho ít nhất là một proteaza kim loại nền (MMP) và gốc có thể phân cắt thứ hai (CM2) mà là cơ chất cho ít nhất là một serin proteaza (SP). Theo một số phương án, mỗi trong số trình tự cơ chất CM1 và trình tự cơ chất CM2 của cơ chất CM1-CM2 độc lập là polypeptit có chiều dài lên đến 15 axit amin.

Theo một số phương án, CM là cơ chất cho ít nhất là một proteaza mà là được tin là được điều hòa tăng hoặc theo cách khác không được điều hòa ở bệnh ung thư.

Theo một số phương án, CM là cơ chất cho ít nhất là một proteaza được chọn từ nhóm gồm có proteaza kim loại nền (MMP), thrombin, elastaza bạch cầu trung tính, xystein proteaza, legumain, và serin proteaza, chẳng hạn như matriptaza (MT-SP1), và urokinaza (uPA). Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, người ta tin rằng các proteaza này được điều hòa tăng hoặc theo cách khác không được điều hòa ở ít nhất là một trong số các bệnh ung thư.

Theo một số phương án, CM được chọn để sử dụng với proteaza cụ thể, ví dụ như proteaza mà được biết là được đồng định vị với đích của kháng thể có thể hoạt hóa.

Theo một số phương án, CM là cơ chất cho ít nhất là một MMP. Theo một số phương án, CM là cơ chất cho proteaza được chọn từ nhóm gồm có MMP 9, MMP14, MMP1, MMP3, MMP13, MMP17, MMP11, và MMP19. Theo một số phương án CM là cơ chất cho MMP9. Theo một số phương án, CM là cơ chất cho MMP14.

Theo một số phương án, CM là cơ chất mà bao gồm trình tự TGRGPSWV (SEQ ID NO: 41); SARGPSRW (SEQ ID NO: 42); TARGPSFK (SEQ ID NO: 43); LSGRSDNH (SEQ ID NO: 44); GGWHTGRN (SEQ ID NO: 45); HTGRSGAL (SEQ ID NO: 46); PLTGRSGG (SEQ ID NO: 47); AARGPAIH (SEQ ID NO: 48); RGPAFNPM (SEQ ID NO: 49); SSRGPAYL (SEQ ID NO: 50); RGPATPIM (SEQ ID NO: 51); RGPA (SEQ ID NO: 52); GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 53); FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 54); VHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 55); SPLTGRSG (SEQ ID NO: 56); SAGFSLPA (SEQ ID NO: 57); LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 58); SGGPLGVR (SEQ ID NO: 59); PLGL (SEQ ID NO: 60); LSGRSGNH (SEQ ID NO: 175); SGRSANPRG (SEQ ID NO:

176); LSGRSDDH (SEQ ID NO: 177); LSGRSDIH (SEQ ID NO: 178); LSGRSDQH (SEQ ID NO: 179); LSGRSDTH (SEQ ID NO: 180); LSGRSDYH (SEQ ID NO: 181); LSGRSDNP (SEQ ID NO: 182); LSGRSANP (SEQ ID NO: 183); LSGRSANI (SEQ ID NO: 184); LSGRSDNI (SEQ ID NO: 185); MIAPVAYR (SEQ ID NO: 186); RPSPMWAY (SEQ ID NO: 187); WATPRPMR (SEQ ID NO: 188); FRLLDWQW (SEQ ID NO: 189); ISSGL (SEQ ID NO: 190); ISSGLLS (SEQ ID NO: 191); và/hoặc ISSGLL (SEQ ID NO: 192).

Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LSGRSDNH (SEQ ID NO: 44). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin TGRGPSWV (SEQ ID NO: 41). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin PLTGRSGG (SEQ ID NO: 47). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 53). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 54). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin VHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 55). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin PLGL (SEQ ID NO: 60). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin SARGPSRW (SEQ ID NO: 42). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin TARGPSFK (SEQ ID NO: 43). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin GGWHTGRN (SEQ ID NO: 45). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin HTGRSGAL (SEQ ID NO: 46). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin AARGPAIH (SEQ ID NO: 48). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin RGPAFNPM (SEQ ID NO: 49). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin SSRGPAYL (SEQ ID NO: 50). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin RGPATPIM (SEQ ID NO: 51). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin RGPA (SEQ ID NO: 52). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LSGRSGNH (SEQ ID NO: 175). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin SGRSANPRG (SEQ ID NO: 176). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LSGRSDDH (SEQ ID NO: 177). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LSGRSDIH (SEQ ID NO: 178). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LSGRSDQH (SEQ ID NO: 179). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LSGRSDTH (SEQ ID NO: 180). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LSGRSDYH (SEQ ID NO: 181). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LSGRSDNP (SEQ ID NO: 182). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LSGRSANP (SEQ ID NO: 183). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LSGRSANI (SEQ ID NO: 184). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LSGRSDNI (SEQ ID NO: 185). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin MIAPVAYR (SEQ ID NO: 186). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin RPSPMWAY (SEQ ID NO: 187). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin

WATPRPMR (SEQ ID NO: 188). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin FRLLDWQW (SEQ ID NO: 189). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin ISSGL (SEQ ID NO: 190). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin ISSGLLS (SEQ ID NO: 191). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin và/hoặc ISSGLL (SEQ ID NO: 192).

Theo một số phương án, CM là cơ chất cho MMP và bao gồm trình tự ISSGLSS (SEQ ID NO: 61); QNQALRMA (SEQ ID NO: 62); AQNLLGMV (SEQ ID NO: 63); STFPFGMF (SEQ ID NO: 64); PVGYTSSL (SEQ ID NO: 65); DWLYWPGI (SEQ ID NO: 66), ISSGLLSS (SEQ ID NO: 67), LKAAPRWA (SEQ ID NO: 68); GPSHLVLT (SEQ ID NO: 69); LPGGLSPW (SEQ ID NO: 70); MGLFSEAG (SEQ ID NO: 71); SPLPLRVP (SEQ ID NO: 72); RMHLRSLG (SEQ ID NO: 73); LAAPLGLL (SEQ ID NO: 74); AVGLLAPP (SEQ ID NO: 75); LLAPSHRA (SEQ ID NO: 76); và/hoặc PAGLWLDP (SEQ ID NO: 77).

Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin ISSGLSS (SEQ ID NO: 61). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin QNQALRMA (SEQ ID NO: 62). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin AQNLLGMV (SEQ ID NO: 63). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin STFPFGMF (SEQ ID NO: 64). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin PVGYTSSL (SEQ ID NO: 65). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin DWLYWPGI (SEQ ID NO: 66). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin ISSGLLSS (SEQ ID NO: 67). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LKAAPRWA (SEQ ID NO: 68). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin GPSHLVLT (SEQ ID NO: 69). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LPGGLSPW (SEQ ID NO: 70). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin MGLFSEAG (SEQ ID NO: 71). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin SPLPLRVP (SEQ ID NO: 72). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin RMHLRSLG (SEQ ID NO: 73). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LAAPLGLL (SEQ ID NO: 74). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin AVGLLAPP (SEQ ID NO: 75). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin LLAPSHRA (SEQ ID NO: 76). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin PAGLWLDP (SEQ ID NO: 77).

Theo một số phương án, CM là cơ chất cho thrombin. Theo một số phương án, CM là cơ chất cho thrombin và bao gồm trình tự GPRSFGL (SEQ ID NO: 78) hoặc GPRSFG (SEQ ID NO: 79). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin GPRSFGL (SEQ ID NO: 78). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin GPRSFG (SEQ ID NO: 79).

Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 80); NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 81); TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 82); TSGRSANP (SEQ ID NO: 83); VAGRSMRP (SEQ ID NO: 84); VVPEGRRS (SEQ ID NO: 85); ILPRSPAF (SEQ ID NO: 86); MVLGRSLL (SEQ ID NO: 87); QGRAITFI (SEQ ID NO: 88); SPRSIMLA (SEQ ID NO: 89); và SMLRSMPL (SEQ ID NO: 90).

Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 80). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 81). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 82). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin TSGRSANP (SEQ ID NO: 83). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin VAGRSMRP (SEQ ID NO: 84). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin VVPEGRRS (SEQ ID NO: 85). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin ILPRSPAF (SEQ ID NO: 86). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin MVLGRSLL (SEQ ID NO: 87). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin QGRAITFI (SEQ ID NO: 88). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin SPRSIMLA (SEQ ID NO: 89). Theo một số phương án, CM có chứa trình tự axit amin SMLRSMPL (SEQ ID NO: 90).

Theo một số phương án, CM là cơ chất cho elastaza bạch cầu trung tính. Theo một số phương án, CM là cơ chất cho serin proteaza. Theo một số phương án, CM là cơ chất cho uPA. Theo một số phương án, CM là cơ chất cho legumain. Theo một số phương án, CM là cơ chất cho matriptaza. Theo một số phương án, CM là cơ chất cho xystein proteaza. Theo một số phương án, CM là cơ chất cho xystein proteaza, chẳng hạn như cathepsin.

Theo một số phương án, CM là cơ chất CM1-CM2 và bao gồm trình tự ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 91); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 92); AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 93); TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 94); VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 95); TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 96); AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 97); LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 98); VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 99); LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 100); LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 101); LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 102); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 103); LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 104); QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 105); LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 106); QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 107); ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 108); ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 148); AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 149);

AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 150); ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 151); ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 152); ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 153); ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 154); ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 155); ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 156); ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 157); ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 158); AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 159); AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 160); AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 161); AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 162); AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 163); AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 164); AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 165); AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 166), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 171); AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 172); GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 193); và/hoặc GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 194).

Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 91), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2001. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 92), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 1001/LP′/0001, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GGSGGS (SEQ ID NO: 205). Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 93), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2015 và/hoặc cơ chất 1004/LP′/0003, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GG. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 94), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 0003/LP′/1004, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GG. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 95), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 1003/LP′/0003, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GG. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 96), mà còn được đề cập đến trọng bản mô tả này dưới dạng cơ chất 0003/LP′/1003, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GG. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 97), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 3001 và/hoặc cơ chất 1004/LP′/0001, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GG. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 98), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 0001/LP′/1004, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GG. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự

VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 99), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 1003/LP'/0001, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GG. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 100), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 0001/LP′/1003, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GG. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 101), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 0001/LP′/1001, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GGSGGS (SEQ ID NO: 205). Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 102), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 0002/LP′/1001, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GGSGGS (SEQ ID NO: 205). Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 103), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 1001/LP′/0002, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GGSGGS (SEQ ID NO: 205). Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 104), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 0001/LP′/1002, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GGSGGS (SEQ ID NO: 205). Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 105), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 1002/LP′/0001, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GGSGGS (SEQ ID NO: 205). Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA (SEQ ID NO: 106), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 0002/LP′/1002, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GGSGGS (SEQ ID NO: 205). Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 107), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 1002/LP′/0002, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GGSGGS (SEQ ID NO: 205). Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 108), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2002. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 148), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2003. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 149), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2004. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 150), mà còn được đề cập đến trong bản

mô tả này dưới dạng cơ chất 2005. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 151), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2006. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 152), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2007. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 153), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2008. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 154), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2009. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 155), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2010. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 156), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2011. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 157), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2012. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 158), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2013. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 159), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 3006. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 160), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 3007. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 161), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 3008. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 162), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 3009. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 163), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 3010. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 164), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 3011. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 165), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 3012. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 166), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 3013. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 171), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 2014. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 172), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới

dạng cơ chất 3014. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 193), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 0001/LP′/1004, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GG. Theo một số phương án, cơ chất CM1-CM2 bao gồm trình tự GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 194), mà còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng cơ chất 0001/LP′/1003, trong đó LP′ như dùng trong cơ chất CM1-CM2 này là trình tự axit amin GG.

Theo một số phương án, CM là cơ chất cho ít nhất là hai proteaza. Theo một số phương án, CM là cơ chất cho ít nhất là hai proteaza được chọn từ nhóm gồm có MMP, thrombin, elastaza bạch cầu trung tính, xystein proteaza, uPA, legumain và matriptaza.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp bao gồm ít nhất là CM thứ nhất và CM thứ hai. Theo một số phương án, mỗi CM thứ nhất và CM thứ hai là polypeptit dài không nhiều hơn 15 axit amin. Theo một số phương án, CM thứ nhất và CM thứ hai trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt có sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM1-CM2-AB hoặc AB-CM2-CM1-MM. Theo một số phương án, ít nhất là một của CM thứ nhất và CM thứ hai là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza được chọn từ nhóm gồm có MMP, thrombin, elastaza bạch cầu trung tính, xystein proteaza, uPA, legumain, và matriptaza. Theo một số phương án, CM thứ nhất được phân cắt bằng tác nhân phân cắt thứ nhất được chọn từ nhóm gồm có MMP, thrombin, elastaza bạch cầu trung tính, xystein proteaza, uPA, legumain, và matriptaza trong mô đích và CM thứ hai được phân cắt bằng tác nhân phân cắt thứ hai trong mô đích. Theo một số phương án, proteaza khác được chọn từ nhóm gồm có các proteaza được thể hiện trong Bảng (I). Theo một số phương án, tác nhân phân cắt thứ nhất và tác nhân phân cắt thứ hai là cùng proteaza được chọn từ nhóm gồm có MMP, thrombin, elastaza bạch cầu trung tính, xystein proteaza, uPA, legumain, và matriptaza, và CM thứ nhất và CM thứ hai là các cơ chất khác nhau đối với enzym này. Theo một số phương án, tác nhân phân cắt thứ nhất và tác nhân phân cắt thứ hai là cùng proteaza được chọn từ nhóm gồm có các proteaza được thể hiện trong Bảng (I). Theo một số phương án, tác nhân phân cắt thứ nhất và tác nhân phân cắt thứ hai là các proteaza khác nhau. Theo một số phương án, tác nhân phân cắt thứ nhất và tác nhân phân cắt thứ hai được đồng định vị trong mô đích. Theo một số phương án, CM thứ nhất và CM thứ hai được phân cắt bằng ít nhất là một tác nhân phân cắt trong mô đích.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được bộc lộ ra với và được phân cắt bằng proteaza sao cho, ở trạng thái được hoạt hóa hoặc được phân cắt, kháng thể được hoạt hóa được liên hợp bao gồm trình tự axit amin chuỗi nhẹ mà bao gồm ít nhất là một phần của trình tự LP2 và/hoặc CM sau khi proteaza đã phân cắt CM.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp vào một hoặc nhiều đương lượng của tác nhân. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp vào một đương lượng của tác nhân. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp vào hai, ba, hoặc bốn đương lượng của tác nhân. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa là một phần của hỗn hợp của kháng thể có thể hoạt hóa có số lượng đồng nhất của đương lượng của các tác nhân được liên hợp. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa là một phần của hỗn hợp của kháng thể có thể hoạt hóa có số lượng không đồng nhất của đương lượng của các tác nhân được liên hợp. Theo một số phương án, hỗn hợp của kháng thể có thể hoạt hóa là hỗn hợp sao cho số lượng trung bình của các tác nhân được liên hợp vào mỗi kháng thể có thể hoạt hóa nằm trong khoảng từ không đến một, từ một đến hai, từ hai đến ba, hoặc từ ba đến bốn. Theo một số phương án, hỗn hợp của kháng thể có thể hoạt hóa là hỗn hợp sao cho số lượng trung bình của các tác nhân được liên hợp vào mỗi kháng thể có thể hoạt hóa là một, hai, ba, hoặc bốn.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa một hoặc nhiều cải biến trình tự axit amin đặc hiệu vị trí sao cho số lượng của gốc lysin và/hoặc xystein được tăng lên hoặc được giảm đi đối với trình tự axit amin ban đầu của kháng thể có thể hoạt hóa, do đó theo một số phương án số lượng tăng hoặc giảm tương ứng của các tác nhân mà có thể được liên hợp vào kháng thể có thể hoạt hóa, hoặc theo một số phương án làm hạn chế sự liên hợp của các tác nhân với kháng thể có thể hoạt hóa theo phương thức đặc hiệu vị trí. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa đã cải biến được cải biến bằng một hoặc nhiều axit amin không tự nhiên theo phương thức đặc hiệu vị trí, do đó theo một số phương án làm hạn chế sự liên hợp của các tác nhân với chỉ các vị trí của axit amin không tự nhiên.

Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể có chứa phân tử thuốc và gốc kháng thể ở các tỉ lệ mol tỉ lượng khác nhau tùy thuộc vào cấu hình của kháng thể và, ít nhất là một phần, tùy thuộc vào phương pháp dùng để đem lại sự liên hợp.

Thuật ngữ "tải lượng thuốc" hoặc "tải thuốc" dùng để chỉ tỉ lệ mol của phân tử thuốc trong mỗi kháng thể trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp riêng lẻ. Theo các phương án nhất định tải lượng thuốc có thể có chứa từ 1 đến 4 phân tử thuốc, từ 2 đến 4 phân tử thuốc, từ 1 đến 3 phân tử thuốc, từ 2 đến 3 phân tử thuốc, hoặc từ 1 đến 2 phân tử thuốc. Theo các phương án nhất định tải lượng thuốc có thể có chứa 1 phân tử thuốc, 2 phân tử thuốc, 3 phân tử thuốc, hoặc 4 phân tử thuốc.

Để đạt được mục đích của sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng "tải lượng thuốc" và "tỉ lệ thuốc với kháng thể" (cũng được đề cập đến dưới dạng DAR) không giống nhau. DAR dùng để chỉ tỉ lệ mol trung bình của phân tử thuốc trong mỗi kháng thể trong quần thể của ít nhất là hai phân tử kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp, trong khi đó tải lượng

thuốc dùng để chỉ tỉ lệ mol của phân tử thuốc trong mỗi kháng thể trong phân tử kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp riêng lẻ. Tải lượng thuốc chủ yếu có liên quan đến sự xây dựng và thiết kế của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp, trong khi đó DAR chủ yếu có liên quan đến dược phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trị liệu mà sẽ được dùng cho bệnh nhân.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế có thể được liên hợp để tạo ra chế phẩm tương đối đồng nhất của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có sự phân bố DAR hẹp. Theo một số phương án, chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có thể về cơ bản đồng nhất đối với sự phân bố DAR của nó, có nghĩa là ở trong chế phẩm là các loại nổi trội của ADC đặc hiệu vị trí với DAR cụ thể (ví dụ như, DAR bằng 2 và/hoặc 4). Theo một số phương án, chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp về cơ bản đồng nhất cũng có thể là đồng đều đối với vị trí tải (tức là, trên xystein tự do).

Theo một số phương án, DAR của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế là khoảng 2 và/hoặc 4. Trong ngữ cảnh này, thuật ngữ "khoảng" cần được hiểu có nghĩa là chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp chứa lớn hơn 80% của hai loại chính trong khối kết tụ có DAR bằng 2 và 4 với sự phân bố gần như ngang bằng (ví dụ như, lớn hơn 40% mỗi loại), và phần còn lại gồm có các loại DAR khác.

Theo một số phương án, DAR của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế sẽ được làm giàu đến khoảng 2. Trong ngữ cảnh này, thuật ngữ "khoảng" cần được hiểu có nghĩa là chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp chứa lớn hơn khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% ± 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9%.

Theo một số phương án, DAR của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế sẽ được làm giàu đến khoảng 2, với thuật ngữ "khoảng" được hiểu có nghĩa là chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp chứa lớn hơn khoảng 94% ± 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9%.

Theo một số phương án, DAR của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế sẽ được làm giàu đến khoảng 2, với thuật ngữ "khoảng" được hiểu có nghĩa là chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp chứa lớn hơn khoảng 95% ± 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9%.

Theo một số phương án, DAR của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế sẽ được làm giàu đến khoảng 2, với thuật ngữ "khoảng" được hiểu có nghĩa là chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp chứa lớn hơn khoảng 96% ± 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9%.

Theo một số phương án, DAR của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế sẽ được làm giàu đến khoảng 2, với thuật ngữ "khoảng" được hiểu có nghĩa là chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp chứa lớn hơn khoảng 97% ± 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9%.

Theo một số phương án, DAR của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế sẽ được làm giàu đến khoảng 2, với thuật ngữ "khoảng" được hiểu có nghĩa là chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp chứa lớn hơn khoảng 98% ± 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9%.

Theo một số phương án, DAR của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế sẽ được làm giàu đến khoảng 2, với thuật ngữ "khoảng" được hiểu có nghĩa là chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp chứa lớn hơn khoảng 99% ± 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9%.

Theo một số phương án, DAR của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế là khoảng 2 và/hoặc 4. Trong ngữ cảnh này, thuật ngữ "khoảng" cần được hiểu có nghĩa là chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp chứa lớn hơn 80% của hai loại chính trong khối kết tụ có DAR bằng 2 và 4 với sự phân bố gần như ngang bằng (ví dụ như, lớn hơn 40% mỗi loại), và phần còn lại gồm có các loại DAR khác.

Theo một số phương án, có thể đạt được độ đồng nhất mong muốn thông qua việc sử dụng kháng thể có thể hoạt hóa đặc hiệu vị trí và/hoặc sự khử chọn lọc và sự liên hợp. Theo một số phương án, độ đồng nhất mong muốn có thể đạt được thông qua việc sử dụng cấu trúc đặc hiệu vị trí kết hợp với sự khử chọn lọc. Theo một số phương án, chế phẩm có thể được tinh chế thêm, chẳng hạn như bằng cách sử dụng cá kỹ thuật sắc ký phân tích hoặc điều chế. Theo các phương án này, độ đồng nhất của chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có thể được phân tích bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực bao gồm nhưng không bị giới hạn ở khối phổ, HPLC (ví dụ như HPLC loại trừ kích thước, RP-HPLC, HIC-HPLC v.v.) hoặc điện di mao quản.

Đối với việc tinh chế chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp, rõ ràng rằng các phương pháp điều chế dược phẩm tiêu chuẩn có thể được sử dụng để thu được độ tinh khiết mong muốn. Như thảo luận trong bản mô tả này phương pháp sắc ký lỏng chẳng hạn như pha đảo (RP) và sắc ký tương tác kị nước (HIC) có thể tách hợp chất trong hỗn hợp bằng giá trị tải thuốc. Trong một số trường hợp, sắc ký trao đổi ion (IEC) hoặc phương thức hỗn hợp (MMC) cũng có thể được sử dụng để phân lập các loại có tải thuốc cụ thể.

Theo một số phương án, chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có DAR đã định với mức tương đối cao của độ đồng nhất tải lượng thuốc trên thực tế có thể chứa hỗn hợp của các thể liên hợp với khoảng giá trị hoặc sự phân bố của tải lượng thuốc, nhưng trong đó sự phân bố của tải lượng thuốc trong hỗn hợp được tập trung xung quanh (hoặc có trung bình trọng số bằng) giá trị DAR trung bình. Do đó, theo một số phương án chế phẩm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp sẽ bao gồm hỗn hợp của các thể liên hợp trong đó DAR trung bình của hỗn hợp là khoảng 1, 2, hoặc 3, mỗi giá trị +/-0,5. Rõ ràng rằng khoảng giá trị hoặc độ lệch có thể nhỏ hơn

0,4 theo phương án được ưu tiên nhất định. Do đó, theo phương án khác hợp phần có chứa DAR trung bình bằng 1, 2, hoặc 3, mỗi giá trị +/-0,3.

Theo một số phương án, sự phân bố của thuốc trong mỗi kháng thể trong chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp từ phản ứng liên hợp có thể được xác định đặc điểm bằng các phương tiện thông thường chẳng hạn như đo quang phổ UV-Vis, HPLC pha đảo, HIC, phép đo phổ khối, ELISA, và điện di.

Theo một số phương án, hỗn hợp của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế mà bao gồm hỗn hợp của các thể liên hợp có tải lượng thuốc khác nhau có thể được tinh chế hoặc được làm giàu đối với một hoặc nhiều loại của thể liên hợp có tải lượng thuốc cụ thể. Ví dụ như, hỗn hợp kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà bao gồm hỗn hợp của AADC có tải lượng thuốc bằng 0, 2, 4, 6, và 8 có thể được làm giàu hoặc được tinh chế đối với kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có tải lượng thuốc bằng 2. Theo một số phương án, hỗn hợp có thể được tinh chế hoặc được làm giàu chỉ đối với các loại của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có tải lượng thuốc bằng 4. Theo một số phương án, hỗn hợp có thể được tinh chế hoặc được làm giàu đối với chỉ loại của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có tải lượng thuốc bằng 2 và 4. Như dùng trong bản mô tả này, chế phẩm hoặc dạng tinh chế hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chế phẩm tương đối đồng nhất của các loài của thể liên hợp loại có tải lượng thuốc bằng 2 được đề cập đến dưới dạng "E2", mà có DAR bằng khoảng 2. Như dùng trong bản mô tả này, chế phẩm hoặc dạng tinh chế hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chế phẩm tương đối đồng nhất của thể liên hợp loại có tải lượng thuốc bằng 4 được đề cập đến dưới dạng "E4". Như dùng trong bản mô tả này, chế phẩm hoặc dạng tinh chế hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có hỗn hợp của thể liên hợp loại có tải lượng thuốc bằng 2 hoặc 4 được đề cập đến dưới dạng "DE" (được làm giàu DAR), có DAR bằng xấp xỉ 3. Trong ngữ cảnh này, thuật ngữ "khoảng" được hiểu có nghĩa là +/- 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 hoặc 1,0 của lượng đặt ra.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có thể được thể hiện bằng công thức:

$AA-(AG)_p$

trong đó AA là kháng thể có thể hoạt hóa mà có, ở trạng thái không được phân cắt, sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C là MM-CM-AB. AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 động vật có vú và bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 5 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 7. MM là gốc che giấu mà bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 18, và MM được ghép nối với AB và ức chế sự liên kết của AB với CD71 khi AA ở trạng thái không được phân cắt. CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, CM được ghép nối với

AB, và CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza. AG là tác nhân được liên hợp vào AA, trong đó AA-$(AG)_p$. Theo một số phương án, p bằng 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8. Theo một số phương án, hợp phần theo sáng chế bao gồm hỗn hợp của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế, trong đó mỗi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được thể hiện bằng công thức AA-$(AG)_p$, trong đó p là số nguyên từ 0 đến 8. Theo một số phương án, hợp phần bao gồm hỗn hợp của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế trong đó ít nhất là 50%, ít nhất là 75%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 98% của các loại này là kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó p bằng 2.

Theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà được tinh chế hoặc được làm giàu đối với loại nhất định của thể liên hợp với tải lượng thuốc cụ thể bao gồm ít nhất là tỉ lệ phần trăm nhất định của loại tải lượng thuốc nhất định. Ví dụ như, theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít nhất là 50% của chế phẩm là kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có tải lượng thuốc bằng 2. Theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít nhất là 75% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có tải lượng thuốc bằng 2. Theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít nhất là 85% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có tải lượng thuốc bằng 2. Theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít nhất là 90% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có tải lượng thuốc bằng 2. Theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít nhất là 95% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có tải lượng thuốc bằng 2. Theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít nhất là 98% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có tải lượng thuốc bằng 2.

Theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà được tinh chế hoặc được làm giàu đối với loại tải lượng thuốc nhất định bao gồm nhiều đương lượng mol hơn của loại tải lượng thuốc nhất định so với tổng đương lượng mol của tất cả các loại tải lượng thuốc khác được kết hợp. Ví dụ như, theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 là sao cho đương lượng được kết hợp của mỗi trong số các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần trong đó tải lượng thuốc không phải là 2 nhỏ hơn so với đương lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp với tải lượng thuốc bằng 2. Theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E4 là sao cho đương lượng được kết hợp của mỗi trong số các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần trong đó tải lượng thuốc không phải là 4 nhỏ hơn so với đương lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp với tải lượng thuốc bằng 4. Theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt

hóa được liên hợp DE là sao cho đương lượng được kết hợp của mỗi trong số các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần trong đó tải lượng thuốc không phải là 2 hoặc 4 nhỏ hơn so với đương lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà có tải lượng thuốc bằng 2 hoặc 4.

Theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà được tinh chế hoặc được làm giàu đối với loại DAR nhất định (ví dụ như E2 hoặc E4, như thảo luận trong bản mô tả này) bao gồm ít hơn tỉ lệ phần trăm nhất định của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà không phải là loại tải lượng thuốc nhất định. Ví dụ như, theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít hơn 50% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà không phải là loại tải lượng thuốc bằng 2. Ví dụ như, theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít hơn 25% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà không phải là loại tải lượng thuốc bằng 2. Ví dụ như, theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít hơn 15% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà không phải là loại tải lượng thuốc bằng 2. Ví dụ như, theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít hơn 10% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà không phải là loại tải lượng thuốc bằng 2. Ví dụ như, theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít hơn 5% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà không phải là loại tải lượng thuốc bằng 2. Ví dụ như, theo một số phương án, chế phẩm của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp E2 bao gồm ít hơn 2% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà không phải là loại tải lượng thuốc bằng 2. Theo một số phương án khác, hoặc chế phẩm được làm giàu hoặc được tinh chế (ví dụ như E4 hoặc DE) có thể có ít hơn 50%, ít hơn 25%, ít hơn 15%, ít hơn 10%, ít hơn 5%, hoặc ít hơn 2% mà không phải là loại tải lượng thuốc tương ứng trong hợp phần kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được làm giàu hoặc được tinh chế.

Theo một số phương án, tác nhân là tác nhân kháng-viêm.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp còn bao gồm gốc có thể phát hiện được. Theo một số phương án, gốc có thể phát hiện được là tác nhân chẩn đoán.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp còn bao gồm peptit tín hiệu. Theo một số phương án, peptit tín hiệu được liên hợp vào kháng thể có thể hoạt hóa thông qua đoạn đệm. Theo một số phương án, đoạn đệm được liên hợp vào kháng thể có thể hoạt hóa khi không có mặt peptit tín hiệu. Theo một số phương án, đoạn đệm được kết hợp trực tiếp vào MM của kháng thể có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, đoạn đệm được kết hợp trực tiếp vào MM của kháng thể có thể hoạt hóa trong sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C là đoạn đệm-MM-CM-AB. Ví dụ về đoạn đệm kết hợp trực tiếp vào đầu tận cùng N của MM của kháng thể có

thể hoạt hóa là QGQSGQ (SEQ ID NO: 109). Các ví dụ khác về đoạn đệm kết hợp trực tiếp vào đầu tận cùng N của MM của kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm QGQSGQG (SEQ ID NO: 138), QGQSG (SEQ ID NO: 139), QGQS (SEQ ID NO: 140), QGQ, QG, và Q. Các ví dụ khác về đoạn đệm kết hợp trực tiếp vào đầu tận cùng N của MM của kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm GQSGQG (SEQ ID NO: 143), QSGQG (SEQ ID NO: 144), SGQG (SEQ ID NO: 145), GQG, và G. Theo một số phương án, không đoạn đệm nào được kết hợp vào đầu tận cùng N của MM. Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là trình tự axit amin QGQSGQ (SEQ ID NO: 109). Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là trình tự axit amin QGQSGQG (SEQ ID NO: 138). Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là trình tự axit amin QGQSG (SEQ ID NO: 139). Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là trình tự axit amin QGQS (SEQ ID NO: 140). Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là trình tự axit amin QGQ. Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là trình tự axit amin QG. Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là gốc axit amin Q. Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là trình tự axit amin GQSGQG (SEQ ID NO: 143). Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là trình tự axit amin QSGQG (SEQ ID NO: 144). Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là trình tự axit amin SGQG (SEQ ID NO: 145). Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là trình tự axit amin GQG. Theo một số phương án, đoạn đệm bao gồm ít nhất là trình tự axit amin G. Theo một số phương án, đoạn đệm không có mặt.

Theo một số phương án, AB của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp một cách tự nhiên chứa một hoặc nhiều liên kết đisulfua. Theo một số phương án, AB có thể được thiết kế để bao gồm một hoặc nhiều liên kết đisulfua.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 5, và trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit

nucleic mã hóa cho trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự axit nucleic mà có chứa trình tự axit nucleic mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 5, và trình tự axit nucleic mà tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% đối với trình tự axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 7.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế bằng cách nuôi cấy tế bào trong điều kiện mà dẫn đến sự biểu hiện của kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó tế bào có chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế hoặc vectơ theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa mà, ở trạng thái được hoạt hóa, liên kết CD71, phương pháp này có chứa bước: (a) nuôi cấy tế bào có chứa cấu trúc axit nucleic mà mã hóa cho kháng thể có thể hoạt hóa trong điều kiện mà dẫn đến sự biểu hiện của kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế; và (b) thu hồi kháng thể có thể hoạt hóa.

Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp lâu hơn so với thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể tương ứng; ví dụ như, pK của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp lâu hơn so với pK của kháng thể tương ứng. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp tương tự với thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể tương ứng. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ít nhất là 15 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ít nhất là 12 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ít nhất là 11 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ít nhất là 10 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ít nhất là 9 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ít nhất là 8 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số

phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ít nhất là 7 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 6 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 5 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 4 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 3 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 2 ngày khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 24 giờ khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 20 giờ khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 18 giờ khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 16 giờ khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 14 giờ khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 12 giờ khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 10 giờ khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 8 giờ khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 6 giờ khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 4 giờ khi dùng cho sinh vật. Theo một số phương án, thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể có thể hoạt hóa ít nhất là 3 giờ khi dùng cho sinh vật.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể kháng-CD71 và/hoặc polypeptit kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa bằng cách nuôi cấy tế bào trong điều kiện mà dẫn đến sự biểu hiện của polypeptit, trong đó tế bào có chứa phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa cho kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được mô tả trong bản mô tả này, và/hoặc vectơ mà bao gồm các trình tự axit nucleic được phân lập này. Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa bằng cách nuôi cấy tế bào trong điều kiện mà dẫn đến sự biểu hiện của kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó tế bào có chứa phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa cho kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được mô tả trong bản mô tả này, và/hoặc vectơ mà bao gồm các trình tự axit nucleic được phân lập này.

Sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa, làm trì hoãn sự tiến triển, điều trị, làm nhẹ bớt triệu chứng của, hoặc theo cách khác làm cho tốt hơn bệnh qua trung gian CD71 ở đối tượng bằng

cách dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp được mô tả trong bản mô tả này cho đối tượng cần chúng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ngăn ngừa, làm trì hoãn sự tiến triển, điều trị, làm nhẹ bớt triệu chứng của, hoặc theo cách khác làm cho tốt hơn bệnh ung thư ở đối tượng bằng cách dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp được mô tả trong bản mô tả này cho đối tượng cần chúng. CD71 được biết là được biểu hiện trong nhiều bệnh ung thư, chẳng hạn như, để làm ví dụ mà không làm giới hạn sáng chế, ung thư biểu mô tuyến, bệnh ung thư ống mật (mật), bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, ví dụ như, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính và bệnh ung thư vú âm tính Her2; bệnh ung thư carcinoid; bệnh ung thư cổ tử cung; ung thư đường mật; kết trực tràng; nội mạc tử cung; u thần kinh đệm; bệnh ung thư đầu và cổ, ví dụ như, bệnh ung thư tế bào vảy đầu và cổ; bệnh bạch cầu; bệnh ung thư gan; bệnh ung thư phổi, ví dụ như, NSCLC, SCLC; u lympho; u melanin; bệnh ung thư miệng hầu; bệnh ung thư buồng trứng; bệnh ung thư tụy; bệnh ung thư tuyến tiền liệt, *ví dụ như*, ung thư biểu mô tuyến tiền liệt kháng thiến di căn; bệnh ung thư thận; bệnh ung thư da; bệnh ung thư tế bào vảy, bệnh ung thư dạ dày; bệnh ung thư tinh hoàn; bệnh ung thư tuyến giáp; và bệnh ung thư đường tiết niệu.

Theo một số phương án, bệnh ung thư được kết hợp với khối u biểu hiện CD71. Theo một số phương án, bệnh ung thư là do khối u biểu hiện CD71.

Kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp dùng trong phương án bất kỳ của các phương pháp và việc sử dụng này có thể được dùng ở giai đoạn bất kỳ của bệnh. Ví dụ như, kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp này có thể được dùng cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư ở giai đoạn bất kỳ, từ sớm đến di căn. Các thuật ngữ đối tượng và bệnh nhân được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, đối tượng là động vật có vú, chẳng hạn như người hoặc động vật linh trưởng không phải là người.

Kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp và chế phẩm trị liệu của chúng được dùng cho đối tượng mắc hoặc dễ mắc bệnh hoặc rối loạn kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bất thường. Đối tượng mắc hoặc dễ mắc bệnh hoặc rối loạn kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bất thường được xác định bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ như, đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc tình trạng có khối u khác được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm lâm sàng và/hoặc trong phòng thí nghiệm chẳng hạn như, kiểm tra sức khỏe và phân tích máu, nước tiểu và/hoặc phân để đánh giá tình trạng sức khỏe. Ví dụ như, đối tượng mắc viêm và/hoặc rối loạn viêm được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm lâm sàng

và/hoặc trong phòng thí nghiệm chẳng hạn như kiểm tra sức khỏe và/hoặc phân tích dịch cơ thể, ví dụ như, phân tích máu, nước tiểu và/hoặc phân, để đánh giá tình trạng sức khỏe.

Việc dùng kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp cho bệnh nhân mắc từ bệnh hoặc rối loạn kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bất thường được coi là thành công nếu đạt được mục tiêu bất kỳ nhiều mục tiêu phòng thí nghiệm hoặc lâm sàng. Ví dụ như, việc dùng kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp cho bệnh nhân mắc từ bệnh hoặc rối loạn kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bất thường được coi là thành công nếu một hoặc nhiều triệu chứng kết hợp với bệnh hoặc rối loạn được làm nhẹ bớt, được làm giảm, được ức chế hoặc không tiến triển thành tình trạng tiếp theo, *tức là*, xấu hơn. Việc dùng kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp cho bệnh nhân mắc từ bệnh hoặc rối loạn kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bất thường được coi là thành công nếu bệnh hoặc rối loạn tiến đến thuyên giảm hoặc không tiến triển thành tình trạng tiếp theo, *tức là*, xấu hơn.

Theo một số phương án, kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp và chế phẩm trị liệu của chúng được dùng cho đối tượng mắc hoặc dễ mắc bệnh hoặc rối loạn, chẳng hạn như đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc tình trạng có khối u khác, trong đó tế bào bị bệnh của đối tượng biểu hiện CD71. Theo một số phương án, tế bào bị bệnh được kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bất thường. Theo một số phương án, tế bào bị bệnh được kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bình thường. Đối tượng mắc hoặc dễ mắc bệnh hoặc rối loạn trong đó tế bào bị bệnh của đối tượng biểu hiện CD71 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ như, đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc tình trạng có khối u khác được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm lâm sàng và/hoặc trong phòng thí nghiệm chẳng hạn như, kiểm tra sức khỏe và phân tích máu, nước tiểu và/hoặc phân để đánh giá tình trạng sức khỏe. Ví dụ như, đối tượng mắc viêm và/hoặc rối loạn viêm được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm lâm sàng và/hoặc trong phòng thí nghiệm chẳng hạn như kiểm tra sức khỏe và/hoặc phân tích dịch cơ thể, ví dụ như, phân tích máu, nước tiểu và/hoặc phân, để đánh giá tình trạng sức khỏe.

Theo một số phương án, kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp và chế phẩm trị liệu của chúng được dùng cho đối tượng mắc hoặc dễ mắc bệnh hoặc rối loạn kết hợp với tế bào biểu hiện CD71 hoặc sự có mặt, sự phát triển, sự tăng sinh, sự di căn, và/hoặc hoạt tính của tế bào này, chẳng hạn như đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc tình trạng có khối u khác. Theo một số phương án, tế bào được kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bất thường. Theo một số phương án, tế bào được kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD71 bình thường. Đối tượng mắc hoặc dễ mắc bệnh hoặc rối loạn kết hợp với tế bào mà biểu hiện CD71 được xác định bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ như,

đối tượng mắc bệnh ung thư hoặc tình trạng có khối u khác được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm lâm sàng và/hoặc trong phòng thí nghiệm chẳng hạn như, kiểm tra sức khỏe và phân tích máu, nước tiểu và/hoặc phân để đánh giá tình trạng sức khỏe. Ví dụ như, đối tượng mắc viêm và/hoặc rối loạn viêm được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm lâm sàng và/hoặc trong phòng thí nghiệm chẳng hạn như kiểm tra sức khỏe và/hoặc phân tích dịch cơ thể, ví dụ như, phân tích máu, nước tiểu và/hoặc phân, để đánh giá tình trạng sức khỏe.

Việc dùng kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp cho bệnh nhân mắc từ bệnh hoặc rối loạn kết hợp với tế bào biểu hiện CD71 được coi là thành công nếu đạt được mục tiêu bất kỳ nhiều mục tiêu phòng thí nghiệm hoặc lâm sàng. Ví dụ như, việc dùng kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp cho bệnh nhân mắc từ bệnh hoặc rối loạn kết hợp với tế bào biểu hiện CD71 được coi là thành công nếu một hoặc nhiều triệu chứng kết hợp với bệnh hoặc rối loạn được làm nhẹ bớt, được làm giảm, được ức chế hoặc không tiến triển thành tình trạng tiếp theo, *tức là*, xấu hơn. Việc dùng kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp cho bệnh nhân mắc từ bệnh hoặc rối loạn kết hợp với tế bào biểu hiện CD71 được coi là thành công nếu bệnh hoặc rối loạn tiến đến thuyên giảm hoặc không tiến triển thành tình trạng tiếp theo, *tức là*, xấu hơn.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị, làm nhẹ bớt triệu chứng của, hoặc làm trì hoãn sự tiến triển của rối loạn hoặc bệnh trong đó tế bào bị bệnh biểu hiện CD71 có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể được liên hợp theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể được liên hợp theo sáng chế cho đối tượng cần chúng. Theo một số phương án, rối loạn hoặc bệnh là bệnh ung thư.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị, làm nhẹ bớt triệu chứng của, hoặc làm trì hoãn sự tiến triển của rối loạn hoặc bệnh kết hợp với tế bào biểu hiện CD71 có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể được liên hợp theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa dược phẩm có chứa kháng thể được liên hợp theo sáng chế cho đối tượng cần chúng. Theo một số phương án, rối loạn hoặc bệnh kết hợp với tế bào biểu hiện CD71 là bệnh ung thư. Theo một số phương án, bệnh ung thư là ung thư biểu mô tuyến, bệnh ung thư ống mật (mật), bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính, bệnh ung thư vú âm tính Her2, bệnh ung thư carcinoid, bệnh ung thư cổ tử cung, ung thư đường mật, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, u thần kinh đệm, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tế bào vảy đầu và cổ, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, u lympho, u melanin, bệnh ung thư miệng hầu, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tuyến tiền liệt kháng thiến di căn, bệnh ung thư thận, ung thư mô liên kết, bệnh ung thư

da, bệnh ung thư tế bào vảy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư niệu sinh dục, hoặc bệnh ung thư đường tiết niệu. Theo một số phương án, phối tử tự nhiên là transferrin. Theo một số phương án, sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của CD71 động vật có vú là bất thường. Theo một số phương án, phương pháp này có chứa bước dùng tác nhân bổ sung. Theo một số phương án, tác nhân bổ sung là tác nhân trị liệu.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ức chế hoặc làm giảm sự phát triển, sự tăng sinh, hoặc sự di căn của tế bào biểu hiện CD71 động vật có vú có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể theo sáng chế hoặc kháng thể được liên hợp theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể được liên hợp theo sáng chế cho đối tượng cần chúng. Theo một số phương án, phối tử tự nhiên là transferrin. Theo một số phương án, sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của CD71 động vật có vú là bất thường. Theo một số phương án, phương pháp này có chứa bước dùng tác nhân bổ sung. Theo một số phương án, tác nhân bổ sung là tác nhân trị liệu.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ức chế, phong bế, hoặc ngăn ngừa sự liên kết của phối tử tự nhiên với CD71 động vật có vú, có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể theo sáng chế hoặc kháng thể được liên hợp theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể được liên hợp theo sáng chế cho đối tượng cần chúng. Theo một số phương án, phối tử tự nhiên là transferrin. Theo một số phương án, sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của CD71 động vật có vú là bất thường. Theo một số phương án, phương pháp này có chứa bước dùng tác nhân bổ sung. Theo một số phương án, tác nhân bổ sung là tác nhân trị liệu.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị, làm nhẹ bớt triệu chứng của, hoặc làm trì hoãn sự tiến triển của rối loạn hoặc bệnh trong đó tế bào bị bệnh biểu hiện CD71 có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế cho đối tượng cần chúng. Theo một số phương án, rối loạn hoặc bệnh là bệnh ung thư.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị, làm nhẹ bớt triệu chứng của, hoặc làm trì hoãn sự tiến triển của rối loạn hoặc bệnh kết hợp với tế bào biểu hiện CD71 có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế cho đối tượng cần chúng. Theo một số phương án, rối loạn hoặc bệnh kết hợp với tế bào biểu hiện CD71 là bệnh ung thư. Theo một số phương án, bệnh ung thư là ung thư biểu mô tuyến, bệnh ung thư ống mật (mật), bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính, bệnh ung thư vú âm

tính Her2, bệnh ung thư carcinoid, bệnh ung thư cổ tử cung, ung thư đường mật, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư nội mạc tử cung, u thần kinh đệm, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tế bào vảy đầu và cổ, bệnh bạch cầu, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ, u lympho, u melanin, bệnh ung thư miệng hầu, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, ung thư biểu mô tuyến tiền liệt kháng thiến di căn, bệnh ung thư thận, ung thư mô liên kết, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tế bào vảy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư niệu sinh dục, hoặc bệnh ung thư đường tiết niệu. Theo một số phương án, phối tử tự nhiên là transferrin. Theo một số phương án, sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của CD71 động vật có vú là bất thường. Theo một số phương án, phương pháp này có chứa bước dùng tác nhân bổ sung. Theo một số phương án, tác nhân bổ sung là tác nhân trị liệu.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ức chế hoặc làm giảm sự phát triển, sự tăng sinh, hoặc sự di căn của tế bào biểu hiện CD71 động vật có vú có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế cho đối tượng cần chúng. Theo một số phương án, phối tử tự nhiên là transferrin. Theo một số phương án, sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của CD71 động vật có vú là bất thường. Theo một số phương án, phương pháp này có chứa bước dùng tác nhân bổ sung. Theo một số phương án, tác nhân bổ sung là tác nhân trị liệu.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ức chế, phong bế, hoặc ngăn ngừa sự liên kết của phối tử tự nhiên với CD71 động vật có vú, có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế cho đối tượng cần chúng. Theo một số phương án, phối tử tự nhiên là transferrin. Theo một số phương án, sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của CD71 động vật có vú là bất thường. Theo một số phương án, phương pháp này có chứa bước dùng tác nhân bổ sung. Theo một số phương án, tác nhân bổ sung là tác nhân trị liệu.

Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 bao gồm nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, nhãn có thể phát hiện được bao gồm tác nhân chụp ảnh, tác nhân tương phản, enzym, nhãn huỳnh quang, nhóm mang màu, thuốc nhuộm, một hoặc nhiều ion kim loại, hoặc nhãn dựa trên phối tử. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, tác nhân chụp ảnh có chứa đồng vị phóng xạ. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, đồng vị phóng xạ là indi hoặc techneti. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, tác nhân tương phản có chứa iot, gađolini hoặc sắt oxit. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit

này, enzym có chứa peroxiđaza củ cải ngựa, phosphataza kiềm, hoặc β-galactosiđaza. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, nhãn huỳnh quang có chứa protein huỳnh quang vàng (YFP), protein huỳnh quang màu xanh ngọc (CFP), protein huỳnh quang màu xanh lá cây (GFP), protein huỳnh quang màu đỏ được cải biến (mRFP), protein huỳnh quang màu đỏ tdimer2 (RFP tdimer2), HCRED, hoặc dẫn xuất europi. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, nhãn phát quang có chứa dẫn xuất N-metylacryđi. Theo một số phương án của các phương pháp này, nhãn có chứa nhãn Alexa Fluor®, chẳng hạn như Alex Fluor® 680 hoặc Alexa Fluor® 750. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, nhãn dựa trên phối tử có chứa biotin, aviđin, streptaviđin hoặc một hoặc nhiều hapten.

Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, đối tượng là động vật có vú. Theo một số phương án của các phương pháp này, đối tượng là người. Theo một số phương án, đối tượng là động vật có vú không phải là người, chẳng hạn như động vật linh trưởng không phải là người, động vật làm bạn (ví dụ như, mèo, chó, ngựa), động vật nông trại, động vật làm việc, hoặc động vật vườn thú. Theo một số phương án, đối tượng là động vật gặm nhấm.

Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, phương pháp là phương pháp *in vivo*. Theo một số phương án của các phương pháp này, phương pháp là phương pháp *in situ*. Theo một số phương án của các phương pháp này, phương pháp là phương pháp *ex vivo*. Theo một số phương án của các phương pháp này, phương pháp là phương pháp *in vitro*.

Theo một số phương án của phương pháp và bộ kit, phương pháp được sử dụng để xác định hoặc theo cách khác tinh giản quần thể bệnh nhân thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 theo sáng chế, sau đó là điều trị bằng cách dùng kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp đó cho đối tượng cần chúng. Ví dụ như, bệnh nhân mà thử nghiệm dương tính đối với cả hai đích (ví dụ như, CD71) và proteaza mà phân cắt cơ chất ở gốc có thể phân cắt (CM) của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 được thử nghiệm trong các phương pháp này được xác định là ứng viên thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 này có chứa CM này, và sau đó bệnh nhân được dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp mà được thử nghiệm. Tương tự, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính đối với một trong hai hoặc cả đích (*ví dụ như*, CD71) và proteaza mà phân cắt cơ chất ở CM trong kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm bằng cách sử dụng các phương pháp này có thể được xác định làm ứng viên thích hợp cho dạng trị liệu khác. Theo một số phương án, bệnh nhân này có thể được thử nghiệm với kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 khác đến khi kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 thích hợp để điều trị được xác định (ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 có chứa CM mà được phân cắt bởi bệnh nhân tại vị trí của bệnh). Theo một số phương án, sau đó bệnh nhân được

dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa và/hoặc được liên hợp mà bệnh nhân đã được thử nghiệm dương tính đối với nó. AB, MM, và/hoặc CM thích hợp bao gồm AB, MM, và/hoặc CM bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này.

Dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể theo sáng chế và tùy ý chất mang dược dụng. Các dược phẩm này có thể được bao gồm trong bộ kit, chẳng hạn như, ví dụ như, bộ kit chẩn đoán.

Theo một số phương án, dược phẩm có chứa kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế, và tùy ý chất mang dược dụng. Theo một số phương án, dược phẩm có chứa tác nhân bổ sung. Theo một số phương án, tác nhân bổ sung là tác nhân trị liệu.

Kháng thể kháng-CD71 và AB trong kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế liên kết đặc hiệu đích CD71, chẳng hạn như, ví dụ như, CD71 động vật có vú, và/hoặc CD71 người. Cũng được bao gồm trong sáng chế là kháng thể kháng-CD71 và AB mà liên kết với cùng epitop CD71 như kháng thể theo sáng chế và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa được mô tả trong bản mô tả này. Cũng được bao gồm trong sáng chế là kháng thể kháng-CD71 và AB mà cạnh tranh với kháng thể kháng-CD71 và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 được hoạt hóa được mô tả trong bản mô tả này đối với việc liên kết với đích CD71, ví dụ như, CD71 người. Cũng được bao gồm trong sáng chế là kháng thể kháng-CD71 và AB mà cạnh tranh chéo với kháng thể kháng-CD71 và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 được hoạt hóa được mô tả trong bản mô tả này đối với việc liên kết với đích CD71, ví dụ như, CD71 người.

Kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được đề xuất trong sáng chế bao gồm gốc che giấu. Theo một số phương án, gốc che giấu là trình tự axit amin mà được ghép nối hoặc theo cách khác được gắn vào kháng thể kháng-CD71 và được định vị ở trong cấu trúc kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa sao cho gốc che giấu làm giảm khả năng của kháng thể kháng-CD71 để liên kết đặc hiệu CD71. Gốc che giấu thích hợp được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ trong số nhiều kỹ thuật đã biết. Ví dụ như, gốc che giấu peptit được xác định bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Công bố PCT số WO 2009/025846 của Daugherty và cộng sự, nội dung của chúng được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ.

Kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được đề xuất ở đây bao gồm gốc có thể phân cắt. Theo một số phương án, gốc có thể phân cắt bao gồm trình tự axit amin mà là cơ chất cho proteaza, thường là proteaza ngoại bào. Cơ chất thích hợp được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ trong số nhiều kỹ thuật đã biết. Ví dụ như, peptit cơ chất được xác định bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 7,666,817 của Daugherty và cộng sự; trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 8,563,269 của Stagliano và cộng sự; và trong Công bố PCT số WO 2014/026136 của La Porte và cộng sự, nội dung của mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây để

tham khảo đến toàn bộ. (*Cũng xem* Boulware et al. "Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics." Biotechnol. Bioeng. 106.3 (2010): 339-46).

Cơ chất ví dụ bao gồm nhưng không giới hạn ở cơ chất có thể phân cắt bằng một hoặc nhiều enzym hoặc proteaza sau đây được liệt kê trong Bảng (I).

Bảng (I): Proteaza và/hoặc enzym ví dụ

ADAMS, ADAMTS, *ví dụ như*	Xystein proteinaza, *ví dụ như*,	Serin proteaza, *ví dụ như*,
ADAM8	Cruzipain	protein C được hoạt hóa
ADAM9	Legumain	Cathepsin A
ADAM10	Otubain-2	Cathepsin G
ADAM12		Chymase
ADAM15	KLK, *ví dụ như*,	proteaza yếu tố đông máu (*ví dụ như*, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa,
ADAM17/TACE	KLK4	
ADAMDEC1	KLK5	FXIIa)
ADAMTS1	KLK6	Elastaza
ADAMTS4	KLK7	Granzyme B
ADAMTS5	KLK8	Guaniđinobenzoataza
	KLK10	HtrA1
Aspartat proteaza, *ví dụ như*,	KLK11	Elastaza bạch cầu trung tính người
BACE	KLK13	Lactoferrin
Renin	KLK14	Marapsin
		NS3/4A
Aspartic cathepsin, *ví dụ như*,	Kim loại proteinaza, *ví dụ như*,	PACE4
Cathepsin D	Meprin	Plasmin
Cathepsin E	Neprilysin	PSA
	PSMA	tPA
Caspaza, *ví dụ như*,	BMP-1	Thrombin
Caspaza 1		Tryptaza
Caspaza 2	MMP, *ví dụ như*,	uPA
Caspaza 3	MMP1	
Caspaza 4	MMP2	Xuyên màng loại II
Caspaza 5	MMP3	Serin proteaza (TTSP), *ví dụ như*,
Caspaza 6	MMP7	DESC1
Caspaza 7	MMP8	DPP-4
Caspaza 8	MMP9	FAP
Caspaza 9	MMP10	Hepsin
Caspaza 10	MMP11	Matriptaza-2
Caspaza 14	MMP12	MT-SP1/matriptaza
	MMP13	TMPRSS2

Xystein cathepsin, *ví dụ như*,	MMP14	TMPRSS3
Cathepsin B	MMP15	TMPRSS4
Cathepsin C	MMP16	
Cathepsin K	MMP17	
Cathepsin L	MMP19	
Cathepsin S	MMP20	
Cathepsin V/L2	MMP23	
Cathepsin X/Z/P	MMP24	
	MMP26	
	MMP27	

Kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được mô tả trong bản mô tả này khắc phục hạn chế của kháng thể trị liệu, cụ thể là kháng thể trị liệu mà đã biết là gây độc đối với ít nhất là ở mức độ nào đó *in vivo*. Sự gây độc qua trung gian đích tạo thành hạn chế chính đối với sự phát triển của kháng thể trị liệu. Kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được đề xuất ở đây được thiết kế để nhắm đến sự gây độc kết hợp với sự ức chế của đích ở mô bình thường bằng kháng thể trị liệu truyền thống. Các kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa này vẫn được che giấu đến khi được hoạt hóa theo cách phân hủy protein tại vị trí của bệnh. Bắt đầu với kháng thể kháng-CD71 làm kháng thể trị liệu ban đầu, kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa theo sáng chế được thiết kế bằng cách ghép nối kháng thể với gốc che giấu ức chế thông qua cầu nối mà kết hợp cơ chất proteaza.

Khi AB được cải biến với MM và ở trong sự có mặt của đích, sự liên kết đặc hiệu của AB với đích của nó được làm giảm hoặc được ức chế, khi so với sự liên kết đặc hiệu của AB không được cải biến với MM hoặc sự liên kết đặc hiệu của AB gốc với đích.

K_d của AB được cải biến với MM về phía đích lớn hơn ít nhất là 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 hoặc lớn hơn, hoặc từ 5 đến 10, từ 10 đến 100, từ 10 đến 1.000, từ 10 đến 10.000, từ 10 đến 100.000, từ 10 đến 1.000.000, từ 10 đến 10.000.000, từ 100 đến 1.000, từ 100 đến 10.000, từ 100 đến 100.000, từ 100 đến 1.000.000, từ 100 đến 10.000.000, từ 1.000 đến 10.000, từ 1.000 đến 100.000, từ 1.000 đến 1.000.000, từ 1.000 đến 10.000.000, từ 10.000 đến 100.000, từ 10.000 đến 1.000.000, từ 10.000 đến 10.000.000, từ 100.000 đến 1.000.000, hoặc từ 100.000 đến 10.000.000 lần so với K_d của AB không được cải biến với MM hoặc của AB gốc về phía đích. Ngược lại, ái lực liên kết của AB được cải biến với MM về phía đích thấp hơn ít nhất là 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 hoặc lớn hơn, hoặc từ 5 đến 10, từ 10 đến 100, từ 10 đến 1.000, từ 10 đến 10.000, từ 10 đến 100.000, từ 10 đến 1.000.000, từ 10 đến 10.000.000, từ 100 đến 1.000, từ 100 đến 10.000, từ 100 đến 100.000, từ 100 đến 1.000.000, từ 100 đến 10.000.000, từ 1.000 đến

10.000, từ 1.000 đến 100.000, từ 1.000 đến 1.000.000, từ 1.000 đến 10.000.000, từ 10.000 đến 100.000, từ 10.000 đến 1.000.000, từ 10.000 đến 10.000.000, từ 100.000 đến 1.000.000, hoặc từ 100.000 đến 10.000.000 lần so với ái lực liên kết của AB không được cải biến với MM hoặc của AB gốc về phía đích.

Hằng số phân ly (K_d) của MM về phía AB thường lớn hơn so với K_d của AB về phía đích. K_d của MM về phía AB có thể lớn hơn ít nhất là 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 hoặc thậm chí 10.000.000 lần so với K_d của AB về phía đích. Ngược lại, ái lực liên kết của MM về phía AB thường thấp hơn so với ái lực liên kết của AB về phía đích. Ái lực liên kết của MM về phía AB có thể thấp hơn ít nhất là 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 hoặc thậm chí 10.000.000 lần so với ái lực liên kết của AB về phía đích.

Theo một số phương án, hằng số phân ly (K_d) của MM về phía AB xấp xỉ bằng K_d của AB về phía đích. Theo một số phương án, hằng số phân ly (K_d) của MM về phía AB không lớn hơn so với hằng số phân ly của AB về phía đích.

Theo một số phương án, hằng số phân ly (K_d) của MM về phía AB nhỏ hơn so với hằng số phân ly của AB về phía đích.

Theo một số phương án, hằng số phân ly (K_d) của MM về phía AB lớn hơn so với hằng số phân ly của AB về phía đích.

Theo một số phương án, MM có K_d đối với việc liên kết với AB mà không lớn hơn so với K_d đối với sự liên kết của AB với đích.

Theo một số phương án, MM có K_d đối với việc liên kết với AB mà không nhỏ hơn K_d đối với sự liên kết của AB với đích.

Theo một số phương án, MM có K_d đối với việc liên kết với AB mà xấp xỉ bằng K_d đối với sự liên kết của AB với đích.

Theo một số phương án, MM có K_d đối với việc liên kết với AB mà nhỏ hơn so với K_d đối với sự liên kết của AB với đích.

Theo một số phương án, MM có K_d đối với việc liên kết với AB mà lớn hơn so với K_d đối với sự liên kết của AB với đích.

Theo một số phương án, MM có K_d đối với việc liên kết với AB mà không lớn hơn 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, hoặc 1.000 lần so với K_d đối với sự liên kết của AB với đích. Theo một số phương án, MM có K_d đối với việc liên kết với AB mà lớn hơn từ 1 đến 5, từ 2 đến 5, từ 2 đến 10, từ 5 đến 10, từ 5 đến 20, từ 5 đến 50, từ 5 đến 100, từ 10 đến 100, từ 10 đến 1.000, từ 20 đến 100, từ 20 đến 1000, hoặc từ 100 đến 1.000 lần so với K_d đối với sự liên kết của AB với đích.

Theo một số phương án, MM có ái lực đối với việc liên kết với AB mà nhỏ hơn so với ái lực của sự liên kết của AB với đích.

Theo một số phương án, MM có ái lực đối với việc liên kết với AB mà không lớn hơn so với ái lực của sự liên kết của AB với đích.

Theo một số phương án, MM có ái lực đối với việc liên kết với AB mà xấp xỉ bằng ái lực của sự liên kết của AB với đích.

Theo một số phương án, MM có ái lực đối với việc liên kết với AB mà không nhỏ hơn ái lực của sự liên kết của AB với đích.

Theo một số phương án, MM có ái lực đối với việc liên kết với AB mà lớn hơn so với ái lực của sự liên kết của AB với đích.

Theo một số phương án, MM có ái lực đối với việc liên kết với AB mà nhỏ hơn 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, hoặc 1.000 lần so với ái lực của sự liên kết của AB với đích. Theo một số phương án, MM có ái lực đối với việc liên kết với AB mà nhỏ hơn từ 1 đến 5, từ 2 đến 5, từ 2 đến 10, từ 5 đến 10, từ 5 đến 20, từ 5 đến 50, từ 5 đến 100, từ 10 đến 100, từ 10 đến 1.000, từ 20 đến 100, từ 20 đến 1000, hoặc từ 100 đến 1.000 lần so với ái lực của sự liên kết của AB với đích. Theo một số phương án, MM có ái lực đối với việc liên kết với AB mà nhỏ hơn từ 2 đến 20 lần so với ái lực của sự liên kết của AB với đích. Theo một số phương án, MM không liên kết cộng hóa trị với AB và ở nồng độ đẳng mol đối với AB không ức chế sự liên kết của AB với đích.

Khi AB được cải biến với MM và ở trong sự có mặt của đích sự liên kết đặc hiệu của AB với đích của nó được làm giảm hoặc được ức chế, khi so với sự liên kết đặc hiệu của AB không được cải biến với MM hoặc sự liên kết đặc hiệu của AB gốc với đích. Khi so với sự liên kết của AB không được cải biến với MM hoặc sự liên kết của AB gốc với đích khả năng của AB để liên kết đích khi được cải biến với MM có thể được làm giảm bằng ít nhất là 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% và thậm chí 100% trong ít nhất là 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, hoặc 96 giờ, hoặc 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, hoặc 180 ngày, hoặc 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, hoặc 12 tháng hoặc lâu hơn khi được đo *in vivo* hoặc trong thử nghiệm *in vitro*.

MM ức chế sự liên kết của AB với đích. MM liên kết miền liên kết kháng nguyên của AB và ức chế sự liên kết của AB với đích. MM có thể ức chế về mặt không gian sự liên kết của AB với đích. MM có thể ức chế về mặt lập thể sự liên kết của AB với đích của nó. Theo các phương án này khi AB được cải biến hoặc ghép nối với MM và trong sự có mặt của đích không có sự liên kết hoặc về cơ bản không có sự liên kết của AB với đích, hoặc không nhiều hơn 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, hoặc 50% sự liên kết của AB với đích, khi so với sự liên kết của AB không được cải biến với MM, AB, gốc hoặc AB

không ghép nối với MM với đích, trong ít nhất là 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, hoặc 96 giờ, hoặc 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, hoặc 180 ngày, hoặc 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, hoặc 12 tháng hoặc lâu hơn khi được đo *in vivo* hoặc trong thử nghiệm *in vitro*.

Khi AB được ghép nối với hoặc được cải biến bằng MM, MM 'che giấu' hoặc làm giảm hoặc theo cách khác ức chế sự liên kết đặc hiệu của AB với đích. Khi AB được ghép nối với hoặc được cải biến bằng MM, việc ghép nối hoặc cải biến này có thể mang lại sự thay đổi cấu trúc mà làm giảm hoặc ức chế khả năng của AB để liên kết đặc hiệu đích của nó.

AB ghép nối với hoặc được cải biến với MM có thể được thể hiện bằng công thức sau đây (theo thứ tự từ khu vực đầu tận cùng amino (N) đến khu vực đầu tận cùng carboxyl (C):

(MM)-(AB)

(AB)-(MM)

(MM)-L-(AB)

(AB)-L-(MM)

trong đó MM là gốc che giấu, AB là kháng thể hoặc mảnh kháng thể của chúng, và L là cầu nối. Trong nhiều phương án, có thể muốn cài xen một hoặc nhiều cầu nối, *ví dụ như*, cầu nối linh hoạt, vào hợp phần nhờ vậy tạo ra tính linh hoạt.

Theo các phương án nhất định, MM không phải là đối tác liên kết tự nhiên của AB. Theo một số phương án, MM không tương đồng hoặc về cơ bản không tương đồng với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương tự không lớn hơn 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, hoặc 80% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương đồng không lớn hơn 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, hoặc 80% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương đồng không lớn hơn 25% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương đồng không lớn hơn 50% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương đồng không lớn hơn 20% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương đồng không lớn hơn 10% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm AB mà được cải biến bằng MM và còn bao gồm một hoặc nhiều gốc có thể phân cắt (CM). Kháng thể có thể hoạt hóa này thể hiện sự liên kết có thể hoạt hóa/có thể chuyển đổi, với đích của AB. Kháng thể có thể hoạt hóa thường bao gồm kháng thể hoặc mảnh kháng thể (AB), được cải biến bằng hoặc ghép nối với gốc che giấu (MM) và gốc có thể cải biến hoặc có thể phân cắt (CM). Theo một số phương án, CM chứa trình tự axit amin mà đóng vai trò làm cơ chất cho ít nhất là một proteaza.

Các thành phần của kháng thể có thể hoạt hóa được sắp xếp sao cho MM và CM được định vị sao cho ở trạng thái được phân cắt (hoặc có hoạt tính tương đối) và trong sự có mặt của đích, AB liên kết đích mặc dù kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt (hoặc tương đối bất hoạt) trong sự có mặt của đích, sự liên kết đặc hiệu của AB với đích của nó được làm giảm hoặc được ức chế. Sự liên kết đặc hiệu của AB với đích của nó có thể được làm giảm do sự ức chế hoặc sự che giấu của khả năng của AB để liên kết đặc hiệu đích của nó bằng MM.

K_d của AB được cải biến với MM và CM về phía đích lớn hơn ít nhất là 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 hoặc lớn hơn, hoặc từ 5 đến 10, từ 10 đến 100, từ 10 đến 1.000, từ 10 đến 10.000, từ 10 đến 100.000, từ 10 đến 1.000.000, từ 10 đến 10.000.000, từ 100 đến 1.000, từ 100 đến 10.000, từ 100 đến 100.000, từ 100 đến 1.000.000, từ 100 đến 10.000.000, từ 1.000 đến 10.000, từ 1.000 đến 100.000, từ 1.000 đến 1.000.000, từ 1.000 đến 10.000.000, từ 10.000 đến 100.000, từ 10.000 đến 1.000.000, từ 10.000 đến 10.000.000, từ 100.000 đến 1.000.000, hoặc từ 100.000 đến 10.000.000 lần so với K_d của AB không được cải biến với MM và CM hoặc của AB gốc về phía đích. Ngược lại, ái lực liên kết của AB được cải biến với MM và CM về phía đích thấp hơn ít nhất là 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 hoặc lớn hơn, hoặc từ 5 đến 10, từ 10 đến 100, từ 10 đến 1.000, từ 10 đến 10.000, từ 10 đến 100.000, từ 10 đến 1.000.000, từ 10 đến 10.000.000, từ 100 đến 1.000, từ 100 đến 10.000, từ 100 đến 100.000, từ 100 đến 1.000.000, từ 100 đến 10.000.000, từ 1.000 đến 10.000, từ 1.000 đến 100.000, từ 1.000 đến 1.000.000, từ 1.000 đến 10.000.000, từ 10.000 đến 100.000, từ 10.000 đến 1.000.000, từ 10.000 đến 10.000.000, từ 100.000 đến 1.000.000, hoặc từ 100.000 đến 10.000.000 lần so với ái lực liên kết của AB không được cải biến với MM và CM hoặc của AB gốc về phía đích.

Khi AB được cải biến với MM và CM và ở trong sự có mặt của đích nhưng không phải trong sự có mặt của tác nhân cải biến (ví dụ như ít nhất là một proteaza), sự liên kết đặc hiệu của AB với đích của nó được làm giảm hoặc được ức chế, khi so với sự liên kết đặc hiệu của AB không được cải biến với MM và CM hoặc của AB gốc với đích. Khi so với sự liên kết của AB gốc hoặc sự liên kết của AB không được cải biến với MM và CM với đích của nó, khả năng của AB để liên kết đích khi được cải biến với MM và CM có thể được làm giảm bằng ít nhất là 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% và thậm chí 100% trong ít nhất là 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, hoặc 96 giờ hoặc 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, hoặc 180 ngày, hoặc 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, hoặc 12 tháng hoặc lâu hơn khi được đo *in vivo* hoặc trong thử nghiệm *in vitro*.

Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ trạng thái được phân cắt dùng để chỉ tình trạng của kháng thể có thể hoạt hóa sau khi cải biến CM bằng ít nhất là một proteaza. Thuật ngữ trạng thái không được phân cắt, như dùng trong bản mô tả này, dùng để chỉ tình trạng của kháng thể có thể hoạt hóa khi không có sự phân cắt của CM bằng proteaza. Như thảo luận ở trên, thuật ngữ "kháng thể có thể hoạt hóa" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ kháng thể có thể hoạt hóa ở cả trạng thái không được phân cắt (tự nhiên), cũng như là trạng thái được phân cắt của nó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng theo một số phương án kháng thể có thể hoạt hóa được phân cắt có thể thiếu MM do sự phân cắt của CM bằng proteaza, dẫn đến sự giải phóng của ít nhất là MM (*ví dụ như*, trong đó MM không được kết hợp với kháng thể có thể hoạt hóa bằng liên kết cộng hóa trị (*ví dụ như*, liên kết đisulfua giữa các gốc xystein).

Có thể hoạt hóa hoặc có thể chuyển đổi có nghĩa là kháng thể có thể hoạt hóa thể hiện mức độ liên kết thứ nhất với đích khi kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái được ức chế, được che giấu hoặc không được phân cắt (*tức là*, cấu hình thứ nhất), và mức độ liên kết thứ hai với đích ở trạng thái không được ức chế, không được che giấu và/hoặc được phân cắt (*tức là*, cấu hình thứ hai), trong đó mức độ liên kết đích thứ hai lớn hơn so với mức độ liên kết thứ nhất. Nhìn chung, sự tiếp cận của đích đến AB của kháng thể có thể hoạt hóa lớn hơn trong sự có mặt của tác nhân phân cắt có khả năng phân cắt CM, tức là, proteaza, so với khi không có mặt tác nhân phân cắt này. Do đó, khi kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt, AB được ức chế khỏi sự liên kết đích và có thể được che giấu khỏi sự liên kết đích (*tức là*, cấu hình thứ nhất là AB không thể liên kết đích), và ở trạng thái được phân cắt AB không bị ức chế hoặc không được che giấu để liên kết đích.

CM và AB của kháng thể có thể hoạt hóa được chọn sao cho AB trình diện gốc liên kết đối với đích nhất định, và CM trình diện cơ chất cho proteaza. Theo một số phương án, proteaza được đồng định vị với đích ở vị trí điều trị hoặc vị trí chẩn đoán ở đối tượng. Như dùng trong bản mô tả này, được đồng định vị dùng để chỉ việc ở cùng vị trí hoặc ở tương đối gần. Theo một số phương án, proteaza phân cắt CM tạo ra kháng thể được hoạt hóa mà liên kết với đích nằm ở gần vị trí phân cắt. Kháng thể có thể hoạt hóa được bộc lộ trong bản mô tả này được sử dụng cụ thể khi, ví dụ như, proteaza có khả năng phân cắt vị trí trong CM, tức là, proteaza, có mặt ở hàm lượng cao hơn tương đối ở mô chứa đích của vị trí điều trị hoặc vị trí chẩn đoán so với trong mô của vị trí không điều trị (ví dụ như trong mô khỏe mạnh). Theo một số phương án, CM theo sáng chế cũng được phân cắt bằng một hoặc nhiều proteaza khác. Theo một số phương án, nó là một hoặc nhiều proteaza khác mà được đồng định vị với đích và chịu trách nhiệm đối với sự phân cắt của CM *in vivo*.

Theo một số phương án kháng thể có thể hoạt hóa mang lại sự gây độc và/hoặc tác dụng phụ có hại được làm giảm mà theo cách khác có thể bắt nguồn từ sự liên kết của AB tại vị trí không điều trị nếu AB không được che giấu hoặc theo cách khác được ức chế khỏi việc liên kết với đích.

Nhìn chung, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được thiết kế bằng cách chọn lọc AB được quan tâm và tạo cấu trúc phần còn lại của kháng thể có thể hoạt hóa sao cho, khi được ràng buộc về mặt cấu hình, MM mang lại sự che giấu của AB hoặc sự giảm đi của sự liên kết của AB với đích của nó. Tiêu chuẩn thiết kế cấu trúc có thể được tính đến để tạo ra đặc điểm chức năng này.

Kháng thể có thể hoạt hóa thể hiện kiểu hình có thể chuyển đổi có khoảng giới hạn động lực mong muốn đối với việc liên kết đích trong cấu hình được ức chế so với cấu hình không được ức chế được đề xuất. Khoảng giới hạn động lực thường dùng để chỉ tỉ lệ của (a) mức được phát hiện lớn nhất của thông số ở tập hợp điều kiện thứ nhất với (b) giá trị được phát hiện nhỏ nhất của thông số đó ở tập hợp điều kiện thứ hai. Ví dụ như, trong ngữ cảnh của kháng thể có thể hoạt hóa, khoảng giới hạn động lực dùng để chỉ tỉ lệ của (a) mức được phát hiện lớn nhất của đích protein việc liên kết với kháng thể có thể hoạt hóa trong sự có mặt của ít nhất là một proteaza có khả năng phân cắt CM của kháng thể có thể hoạt hóa đến (b) mức được phát hiện tối thiểu của đích protein việc liên kết với kháng thể có thể hoạt hóa khi không có mặt proteaza. Khoảng giới hạn động lực của kháng thể có thể hoạt hóa có thể được tính dưới dạng tỉ lệ của hằng số phân ly của sự xử lý tác nhân phân cắt kháng thể có thể hoạt hóa (*ví dụ như*, enzym) với hằng số phân ly của sự xử lý tác nhân phân cắt kháng thể có thể hoạt hóa. Khoảng giới hạn động lực của kháng thể có thể hoạt hóa càng lớn, kiểu hình có thể chuyển đổi của kháng thể có thể hoạt hóa càng tốt. Kháng thể có thể hoạt hóa có giá trị khoảng giới hạn động lực cao hơn tương đối (*ví dụ như*, lớn hơn so với 1) thể hiện kiểu hình chuyển đổi mong muốn hơn sao cho sự liên kết protein đích bởi kháng thể có thể hoạt hóa xảy ra đến mức độ lớn hơn (*ví dụ như*, xảy ra chủ yếu) trong sự có mặt của tác nhân phân cắt (*ví dụ như*, enzym) có khả năng phân cắt CM của kháng thể có thể hoạt hóa so với khi không có mặt tác nhân phân cắt.

Kháng thể có thể hoạt hóa có thể được tạo ra trong nhiều cấu hình cấu trúc. Công thức ví dụ đối với kháng thể có thể hoạt hóa được nêu dưới đây. Dự tính cụ thể rằng thứ tự từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C của AB, MM và CM có thể được đảo ngược ở trong kháng thể có thể hoạt hóa. Cũng dự tính cụ thể rằng CM và MM có thể gối lên nhau ở trình tự axit amin, *ví dụ như*, sao cho CM được chứa ở trong MM.

Ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được thể hiện bằng công thức sau đây (theo thứ tự từ khu vực đầu tận cùng amino (N) đến khu vực đầu tận cùng carboxyl (C):

(MM)-(CM)-(AB)

(AB)-(CM)-(MM)

trong đó MM là gốc che giấu, CM là gốc có thể phân cắt, và AB là kháng thể hoặc mảnh của chúng. Cần lưu ý rằng mặc dù MM và CM được chỉ ra là các thành phần tách biệt trong công thức nêu trên, trong tất cả các phương án ví dụ (bao gồm các công thức) được bộc lộ trong bản mô tả này dự tính rằng trình tự axit amin của MM và CM có thể gối lên nhau, *ví dụ như*, sao cho CM được chứa toàn bộ hoặc một phần ở trong MM. Ngoài ra, công thức nêu trên mang lại trình tự axit amin bổ sung mà có thể được định vị ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C đối với các thành phần kháng thể có thể hoạt hóa.

Theo các phương án nhất định, MM không phải là đối tác liên kết tự nhiên của AB. Theo một số phương án, MM không tương đồng hoặc về cơ bản không tương đồng với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương tự không lớn hơn 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, hoặc 80% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương đồng không lớn hơn 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, hoặc 80% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương đồng không lớn hơn 50% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương đồng không lớn hơn 25% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương đồng không lớn hơn 20% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB. Theo một số phương án, MM tương đồng không lớn hơn 10% đối với đối tác liên kết tự nhiên bất kỳ của AB.

Trong nhiều phương án có thể muốn cài xen một hoặc nhiều cầu nối, *ví dụ như*, cầu nối linh hoạt, vào trong kháng thể có thể hoạt hóa cấu trúc sao cho mang lại tính linh hoạt ở một hoặc nhiều trong số mối nối MM-CM, mối nối CM-AB, hoặc cả hai. Ví dụ như, AB, MM, và/hoặc CM có thể không chứa số lượng đủ của gốc (*ví dụ như*, Gly, Ser, Asp, Asn, đặc biệt là Gly và Ser, cụ thể là Gly) để tạo ra khả năng linh hoạt mong muốn. Như vậy, kiểu hình có thể chuyển đổi của cấu trúc kháng thể có thể hoạt hóa này có thể hưởng lợi từ sự đưa vào của một hoặc nhiều axit amin để tạo ra cầu nối linh hoạt. Ngoài ra, như được mô tả dưới đây, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa được cung cấp dưới dạng cấu trúc được ràng buộc về mặt cấu hình, cầu nối linh hoạt có thể được cài xen có điều khiển để làm thuận tiện cho sự tạo thành và sự duy trì của cấu trúc mạch vòng trong kháng thể có thể hoạt hóa không được phân cắt.

Ví dụ như, theo các phương án nhất định kháng thể có thể hoạt hóa có chứa một trong các công thức sau đây (trong đó công thức dưới đây thể hiện trình tự axit amin theo chiều từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C hoặc theo chiều từ đầu tận cùng C đến đầu tận cùng N):

(MM)-LP1-(CM)-(AB)

(MM)-(CM)-LP2-(AB)

(MM)-LP1-(CM)-LP2-(AB)

trong đó MM, CM, và AB là như được định nghĩa ở trên; trong đó mỗi LP1 và LP2 độc lập và tùy ý có mặt hoặc không có mặt, là cầu nối linh hoạt giống nhau hoặc khác nhau mà bao gồm ít nhất là 1 axit amin linh hoạt (*ví dụ như*, Gly). Ngoài ra, công thức nêu trên mang lại trình tự axit amin bổ sung mà có thể được định vị ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C đối với các thành phần kháng thể có thể hoạt hóa. Các ví dụ bao gồm, nhưng giới hạn ở, gốc nhắm đích (*ví dụ như*, phối tử đối với thụ thể của tế bào có mặt trong mô đích) và gốc kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh (*ví dụ như*, polypeptit mà liên kết protein huyết thanh, chẳng hạn như globulin miễn dịch (*ví dụ như*, IgG) hoặc albumin huyết thanh (*ví dụ như*, albumin huyết thanh người (HAS)).

CM được phân cắt đặc hiệu bằng ít nhất là một proteaza ở tốc độ bằng khoảng 0,001-1500 x 10^4 $M^{-1}S^{-1}$ hoặc ít nhất là 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, hoặc 1500 x 10^4 $M^{-1}S^{-1}$. Theo một số phương án, CM được phân cắt đặc hiệu ở tốc độ bằng khoảng 100.000 $M^{-1}S^{-1}$. Theo một số phương án, CM được phân cắt đặc hiệu ở tốc độ từ khoảng 1x10E2 đến khoảng 1x10E6 $M^{-1}S^{-1}$ (tức là, từ khoảng $1x10^2$ đến khoảng $1x10^6$ $M^{-1}S^{-1}$).

Để phân cắt đặc hiệu bằng enzym, sự tiếp xúc giữa enzym và CM được tạo ra. Khi kháng thể có thể hoạt hóa có chứa AB ghép nối với MM và CM ở trong sự có mặt của đích và hoạt tính enzym đủ, CM có thể được phân cắt. Hoạt tính enzym đủ có thể dùng để chỉ khả năng của enzym để tạo ra sự tiếp xúc với CM và mang lại sự phân cắt. Có thể dễ dàng hình dung ra rằng enzym có thể ở trong vùng lân cận của CM nhưng không thể phân cắt bởi vì các yếu tố tế bào khác hoặc sự cải biến protein của enzym.

Cầu nối thích hợp để sử dụng trong hợp phần được mô tả trong bản mô tả này thường là các cầu nối mà tạo ra tính linh hoạt của AB được cải biến hoặc kháng thể có thể hoạt hóa để làm thuận tiện cho sự ức chế của sự liên kết của AB với đích. Cầu nối này thường được đề cập đến dưới dạng cầu nối linh hoạt. Cầu nối thích hợp có thể được chọn dễ dàng và có thể có chiều dài thích hợp bất kỳ trong số các chiều dài khác nhau, chẳng hạn như từ 1 axit amin (*ví dụ như*, Gly) đến 20 axit amin, từ 2 axit amin đến 15 axit amin, từ 3 axit amin đến 12 axit amin, bao gồm từ 4 axit amin đến 10 axit amin, từ 5 axit amin đến 9 axit amin, từ 6 axit amin đến 8 axit amin, hoặc từ 7 axit amin đến 8 axit amin, và có thể có chiều dài 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 axit amin.

Cầu nối linh hoạt ví dụ bao gồm polyme glyxin (G)n, polyme glyxin-serin (bao gồm, ví dụ như, (GS)n, (GSGGS)n (SEQ ID NO: 24) và (GGGS)n (SEQ ID NO: 25), trong đó n là số nguyên bằng ít nhất là một), polyme glyxin-alanin, polyme alanin-serin, và các cầu nối linh hoạt khác đã biết trong lĩnh vực. Các polyme glyxin và glyxin-serin tương đối không có cấu trúc, và do đó có

thể đóng vai trò làm phần ràng buộc trung tính giữa các thành phần. Glyxin tiếp cận nhiều không gian phi-psi hơn đáng kể so với ngay cả alanin, và bị hạn chế ít hơn nhiều so với gốc với chuỗi bên dài hơn (xem Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Các cầu nối linh hoạt ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 26), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 27), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 28), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 29), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 30), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 31), và dạng tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng thiết kế của kháng thể có thể hoạt hóa có thể bao gồm cầu nối mà toàn bộ hoặc một phần linh hoạt, sao cho cầu nối có thể bao gồm cầu nối linh hoạt cũng như là một hoặc nhiều phần mà mang lại cấu trúc ít linh hoạt hơn để tạo ra cấu trúc kháng thể có thể hoạt hóa mong muốn.

Sáng chế còn đề xuất hợp phần và phương pháp mà bao gồm kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa mà bao gồm kháng thể hoặc mảnh kháng thể (AB) mà liên kết đặc hiệu CD71, trong đó AB được ghép nối với gốc che giấu (MM) mà làm giảm khả năng của AB để liên kết đích của nó. Theo một số phương án, kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa còn bao gồm gốc có thể phân cắt (CM) mà là cơ chất cho proteaza. Hợp phần và phương pháp được đề xuất ở đây có khả năng gắn một hoặc nhiều tác nhân vào một hoặc nhiều gốc xystein trong AB mà không thỏa hiệp hoạt tính (ví dụ như, hoạt tính che giấu, hoạt hóa hoặc liên kết) của kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, hợp phần và phương pháp được đề xuất ở đây có khả năng gắn một hoặc nhiều tác nhân vào một hoặc nhiều gốc xystein trong AB mà không khử hoặc theo cách khác làm xáo trộn một hoặc nhiều liên kết đisulfua ở trong MM. Hợp phần và phương pháp được đề xuất ở đây tạo ra kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa mà được liên hợp vào một hoặc nhiều tác nhân, *ví dụ như*, tác nhân bất kỳ trong số nhiều tác nhân trị liệu, chẩn đoán và/hoặc phòng ngừa, ví dụ như, theo một số phương án, mà không có (các) tác nhân bất kỳ được liên hợp vào MM của kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa. Hợp phần và phương pháp được đề xuất ở đây tạo ra kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó MM giữ lại khả năng để che giấu hiệu quả và hữu hiệu AB của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt. Hợp phần và phương pháp được đề xuất ở đây tạo ra kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó kháng thể có thể hoạt hóa vẫn được hoạt hóa, *tức là*, được phân cắt, trong sự có mặt của proteaza mà có thể phân cắt CM.

Kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa có ít nhất là một điểm của sự liên hợp đối với tác nhân, nhưng trong phương pháp và hợp phần được đề xuất ở đây ít hơn tất cả các điểm có thể có của sự liên hợp sẵn sàng để liên hợp vào tác nhân. Theo một số phương án, một hoặc nhiều điểm của sự liên hợp là nguyên tử lưu huỳnh tham gia vào liên kết đisulfua. Theo một số phương án, một hoặc nhiều điểm của sự liên hợp là nguyên tử lưu huỳnh tham gia vào liên kết đisulfua liên chuỗi.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều điểm của sự liên hợp là nguyên tử lưu huỳnh tham gia vào liên kết sulfua liên chuỗi, nhưng không nguyên tử lưu huỳnh nào tham gia vào liên kết đisulfua nội chuỗi. Theo một số phương án, một hoặc nhiều điểm của sự liên hợp là nguyên tử lưu huỳnh của xystein hoặc gốc axit amin khác chứa nguyên tử lưu huỳnh. Gốc này có thể có mặt tự nhiên trong cấu trúc kháng thể hoặc có thể được kết hợp vào trong kháng thể bằng sự gây đột biến định hướng vị trí, sự chuyển hóa hóa học, hoặc sự kết hợp nhầm của axit amin không tự nhiên.

Cũng được đề xuất là phương pháp điều chế thể liên hợp của kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa có một hoặc nhiều liên kết đisulfua liên chuỗi trong AB và một hoặc nhiều liên kết đisulfua nội chuỗi trong MM, và thuốc có thể phản ứng với thiol tự do được đề xuất. Phương pháp thường bao gồm việc khử một phần liên kết đisulfua liên chuỗi trong kháng thể có thể hoạt hóa bằng tác nhân khử, chẳng hạn như, ví dụ như, TCEP; và liên hợp thuốc có thể phản ứng với thiol tự do với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử một phần. Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ sự khử một phần dùng để chỉ trạng thái trong đó kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được tiếp xúc bằng tác nhân khử và ít hơn tất cả liên kết đisulfua, *ví dụ như*, ít hơn tất cả các vị trí có thể có của sự liên hợp được khử. Theo một số phương án, ít hơn 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% hoặc nhỏ hơn so với 5% của tất cả các vị trí có thể có của sự liên hợp được khử.

Theo phương án khác nữa, phương pháp khử và liên hợp tác nhân, ví dụ như, thuốc, vàp kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa dẫn đến sự chọn lọc trong sắp đặt tác nhân được đề xuất. Phương pháp này thường bao gồm việc khử một phần kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa bằng tác nhân khử sao cho vị trí liên hợp bất kỳ ở gốc che giấu hoặc phần không phải AB khác của kháng thể có thể hoạt hóa không được khử, và liên hợp tác nhân vào thiol liên chuỗi trong AB. (Các) vị trí liên hợp được chọn sao cho để cho phép sự sắp đặt mong muốn của tác nhân để cho phép sự liên hợp để xảy ra ở vị trí mong muốn. Tác nhân khử là, ví dụ như, TCEP. Các điều kiện phản ứng khử chẳng hạn như, ví dụ như, tỉ lệ của tác nhân khử với kháng thể có thể hoạt hóa, chiều dài của giai đoạn ủ, nhiệt độ trong giai đoạn ủ, độ pH của dung dịch phản ứng khử, v.v., được xác định bằng cách xác định tình trạng mà tạo ra kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó MM giữ lại khả năng để che giấu hiệu quả và hữu hiệu AB của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt. Tỉ lệ của tác nhân khử với kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa sẽ thay đổi tùy thuộc vào kháng thể có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, tỉ lệ của tác nhân khử với kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 20:1 đến 1:1, từ khoảng 10:1 đến 1:1, từ khoảng 9:1 đến 1:1, từ khoảng 8:1 đến 1:1, từ khoảng 7:1 đến 1:1, từ khoảng 6:1 đến 1:1, từ khoảng 5:1 đến 1:1, từ khoảng 4:1 đến 1:1, từ khoảng 3:1 đến 1:1, từ khoảng 2:1 đến 1:1, từ khoảng 20:1 đến 1:1,5, từ khoảng 10:1 đến 1:1,5, từ khoảng 9:1 đến 1:1,5, từ khoảng 8:1 đến 1:1,5, từ

khoảng 7:1 đến 1:1,5, từ khoảng 6:1 đến 1:1,5, từ khoảng 5:1 đến 1:1,5, từ khoảng 4:1 đến 1:1,5, từ khoảng 3:1 đến 1:1,5, từ khoảng 2:1 đến 1:1,5, từ khoảng 1,5:1 đến 1:1,5, hoặc từ khoảng 1:1 đến 1:1,5. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 5:1 đến 1:1. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 5:1 đến 1,5:1. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 4:1 đến 1:1. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 4:1 đến 1,5:1. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 8:1 đến khoảng 1:1. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 2,5:1 đến 1:1.

Theo một số phương án, phương pháp khử liên kết đisulfua liên chuỗi trong AB của kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa và liên hợp tác nhân, ví dụ như, tác nhân chứa thiol chẳng hạn như thuốc, với thiol liên chuỗi thu được để định vị chọn lọc (các) tác nhân trên AB được đề xuất. Phương pháp này thường bao gồm việc khử một phần AB bằng tác nhân khử để tạo thành ít nhất là hai thiol liên chuỗi mà không tạo thành tất cả các thiol liên chuỗi có thể có trong kháng thể có thể hoạt hóa; và liên hợp tác nhân với thiol liên chuỗi của AB được khử một phần. Ví dụ như, AB của kháng thể có thể hoạt hóa được khử một phần trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ khoảng 37°C ở tỉ lệ mong muốn của tác nhân khử: kháng thể có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, tỉ lệ của tác nhân khử với kháng thể có thể hoạt hóa sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 20:1 đến 1:1, từ khoảng 10:1 đến 1:1, từ khoảng 9:1 đến 1:1, từ khoảng 8:1 đến 1:1, từ khoảng 7:1 đến 1:1, từ khoảng 6:1 đến 1:1, từ khoảng 5:1 đến 1:1, từ khoảng 4:1 đến 1:1, từ khoảng 3:1 đến 1:1, từ khoảng 2:1 đến 1:1, từ khoảng 20:1 đến 1:1,5, từ khoảng 10:1 đến 1:1,5, từ khoảng 9:1 đến 1:1,5, từ khoảng 8:1 đến 1:1,5, từ khoảng 7:1 đến 1:1,5, từ khoảng 6:1 đến 1:1,5, từ khoảng 5:1 đến 1:1,5, từ khoảng 4:1 đến 1:1,5, từ khoảng 3:1 đến 1:1,5, từ khoảng 2:1 đến 1:1,5, từ khoảng 1,5:1 đến 1:1,5, hoặc từ khoảng 1:1 đến 1:1,5. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 5:1 đến 1:1. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 5:1 đến 1,5:1. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 4:1 đến 1:1. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 4:1 đến 1,5:1. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 8:1 đến khoảng 1:1. Theo một số phương án, tỉ lệ này nằm trong khoảng từ khoảng 2,5:1 đến 1:1.

Chất phản ứng chứa thiol có thể là, ví dụ như, xystein hoặc N-axetyl xystein. Tác nhân khử có thể là, ví dụ như, TCEP. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử có thể được tinh chế trước khi liên hợp, sử dụng ví dụ như, sắc ký cột, thẩm tách, hoặc lọc tuần hoàn có pha loãng. Theo cách khác, kháng thể đã khử không được tinh chế sau khi khử một phần và trước khi liên hợp.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa được khử một phần trong đó ít nhất là một liên kết đisulfua liên chuỗi trong kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử bằng tác nhân khử mà không làm xáo trộn liên kết đisulfua nội chuỗi bất kỳ trong kháng thể có thể hoạt hóa, trong

đó kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng (AB) mà liên kết đặc hiệu với CD71, gốc che giấu (MM) mà ức chế sự liên kết của AB của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt với đích CD71, và gốc có thể phân cắt (CM) ghép nối với AB, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza. Theo một số phương án MM được ghép nối với AB thông qua CM. Theo một số phương án, một hoặc nhiều liên kết đisulfua nội chuỗi của kháng thể có thể hoạt hóa không được làm xáo trộn bằng tác nhân khử. Theo một số phương án, một hoặc nhiều liên kết đisulfua nội chuỗi của MM ở trong kháng thể có thể hoạt hóa không được làm xáo trộn bằng tác nhân khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt có sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB hoặc AB-CM-MM. Theo một số phương án, tác nhân khử là TCEP.

Theo phương án khác nữa, phương pháp khử và liên hợp tác nhân, ví dụ như, thuốc, với kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa dẫn đến sự chọn lọc trong sắp đặt tác nhân bằng cách tạo ra kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa với số lượng xác định và vị trí của gốc lysin và/hoặc xystein. Theo một số phương án, số lượng xác định của gốc lysin và/hoặc xystein cao hơn hoặc thấp hơn so với số lượng của gốc tương ứng trong trình tự axit amin của kháng thể bố mẹ hoặc kháng thể có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, số lượng xác định của gốc lysin và/hoặc xystein có thể dẫn đến số lượng xác định của tác nhân đương lượng mà có thể được liên hợp vào kháng thể kháng-CD71 hoặc kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, số lượng xác định của gốc lysin và/hoặc xystein có thể dẫn đến số lượng xác định của tác nhân đương lượng mà có thể được liên hợp vào kháng thể kháng-CD71 hoặc kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa theo phương thức đặc hiệu vị trí. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa đã cải biến được cải biến bằng một hoặc nhiều axit amin không tự nhiên theo phương thức đặc hiệu vị trí, do đó theo một số phương án làm hạn chế sự liên hợp của các tác nhân với chỉ các vị trí của axit amin không tự nhiên. Theo một số phương án, kháng thể kháng-CD71 hoặc kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa với số lượng xác định và vị trí của gốc lysin và/hoặc xystein có thể được khử một phần bằng tác nhân khử như thảo luận trong bản mô tả này sao cho vị trí liên hợp bất kỳ ở gốc che giấu hoặc phần không phải AB khác của kháng thể có thể hoạt hóa không được khử, và liên hợp tác nhân với thiol liên chuỗi trong AB.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được khử một phần trong đó ít nhất là một liên kết đisulfua liên chuỗi trong kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử bằng tác nhân khử mà không làm xáo trộn liên kết đisulfua nội chuỗi bất kỳ trong kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng (AB) mà liên kết đặc hiệu với đích, ví dụ như, CD71, gốc che giấu (MM) mà ức chế sự liên kết của AB

của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt với đích, và gốc có thể phân cắt (CM) ghép nối với AB, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho ít nhất là một proteaza. Theo một số phương án, MM được ghép nối với AB thông qua CM. Theo một số phương án, một hoặc nhiều liên kết đisulfua nội chuỗi của kháng thể có thể hoạt hóa không được làm xáo trộn bằng tác nhân khử. Theo một số phương án, một hoặc nhiều liên kết đisulfua nội chuỗi của MM ở trong kháng thể có thể hoạt hóa không được làm xáo trộn bằng tác nhân khử. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt có sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB hoặc AB-CM-MM. Theo một số phương án, tác nhân khử là TCEP.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được mô tả trong bản mô tả này còn bao gồm tác nhân được liên hợp vào kháng thể có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, tác nhân được liên hợp là tác nhân trị liệu, chẳng hạn như tác nhân kháng-viêm và/hoặc chống ung thư. Theo phương án này, tác nhân được liên hợp vào gốc carbohyđrat của kháng thể có thể hoạt hóa, ví dụ như, theo một số phương án, trong đó gốc carbohyđrat nằm bên ngoài vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên trong kháng thể có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, tác nhân được liên hợp vào nhóm sulfhyđryl của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên trong kháng thể có thể hoạt hóa.

Theo một số phương án, tác nhân là tác nhân gây độc tế bào chẳng hạn như độc tố (*ví dụ như*, độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc mảnh của chúng), hoặc đồng vị có hoạt tính phóng xạ (*tức là*, thể liên hợp phóng xạ).

Theo một số phương án, tác nhân là gốc có thể phát hiện được chẳng hạn như, ví dụ như, nhãn hoặc chỉ thị khác. Theo một số phương án, gốc có thể phát hiện được là tác nhân chẩn đoán. Ví dụ như, tác nhân là hoặc bao gồm axit amin được gắn nhãn phóng xạ, một hoặc nhiều gốc biotinyl mà có thể được phát hiện bằng aviđin được đánh dấu (*ví dụ như,* streptaviđin chứa chỉ thị huỳnh quang hoặc hoạt tính enzym mà có thể được phát hiện bằng phương pháp huỳnh quang hoặc đo nhiệt lượng), một hoặc nhiều đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ, một hoặc nhiều nhãn huỳnh quang, một hoặc nhiều nhãn enzym, và/hoặc một hoặc nhiều tác nhân phát quang hóa học. Theo một số phương án, gốc có thể phát hiện được gắn bằng phân tử đoạn đệm.

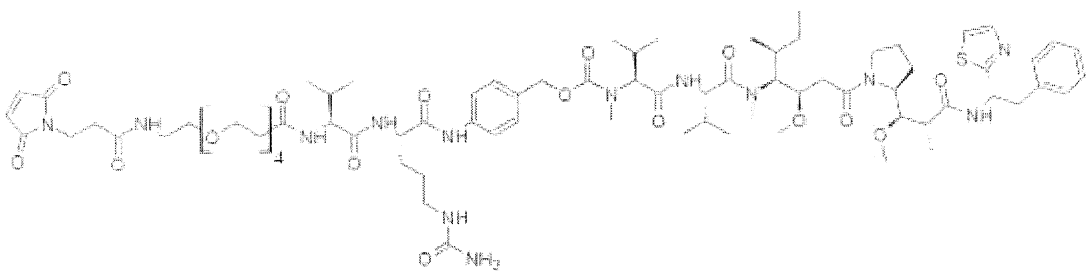
Sáng chế cũng đề cập đến thể liên hợp miễn dịch có chứa kháng thể được liên hợp vào tác nhân gây độc tế bào chẳng hạn như độc tố (*ví dụ như*, độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc mảnh của chúng), hoặc đồng vị có hoạt tính phóng xạ (*tức là*, thể liên hợp phóng xạ). Các tác nhân gây độc tế bào thích hợp bao gồm, ví dụ như, đolastatin và dẫn xuất của chúng (*ví dụ như* auristatin E, AFP, MMAF, MMAE, MMAD, DMAF, DMAE). Ví dụ như, tác nhân là monometyl auristatin E (MMAE) hoặc monometyl auristatin D (MMAD).

Theo một số phương án, tác nhân là dolastatin. Theo một số phương án, tác nhân là auristatin hoặc dẫn xuất của chúng. Theo một số phương án, tác nhân là auristatin E hoặc dẫn xuất của chúng. Theo một số phương án, tác nhân là monometyl auristatin E (MMAE). Theo một số phương án, tác nhân là monometyl auristatin D (MMAD). Theo một số phương án, tác nhân là maytansinoit hoặc dẫn xuất maytansinoit.

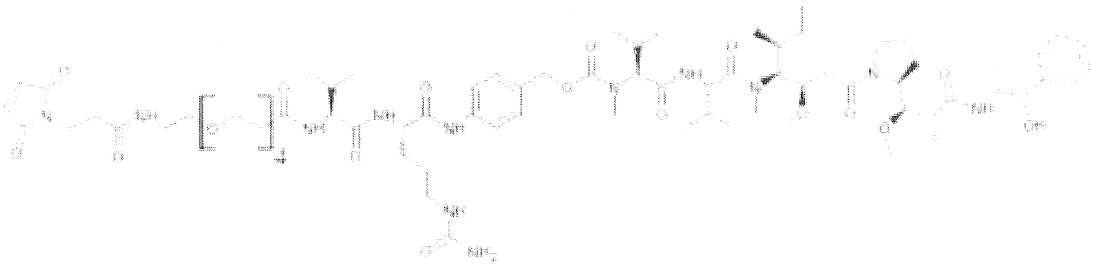
Theo một số phương án, cầu nối và độc tố được liên hợp vào AB có chứa gốc SPDB-DM4, gốc vc-MMAD, gốc vc-MMAE, vc-đuocarmyxin, hoặc gốc PEG2-vc-MMAD. Theo một số phương án, cầu nối là cầu nối có thể phân cắt được. Theo một số phương án, cầu nối là cầu nối không có thể phân cắt được. Theo một số phương án, tác nhân là gốc có thể phát hiện được.

Theo một số phương án, tác nhân được liên kết vào AB bằng cách sử dụng cầu nối maleimit caproyl-valin-xitrullin hoặc cầu nối maleimit PEG-valin-xitrullin. Theo một số phương án, tác nhân được liên kết vào AB bằng cách sử dụng cầu nối maleimit caproyl-valin-xitrullin. Theo một số phương án, tác nhân là monometyl auristatin E (MMAE) được liên kết với AB bằng cách sử dụng cầu nối maleimit caproyl-valin-xitrullin, và cấu trúc tải cầu nối này được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng "vc-MMAE." Theo một số phương án, tác nhân được liên kết vào AB bằng cách sử dụng cầu nối maleimit PEG-valin-xitrullin. Theo một số phương án, tác nhân là monometyl auristatin D (MMAD) được liên kết với AB bằng cách sử dụng cầu nối maleimit tetra-PEG-valin-xitrullin-para-aminobenzyloxycarbonyl, và cấu trúc tải cầu nối này được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng "PEG4-vc-MMAD." Theo một số phương án, tác nhân là monometyl auristatin E (MMAE) được liên kết với AB bằng cách sử dụng cầu nối maleimit tetra-PEG-valin-xitrullin-para-aminobenzyloxycarbonyl, và cấu trúc tải cầu nối này được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng "PEG4-vc-MMAE." Theo một số phương án, tác nhân được liên kết vào AB bằng cách sử dụng cầu nối maleimit PEG-valin-xitrullin. Theo một số phương án, tác nhân là monometyl auristatin D (MMAD) được liên kết với AB bằng cách sử dụng cầu nối maleimit bis-PEG-valin-xitrullin-para-aminobenzyloxycarbonyl, và cấu trúc tải cầu nối này được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng "PEG2-vc-MMAD." Cấu trúc của PEG4-vc-MMAD, PEG4-vc-MMAE, PEG2-vc-MMAD, và vc-MMAE được thể hiện dưới đây:

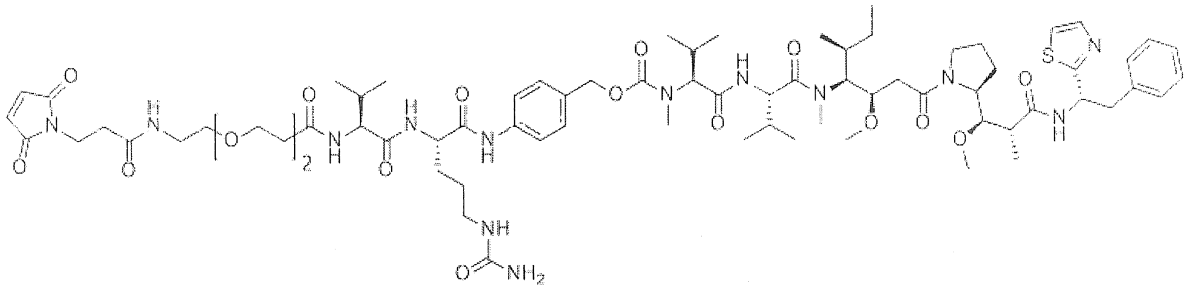
PEG4-vc-MMAD:



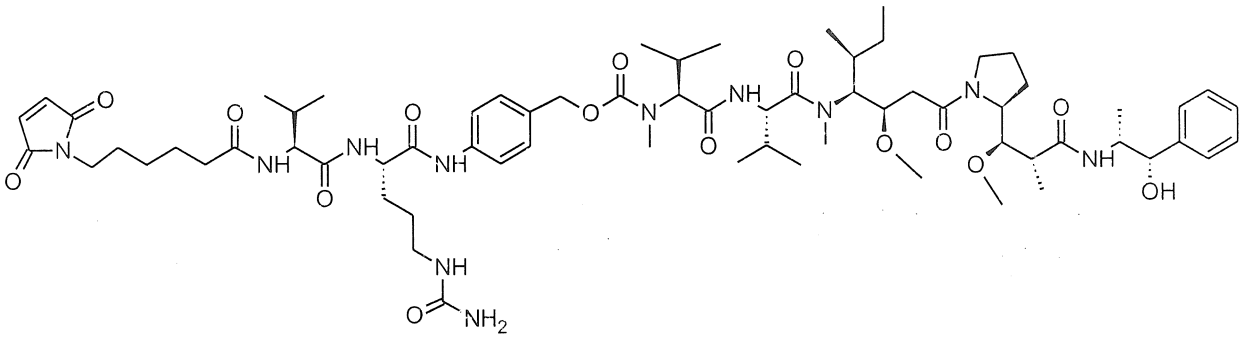
PEG4-vc-MMAE:



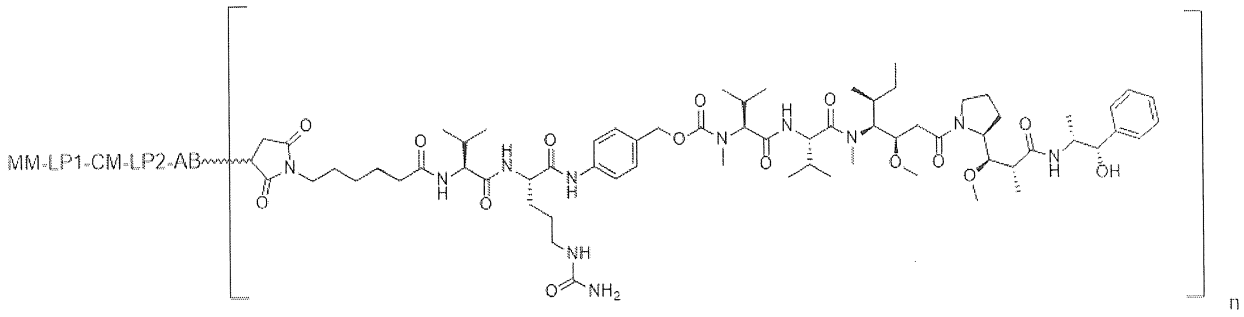
PEG2-vc-MMAD:



vc-MMAE



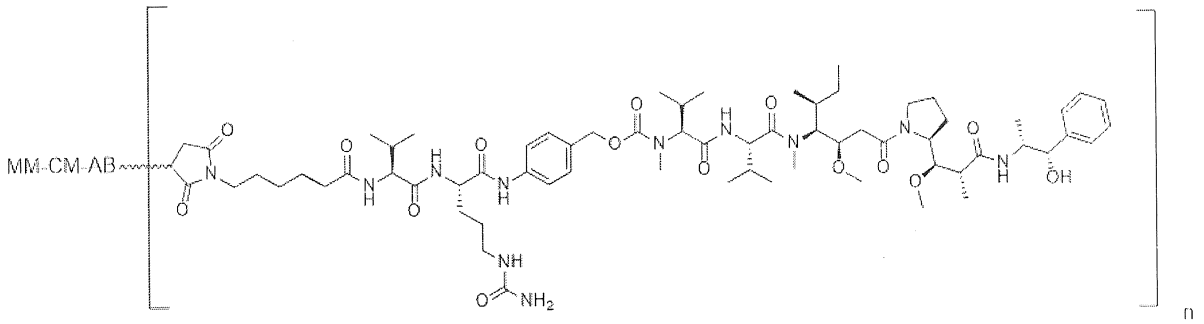
Sáng chế còn đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà bao gồm kháng thể có thể hoạt hóa được liên kết với vcMMAE, mà là tải lượng monometyl auristatin E (MMAE) với cầu nối val-cit (vc), trong đó kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm kháng thể (AB) mà liên kết đặc hiệu với đích, gốc che giấu (MM) ghép nối với AB mà ức chế sự liên kết của AB với đích khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, và gốc có thể phân cắt (CM) ghép nối với AB, và CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng:



Công thức (I)

trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với đích và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng, chuỗi nặng, và/hoặc một hoặc nhiều vùng CDR chuỗi nặng (CDRH). AB còn bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ, chuỗi nhẹ, và/hoặc một hoặc nhiều vùng CDR chuỗi nhẹ (CDRL). Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) còn bao gồm gốc che giấu (MM) trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với đích của nó khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, gốc liên kết thứ nhất (LP1), gốc có thể phân cắt (CM) trong đó CM, và gốc liên kết thứ hai (LP2). Trong phương án cụ thể của Công thức (I), "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng:



Công thức (II)

trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với đích và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng, chuỗi nặng, và/hoặc một hoặc nhiều vùng CDR chuỗi nặng (CDRH). AB còn bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ, chuỗi nhẹ, và/hoặc một hoặc nhiều vùng CDR chuỗi nhẹ (CDRL). Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) còn bao gồm gốc che giấu (MM) trong đó MM ức chế sự

liên kết của AB với đích của nó khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, và gốc có thể phân cắt (CM) trong đó CM. Trong phương án cụ thể của Công thức (II), "n" bằng 2. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB có chứa isotyp IgG1. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II) trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (II), trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I) hoặc (II), đích là CD71 động vật có vú. Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I) hoặc (II), đích là CD71 người.

Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I) hoặc (II), AB bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự CDRH1 có chứa SEQ ID NO: 9, trình tự CDRH2 có chứa SEQ ID NO: 10, và trình tự CDRH3 có chứa SEQ ID NO: 11, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự CDRL1 có chứa SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO:13, trình tự CDRL2 có chứa SEQ ID NO: 14, và trình tự CDRL3 có chứa SEQ ID NO: 15, MM bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, và CM bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, và "n" bằng 2. Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I), AB bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự CDRH1 có chứa SEQ ID NO: 9, trình tự CDRH2 có chứa SEQ ID NO: 10, và trình tự CDRH3 có chứa SEQ ID NO: 11, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự CDRL1 có chứa SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO:13, trình tự CDRL2 có chứa SEQ ID NO: 14, và trình tự CDRL3 có chứa SEQ ID NO: 15, MM bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, LP1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207, CM bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, và LP2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38, và "n" bằng 2.

Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I) hoặc (II), AB bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, MM bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, và CM bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, và "n" bằng 2. Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I), AB bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7, MM bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, LP1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207, CM bao gồm trình

tự nêu trong SEQ ID NO: 156, và LP2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38, và "n" bằng 2.

Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I) hoặc (II), AB bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19, MM bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, và CM bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, và "n" bằng 2. Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I), AB bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19, MM bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, LP1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207, CM bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, và LP2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38, và "n" bằng 2.

Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I) hoặc (II), AB bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 169, và "n" bằng 2. Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I), AB bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 169, và "n" bằng 2. Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I) hoặc (II), AB bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 201, và "n" bằng 2.

Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I) hoặc (II), AB bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế có Công thức (I) hoặc (II), AB bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà bao gồm kháng thể có thể hoạt hóa được liên kết với tải lượng monometyl auristatin D (MMAD), trong đó kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng (AB) mà liên kết đặc hiệu với đích, gốc che giấu (MM) mà ức chế sự liên kết của AB của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt với đích, và gốc có thể phân cắt (CM) ghép nối với AB, và CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho ít nhất là một MMP proteaza.

Theo một số phương án, MMAD-kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có thể được liên hợp bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số một vài phương pháp để gắn các tác nhân với

AB: (a) gắn vào gốc carbohyđrat của AB, hoặc (b) gắn vào nhóm sulfhyđryl của AB, hoặc (c) gắn vào nhóm amino của AB, hoặc (d) gắn vào nhóm carboxylat của AB.

Theo một số phương án, tải lượng MMAD được liên hợp vào AB thông qua cầu nối. Theo một số phương án, tải lượng MMAD được liên hợp vào xystein trong AB thông qua cầu nối. Theo một số phương án, tải lượng MMAD được liên hợp vào lysin trong AB thông qua cầu nối. Theo một số phương án, tải lượng MMAD được liên hợp vào gốc khác của AB thông qua cầu nối, chẳng hạn như các gốc được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, cầu nối là cầu nối chứa thiol. Theo một số phương án, cầu nối là cầu nối có thể phân cắt được. Theo một số phương án, cầu nối là cầu nối không có thể phân cắt được. Theo một số phương án, cầu nối được chọn từ nhóm gồm có cầu nối được thể hiện trong Bảng (II) và Bảng (III). Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa và tải lượng MMAD được liên kết thông qua cầu nối maleimit caproyl-valin-xitrullin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa và tải lượng MMAD được liên kết thông qua cầu nối maleimit PEG-valin-xitrullin. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa và tải lượng MMAD được liên kết thông qua cầu nối maleimit caproyl-valin-xitrullin-para-aminobenzyloxycarbonyl. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa và tải lượng MMAD được liên kết thông qua cầu nối maleimit PEG-valin-xitrullin-para-aminobenzyloxycarbonyl. Theo một số phương án, tải lượng MMAD được liên hợp vào AB bằng cách sử dụng công nghệ khử một phần và liên hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, thành phần polyetylen glycol (PEG) của cầu nối theo sáng chế được tạo thành từ 2 monome etylen glycol, 3 monome etylen glycol, 4 monome etylen glycol, 5 monome etylen glycol, 6 monome etylen glycol, 7 monome etylen glycol 8 monome etylen glycol, 9 monome etylen glycol, hoặc ít nhất là 10 monome etylen glycol. Theo một số phương án theo sáng chế, thành phần PEG là polyme mạch nhánh. Theo một số phương án theo sáng chế, thành phần PEG là polyme không có mạch nhánh. Theo một số phương án, thành phần polyme PEG được chức hóa với nhóm amino hoặc dẫn xuất của chúng, nhóm carboxyl hoặc dẫn xuất của chúng, hoặc cả nhóm amino hoặc dẫn xuất của chúng và nhóm carboxyl hoặc dẫn xuất của chúng.

Theo một số phương án, thành phần PEG của cầu nối theo sáng chế là nhóm amino-tetra-etylen glycol-carboxyl hoặc dẫn xuất của chúng. Theo một số phương án, thành phần PEG của cầu nối theo sáng chế là nhóm amino-tri-etylen glycol-carboxyl hoặc dẫn xuất của chúng. Theo một số phương án, thành phần PEG của cầu nối theo sáng chế là nhóm amino-đi-etylen glycol-carboxyl hoặc dẫn xuất của chúng. Theo một số phương án, dẫn xuất amino là sự tạo thành của liên kết amit giữa nhóm amino và nhóm carboxyl mà nó được liên hợp với. Theo một số phương án, dẫn xuất carboxyl là sự tạo thành của liên kết amit giữa nhóm carboxyl và nhóm amino mà nó được liên hợp

với. Theo một số phương án, dẫn xuất carboxyl là sự tạo thành của liên kết este giữa nhóm carboxyl và nhóm hyđroxyl mà nó được liên hợp với.

Độc tố có hoạt tính enzym và mảnh của chúng mà có thể được sử dụng bao gồm chuỗi A độc tố bạch hầu, mảnh hoạt tính không liên kết của độc tố bạch hầu, chuỗi A ngoại độc tố (từ Pseudomonas aeruginosa), chuỗi A rixin, chuỗi A abrin, chuỗi A modeccin, alpha-sarcin, protein Aleurites fordii, protein đianthin, protein Phytolaca americana (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curxin, crotin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và tricothexen. Nhiều loại nuclit phóng xạ có sẵn để sản xuất kháng thể được liên hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, và ^{186}Re.

Các thể liên hợp của kháng thể và tác nhân gây độc tế bào được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều tác nhân ghép nối protein hai chức năng chẳng hạn như N-sucxinimiđyl-3-(2-pyriđylđithiol) propionat (SPDP), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức năng của imiđoeste (chẳng hạn như đimetyl ađipimiđat HCL), este hoạt tính (chẳng hạn như đisucxinimiđyl suberat), alđehyt (chẳng hạn như glutarelđehyt), hợp chất bis-aziđo (chẳng hạn như bis (p-aziđobenzoyl) hexanđiamin), dẫn xuất bis-điazoni (chẳng hạn như bis-(p-điazonibenzoyl)-etylenđiamin), điisoxyanat (chẳng hạn như tolyen 2,6-điisoxyanat), và hợp chất bis-flo hoạt tính (chẳng hạn như 1,5-điflo-2,4-đinitrobenzen). Ví dụ như, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được mô tả trong Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metylđietylen triaminepentaaxetic được gắn nhãn cacbon-14 (MX-DTPA) là tác nhân càng hóa ví dụ để liên hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể. (*Xem* WO94/11026).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng lượng lớn của các gốc có thể được có thể được ghép nối với kháng thể thu được theo sáng chế. (*Xem, ví dụ như*, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), toàn bộ nội dung của chúng được kết hợp trong bản mô tả này để tham khảo).

Việc ghép nối có thể được thực hiện bằng phản ứng hóa học bất kỳ mà sẽ liên kết hai phân tử miễn là kháng thể và gốc kia giữ lại hoạt tính tương ứng của chúng. Sự liên kết này có thể bao gồm nhiều cơ chế hóa học, ví dụ như liên kết cộng hóa trị, liên kết ái lực, sự kẹp giữa, liên kết phối trí và sự tạo phức. Theo một số phương án, sự liên kết là, tuy nhiên, liên kết cộng hóa trị. Liên kết cộng hóa trị có thể đạt được bằng sự ngưng tụ trực tiếp của các chuỗi bên hiện có hoặc bằng sự kết hợp của các phân tử bắc cầu bên ngoài. Nhiều tác nhân liên kết hóa trị hai hoặc đa hóa trị hữu dụng trong việc ghép nối protein phân tử, chẳng hạn như kháng thể theo sáng chế, với phân tử khác. Ví dụ như, các tác nhân ghép nối đại diện có thể bao gồm hợp chất hữu cơ chẳng hạn như thioeste, carbođiimit, sucxinimit este, điisoxyanat, glutaralđehyt, điazobenzen và hexametylen điamin. Danh

sách này không được dự định là toàn diện của các nhóm khác nhau của các tác nhân ghép nối đã biết trong lĩnh vực nhưng, ngoài ra, là ví dụ của các tác nhân ghép nối phổ biến hơn. (*Xem* Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); và Vitetta et al., Science 238:1098 (1987).

Theo một số phương án, ngoài hợp phần và phương pháp được đề xuất ở đây, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp cũng có thể được cải biến để liên hợp đặc hiệu vị trí thông qua trình tự axit amin được cải biến được cài xen hoặc được bao gồm theo cách khác trong trình tự kháng thể có thể hoạt hóa. Các trình tự axit amin được cải biến này được thiết kế để cho phép sự sắp đặt có kiểm soát và/hoặc liều lượng của tác nhân được liên hợp ở trong kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp. Ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được thiết kế để bao gồm sự thế xystein ở các vị trí trên chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mà tạo ra nhóm thiol phản ứng và không ảnh hưởng bất lợi đến sự cuộn gập và lắp ráp protein, không làm thay đổi sự liên kết kháng nguyên. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được thiết kế để bao gồm hoặc đưa vào theo cách khác một hoặc nhiều gốc axit amin không tự nhiên ở trong kháng thể có thể hoạt hóa để tạo ra vị trí thích hợp cho sự liên hợp. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được thiết kế để bao gồm hoặc đưa vào theo cách khác trình tự peptit có thể hoạt hóa enzym ở trong trình tự kháng thể có thể hoạt hóa.

Cầu nối thích hợp được mô tả trong tài liệu. (*Xem*, *ví dụ như*, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984) mô tả việc sử dụng MBS (M-maleimiđobenzoyl-N-hyđroxysucxinimit este). *Cũng xem*, Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5,030,719, mô tả việc sử dụng dẫn xuất axetyl hyđrazit được halogen hóa ghép nối với kháng thể bằng cầu nối oligopeptit. Theo một số phương án, cầu nối thích hợp bao gồm: (i) EDC (1-etyl-3-(3-đimetylamino-propyl) carbođiimit hyđroclorua; (ii) SMPT (4-sucxinimiđyloxycarbonyl-alpha-metyl-alpha-(2-priđyl-đithio)-toluen (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (sucxinimiđyl-6 [3-(2-pyriđylđithio) propionamiđo]hexanoat (Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosucxinimiđyl 6 [3-(2-pyriđylđithio)-propianamit] hexanoat (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); và (v) sulfo-NHS (N-hyđroxysulfo-sucxinimit: Pierce Chem. Co., Cat. #24510) được liên hợp vào EDC. Các cầu nối khác bao gồm, nhưng giới hạn ở, SMCC ((sucxinimiđyl 4-(N-maleimiđometyl)xyclohexan-1-carboxylat), sulfo-SMCC (sulfosucxinimiđyl 4-(N-maleimiđometyl)xyclohexan-1-carboxylat), SPDB (N-sucxinimiđyl-4-(2-pyriđylđithio) butanoat), hoặc sulfo-SPDB (N-sucxinimiđyl-4-(2-pyriđylđithio)-2-sulfo butanoat).

Cầu nối được mô tả ở trên chứa các thành phần mà có đóng góp khác nhau, do đó dẫn đến các thể liên hợp với các tính chất lý-hóa khác nhau. Ví dụ như, sulfo-NHS este của alkyl carboxylat ổn định hơn so với sulfo-NHS este của carboxylat thơm. NHS-este chứa cầu nối ít tan hơn so với

sulfo-NHS este. Ngoài ra, cầu nối SMPT chứa liên kết đisulfua bị cản trở về mặt không gian, và có thể tạo thành các thể liên hợp có độ ổn định tăng. Liên kết đisulfua, nhìn chung, ít ổn định hơn so với các liên kết khác bởi vì liên kết đisulfua được phân cắt *in vitro*, dẫn đến ít thể liên hợp sẵn sàng hơn. Sulfo-NHS, cụ thể là, có thể tăng cường độ ổn định của sự ghép nối carbođimit. Sự ghép nối carbođimit (chẳng hạn như EDC) khi dùng kết hợp với sulfo-NHS, tạo thành este mà kháng đối với sự thủy phân hơn so với phản ứng ghép nối carbođimit một mình.

Theo một số phương án, cầu nối là có thể phân cắt. Theo một số phương án, cầu nối là không thể phân cắt. Theo một số phương án, hai hoặc hơn hai cầu nối có mặt. Hai hoặc hơn hai cầu nối đều giống nhau, *tức là*, có thể phân cắt hoặc không thể phân cắt, hoặc hai hoặc hơn hai cầu nối là khác nhau, *tức là*, ít nhất là một cầu nối có thể phân cắt và ít nhất là một cầu nối không thể phân cắt.

Sáng chế sử dụng một vài phương pháp để gắn các tác nhân với AB: (a) gắn vào gốc carbohyđrat của AB, hoặc (b) gắn vào nhóm sulfhyđryl của AB, hoặc (c) gắn vào nhóm amino của AB, hoặc (d) gắn vào nhóm carboxylat của AB. Theo sáng chế, AB có thể được gắn cộng hóa trị vào tác nhân thông qua cầu nối trung gian có ít nhất là hai nhóm phản ứng, một nhóm phản ứng với AB và một nhóm phản ứng với tác nhân. Cầu nối, mà có thể bao gồm hợp chất hữu cơ tương thích bất kỳ, có thể được chọn sao cho phản ứng với AB (hoặc tác nhân) không ảnh hưởng bất lợi đến khả năng phản ứng AB và sự chọn lọc. Hơn nữa, sự gắn của cầu nối với tác nhân có thể không phá hủy hoạt tính của tác nhân. Cầu nối thích hợp để phản ứng với kháng thể được oxy hóa hoặc mảnh kháng thể được oxy hóa bao gồm cầu nối chứa amin được chọn từ nhóm gồm có các nhóm amin bậc một, amin bậc hai, hyđrazin, hyđrazit, hyđroxylamin, phenylhyđrazin, semicarbazit và thiosemicarbazit. Các nhóm chức phản ứng này có thể tồn tại dưới dạng một phần của cấu trúc của cầu nối, hoặc có thể được đưa vào bằng sự cải biến hóa học thích hợp của cầu nối không chứa các nhóm này.

Theo sáng chế, cầu nối thích hợp để gắn vào được làm giảm AB bao gồm cầu nối có nhóm phản ứng nhất định có khả năng phản ứng với nhóm sulfhyđryl của kháng thể hoặc mảnh được khử. Nhóm phản ứng này bao gồm, nhưng giới hạn ở: các nhóm haloalkyl phản ứng (bao gồm, ví dụ như, các nhóm haloaxetyl), các nhóm p-mercuribenzoat và các nhóm có khả năng phản ứng cộng kiểu Michael (bao gồm, ví dụ như, maleimit và các nhóm thuộc loại được mô tả bởi Mitra and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110).

Theo sáng chế, cầu nối thích hợp để gắn vào Ab không được oxy hóa hay khử bao gồm cầu nối có các nhóm chức nhất định có khả năng phản ứng với nhóm amino bậc một có mặt trong gốc lysin không được cải biến trong Ab. Nhóm phản ứng này bao gồm, nhưng giới hạn ở, NHS carboxylic hoặc carbonic este, sulfo-NHS carboxylic hoặc carbonic este, 4-nitrophenyl carboxylic

hoặc carbonic este, pentaflophenyl carboxylic hoặc carbonic este, axyl imiđazol, isoxyanat, và isothioxyanat.

Theo sáng chế, cầu nối thích hợp để gắn vào Ab không được oxy hóa hay khử bao gồm cầu nối có các nhóm chức nhất định có khả năng phản ứng với các nhóm axit carboxylic có mặt trong gốc aspartat hoặc glutamat trong Ab, mà đã được hoạt hóa bằng chất phản ứng thích hợp. Chất phản ứng hoạt hóa thích hợp bao gồm EDC, có hoặc không có NHS hoặc sulfo-NHS được bổ sung, và các tác nhân đehyđrat hóa dùng cho sự tạo thành carboxamit. Trong các trường hợp này, các nhóm chức có mặt trong cầu nối thích hợp bao gồm amin bậc một và bậc hai, hyđrazin, hyđroxylamin, và hyđrazit.

Tác nhân có thể được gắn vào cầu nối trước hoặc sau cầu nối được gắn vào AB. Trong các ứng dụng nhất định có thể muốn trước hết tạo ra hợp chất trung gian AB-cầu nối trong đó cầu nối không có tác nhân được kết hợp. Tùy thuộc vào ứng dụng cụ thể, sau đó tác nhân cụ thể có thể được gắn cộng hóa trị vào cầu nối. Theo một số phương án, AB trước hết được gắn vào MM, CM và cầu nối kết hợp và sau đó được gắn vào cầu nối nhằm mục đích liên hợp.

Cầu nối phân nhánh: Trong phương án cụ thể, cầu nối phân nhánh mà có nhiều vị trí để gắn các tác nhân được sử dụng. Đối với cầu nối nhiều vị trí, sự gắn cộng hóa trị đơn lẻ vào AB sẽ dẫn đến hợp chất trung gian AB-cầu nối có khả năng liên kết tác nhân ở một số lượng vị trí. Các vị trí này có thể là nhóm alđehyt hoặc sulfhyđryl hoặc vị trí hóa học bất kỳ mà các tác nhân có thể được gắn vào.

Theo một số phương án, hoạt tính đặc hiệu cao hơn (hoặc tỉ lệ cao hơn của các tác nhân với AB) có thể đạt được bằng cách gắn cầu nối vị trí đơn lẻ ở nhiều vị trí trên AB. Nhiều vị trí này có thể được đưa vào trong AB bằng một trong hai phương pháp. Trước hết, một vị trí có thể tạo ra nhiều nhóm alđehyt và/hoặc nhóm sulfhyđryl trong cùng AB. Thứ hai, một vị trí có thể gắn vào alđehyt hoặc sulfhyđryl của AB "cầu nối phân nhánh" có nhiều vị trí chức năng để sau đó gắn vào cầu nối. Các vị trí chức năng của cầu nối phân nhánh hoặc cầu nối nhiều vị trí có thể là nhóm alđehyt hoặc sulfhyđryl, hoặc có thể là vị trí hóa học bất kỳ mà cầu nối có thể được gắn vào. Hoạt tính đặc hiệu cao hơn nữa có thể thu được bằng cách kết hợp hai phương pháp này, tức là, gắn cầu nối nhiều vị trí ở một vài vị trí trên AB.

Cầu nối có thể phân cắt được: Cầu nối peptit mà dễ bị phân cắt bằng enzym của hệ thống bổ thể, chẳng hạn như nhưng không giới hạn ở chất hoạt hóa u-plasminogen, chất hoạt hóa plasminogen mô, trypsin, plasmin, hoặc enzym khác có hoạt tính phân giải protein có thể được dùng trong một phương án theo sáng chế. Theo một phương pháp theo sáng chế, tác nhân được gắn thông qua cầu nối dễ bị phân cắt bằng bổ thể. Kháng thể được chọn từ lớp mà có thể hoạt hóa bổ thể. Do đó, thể liên hợp kháng thể-tác nhân hoạt hóa luồng bổ thể và giải phóng tác nhân tại vị trí

đích. Theo phương pháp khác theo sáng chế, tác nhân được gắn thông qua cầu nối dễ bị phân cắt bằng enzym có hoạt tính phân giải protein chẳng hạn như chất hoạt hóa u-plasminogen, chất hoạt hóa plasminogen mô, plasmin, hoặc trypsin.

Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế của trình tự cầu nối có thể phân cắt được được đề xuất trong Bảng (II).

Bảng (II): Trình tự cầu nối ví dụ để liên hợp

Các loại trình tự có thể phân cắt	Trình tự axit amin
Trình tự có thể phân cắt plasmin	
Pro-urokinaza	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 110) PRFRIIGG (SEQ ID NO: 111)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 112)
Plasminogen	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 113)
Staphylokinaza	SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 114) SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 115)
Trình tự có thể phân cắt yếu tố Xa	IEGR (SEQ ID NO: 116) IDGR (SEQ ID NO: 117) GGSIDGR (SEQ ID NO: 118)
Trình tự có thể phân cắt MMP	
Gelatinaza A	PLGLWA (SEQ ID NO: 119)
Trình tự có thể phân cắt colagenaza	
Ccolagen da bê (chuỗi α1(I))	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 120)
Colagen da bê (chuỗi α2(I))	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 121)
Colagen sụn bò (chuỗi α1(II))	GIAGQ (SEQ ID NO: 122)
Colagen gan người (chuỗi α1(III))	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 123)
α_2M người	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 124)
PZP người	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 125) AGLGVVER (SEQ ID NO: 126) AGLGISST (SEQ ID NO: 127)
α_1M chuột	EPQALAMS (SEQ ID NO: 128) QALAMSAI (SEQ ID NO: 129)
α_2M chuột	AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 130) MDAFLESS (SEQ ID NO: 131)
α_1I_3(2J) chuột	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 132)
α_1I_3(27J) chuột cống	SAPAVESE (SEQ ID NO: 133)
Colagenaza nguyên bào sợi người (sự tự phân cắt)	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 134) VAQFVLTE (SEQ ID NO: 135) AQFVLTEG (SEQ ID NO: 136) PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 137)

Ngoài ra, các tác nhân có thể được gắn thông qua liên kết đisulfua (ví dụ như, liên kết đisulfua trên phân tử xystein) vào AB. Vì nhiều khối u giải phóng một cách tự nhiên hàm lượng cao của glutathion (tác nhân khử) điều này có thể làm giảm liên kết đisulfua với sự giải phóng tiếp theo của tác nhân tại vị trí phân phối. Theo một số phương án, tác nhân khử mà sẽ cải biến CM cũng sẽ cải biến cầu nối của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp.

Đoạn đệm và thành phần có thể phân cắt: Theo một số phương án, có thể cần phải tạo cấu trúc cầu nối theo cách để tối ưu hóa sự cách quãng giữa tác nhân và AB của kháng thể có thể hoạt hóa. Điều này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng cầu nối có cấu trúc chung:

$W - (CH_2)n - Q$

trong đó

W là --NH--CH_2-- hoặc --CH_2--;

Q là axit amin, peptit; và

n là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 20.

Theo một số phương án, cầu nối có thể có chứa thành phần đoạn đệm và thành phần có thể phân cắt. Thành phần đoạn đệm có chức năng định vị thành phần có thể phân cắt ra xa khỏi lõi của AB sao cho thành phần có thể phân cắt dễ tiếp cận hơn đối với enzym chịu trách nhiệm đối với sự phân cắt. Cầu nối phân nhánh nhất định được mô tả ở trên có thể đóng vai trò làm thành phần đoạn đệm.

Trong toàn bộ bản mô tả này, cần hiểu rằng sự gắn của cầu nối với tác nhân (hoặc của thành phần đoạn đệm vơi thành phần có thể phân cắt, hoặc thành phần có thể phân cắt với tác nhân) không cần phải theo phương thức gắn hoặc phản ứng cụ thể. Phản ứng bất kỳ tạo ra sản phẩm có độ ổn định và khả năng tương thích sinh học thích hợp có thể chấp nhận được.

Bổ thể huyết thanh và chọn lọc cầu nối: Theo một phương pháp của sáng chế, khi sự giải phóng của tác nhân được mong muốn, AB mà là kháng thể thuộc lớp mà có thể hoạt hóa bổ thể được sử dụng. Thể liên hợp thu được giữ lại cả hai khả năng để liên kết kháng nguyên và hoạt hóa luồng bổ thể. Do đó, theo phương án này của sáng chế, tác nhân được kết hợp vào một đầu của cầu nối có thể phân cắt được hoặc thành phần có thể phân cắt và đầu kia của nhóm cầu nối được gắn vào vị trí cụ thể trên AB. Ví dụ như, nếu tác nhân có nhóm hyđroxy hoặc nhóm amino, nó có thể được gắn vào đầu tận cùng carboxy của peptit, axit amin hoặc cầu nối được chọn thích hợp khác lần lượt thông qua liên kết este hoặc amit. Ví dụ như, các tác nhân này có thể được gắn vào cầu nối peptit thông qua phản ứng carbođimit. Nếu tác nhân chứa các nhóm chức mà sẽ cản trở việc gắn vào cầu nối, các nhóm chức cản trở này có thể bị phong bế trước khi gắn và được khử phong bế khi thể liên hợp hoặc hợp chất trung gian sản phẩm được tạo ra. Sau đó đầu tận cùng đối diện hoặc

amino của cầu nối được sử dụng trực tiếp hoặc sau khi cải biến thêm để liên kết với AB mà có khả năng hoạt hóa bổ thể.

Cầu nối (hoặc thành phần đoạn đệm của cầu nối) có thể có chiều dài mong muốn bất kỳ, một đầu của chúng có thể được gắn cộng hóa trị vào các vị trí đặc hiệu trên AB của kháng thể có thể hoạt hóa. Đầu kia của cầu nối hoặc thành phần đoạn đệm có thể được gắn vào cầu nối axit amin hoặc peptit.

Do đó khi các thể liên hợp này liên kết với kháng nguyên trong sự có mặt của bổ thể liên kết amit hoặc este mà gắn tác nhân vào cầu nối sẽ được phân cắt, dẫn đến giải phóng của tác nhân ở dạng hoạt tính của nó. Các thể liên hợp này, khi dùng cho đối tượng, sẽ thực hiện việc phân phối và giải phóng tác nhân tại vị trí đích, và cụ thể là hữu hiệu để phân phối *in vivo* các tác nhân dược, kháng sinh, chất chống chuyển hóa, các tác nhân chống tăng sinh và dạng tương tự.

Cầu nối để giải phóng mà không hoạt hóa bổ thể: Trong ứng dụng khác nữa của việc phân phối nhắm đích, sự giải phóng của tác nhân mà không sự hoạt hóa bổ thể được mong muốn vì sự hoạt hóa của luồng bổ thể cuối cùng sẽ dung giải tế bào đích. Do đó, phương pháp này hữu dụng khi việc phân phối và giải phóng tác nhân cần được thực hiện mà không giết chết tế bào đích. Đó là mục tiêu khi mong muốn phân phối chất điều biến tế bào chẳng hạn như hormon, enzym, corticosteroit, chất dẫn truyền thần kinh, gen hoặc enzym với đích tế bào. Các thể liên hợp này có thể được điều chế bằng cách gắn tác nhân vào AB mà không có khả năng hoạt hóa bổ thể thông qua cầu nối mà khá dễ bị phân cắt bởi proteaza huyết thanh. Khi thể liên hợp này được dùng cho cá thể, phức hợp kháng nguyên-kháng thể sẽ nhanh chóng tạo thành trong khi đó sự phân cắt của tác nhân sẽ xảy ra từ từ, do đó dẫn đến sự giải phóng của hợp chất tại vị trí đích.

Cầu nối chéo sinh hóa: Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được liên hợp vào một hoặc nhiều trị liệu các tác nhân sử dụng các cầu nối chéo sinh hóa nhất định. Chất phản ứng liên kết chéo tạo thành cầu nối phân tử mà buộc các nhóm chức của hai phân tử khác nhau lại với nhau. Để liên kết hai protein khác nhau theo phương thức từng bước, cầu nối chéo hai chức dị loại có thể được sử dụng mà loại trừ sự tạo thành homopolyme không mong muốn.

Cầu nối peptiđyl có thể phân cắt bằng proteaza lysosom cũng hữu dụng, ví dụ như, Val-Cit, Val-Ala hoặc các đipeptit khác. Ngoài ra, cầu nối không bền trong axit có thể phân cắt trong môi trường có độ pH thấp của lysosom có thể được sử dụng, ví dụ như: bis-sialyl ete. Cầu nối thích hợp khác bao gồm cơ chất không bền trong cathepsin, cụ thể là cầu nối mà thể hiện chức năng tối ưu ở độ pH axit.

Cầu nối chéo hai chức dị loại ví dụ được nêu trong Bảng (III).

Bảng (III): Cầu nối chéo hai chức dị loại ví dụ

CẦU NỐI CHÉO HAI CHỨC DỊ LOẠI

Cầu nối	Phản ứng với	Ưu điểm và ứng dụng	Chiều dài nhánh đoạn đệm sau khi liên kết chéo (ăngstrong)
SMPT	Amin bậc một Sulfhyđryl	Độ ổn định lớn hơn	11,2 Å
SPDP	Amin bậc một Sulfhyđryl	Thiolation Liên kết chéo có thể phân cắt	6,8 Å
LC-SPDP	Amin bậc một Sulfhyđryl	Nhánh đoạn đệm kéo dài	15,6 Å
Sulfo-LC-SPDP	Amin bậc một Sulfhyđryl	Nhánh đoạn đệm dài hơn Tan trong nước	15,6 Å
SMCC	Amin bậc một Sulfhyđryl	Nhóm phản ứng maleimit ổn định Sự liên hợp enzym-kháng thể Sự liên hợp hapten-protein mang	11,6 Å
Sulfo-SMCC	Amin bậc một Sulfhyđryl	Nhóm phản ứng maleimit ổn định Tan trong nước Sự liên hợp enzym-kháng thể	11,6 Å
MBS	Amin bậc một Sulfhyđryl	Sự liên hợp enzym-kháng thể Sự liên hợp hapten-protein mang	9,9 Å
Sulfo-MBS	Amin bậc một Sulfhyđryl	Tan trong nước	9,9 Å
SIAB	Amin bậc một Sulfhyđryl	Sự liên hợp enzym-kháng thể	10,6 Å
Sulfo-SIAB	Amin bậc một Sulfhyđryl	Tan trong nước	10,6 Å
SMPB	Amin bậc một Sulfhyđryl	Nhánh đoạn đệm kéo dài Sự liên hợp enzym-kháng thể	14,5 Å
Sulfo-SMPB	Amin bậc một Sulfhyđryl	Nhánh đoạn đệm kéo dài Tan trong nước	14,5 Å

EDE/Sulfo-NHS	Amin bậc một Nhóm carboxyl	Sự liên hợp hapten-chất mang	0
ABH	Carbohyđrat Không chọn lọc	Phản ứng với các nhóm đường	11,9 Å

Cầu nối không có thể phân cắt được hoặc gắn trực tiếp: Theo một số phương án theo sáng chế, thể liên hợp có thể được thiết kế sao cho tác nhân được phân phối với đích nhưng không được giải phóng. Điều này có thể được thực hiện bằng cách gắn tác nhân vào AB trực tiếp hoặc thông qua cầu nối không có thể phân cắt được.

Các cầu nối không có thể phân cắt được này có thể bao gồm axit amin, peptit, D-axit amin hoặc hợp chất hữu cơ khác mà có thể được cải biến để bao gồm các nhóm chức mà có thể được sử dụng sau đó để gắn vào AB bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. A-công thức chung đối với cầu nối hữu cơ này có thể là

$W - (CH_2)n - Q$

trong đó

W là --NH--CH_2-- hoặc --CH_2--;

Q là axit amin, peptit; và

n là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 20.

Thể liên hợp không thể phân cắt: Theo một số phương án, hợp chất có thể được gắn vào AB mà không hoạt hóa bổ thể. Khi sử dụng AB mà không có khả năng hoạt hóa bổ thể, sự gắn này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng cầu nối mà dễ bị phân cắt bằng bổ thể được hoạt hóa hoặc sử dụng cầu nối mà không dễ bị phân cắt bằng bổ thể được hoạt hóa.

Định nghĩa:

Trừ khi được định nghĩa theo cách khác, các thuật ngữ về khoa học và kỹ thuật được sử dụng liên quan đến sáng chế sẽ có nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Thuật ngữ danh từ số ít dùng để chỉ một hoặc nhiều đối tượng nêu bởi danh từ đó. Ví dụ như, hợp chất dùng để chỉ một hoặc nhiều hợp chất. Như vậy, các thuật ngữ danh từ số ít, "một hoặc nhiều" và "ít nhất là một" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau. Ngoài ra, trừ khi ngữ cảnh đòi hỏi có nghĩa khác, các thuật ngữ số ít bao gồm nghĩa số nhiều và các thuật ngữ số nhiều bao gồm nghĩa số ít. Nhìn chung, các danh pháp được sử dụng liên quan đến, và các kỹ thuật của, nuôi cấy tế bào và mô, sinh học phân tử, và hóa học protein và oligo- hoặc polynucleotit và sự lai hóa được mô tả trong bản mô tả này là đã được biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực. Các kỹ

thuật tiêu chuẩn được sử dụng cho ADN tái tổ hợp, tổng hợp oligonucleotit, và nuôi cấy mô và biến nạp (*ví dụ như,* đục lỗ điện, chuyển nhiễm liposom). Các phản ứng enzym và kỹ thuật tinh chế được thực hiện theo các thông số kỹ thuật của nhà sản xuất hoặc như thường được thực hiện trong lĩnh vực hoặc như được mô tả ở đây. Các kỹ thuật và thủ tục nói trên thường được thực hiện theo các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực và như được mô tả trong các tài liệu tham khảo chung và các tài liệu tham khảo cụ thể hơn mà được viện dẫn và thảo luận trong toàn bộ bản mô tả này. *Xem ví dụ như,* Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Các danh pháp được sử dụng liên quan đến, và các quy trình và các kỹ thuật phòng thí nghiệm của, hóa học phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp và hóa học dược phẩm và y học được mô tả ở đây là các danh pháp đã biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật tiêu chuẩn được sử dụng cho việc tổng hợp hóa học, phân tích hóa học, điều chế dược phẩm, tạo chế phẩm, và phân phối, và điều trị cho bệnh nhân.

Như được sử dụng trong phần bộc lộ này, các thuật ngữ sau đây, trừ khi có chỉ dẫn khác, được hiểu là có nghĩa như sau:

Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch và phần có hoạt tính miễn dịch của phân tử globulin miễn dịch (Ig), *tức là*, phân tử mà chứa vị trí liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu (phản ứng miễn dịch với) kháng nguyên. "Liên kết đặc hiệu" hoặc "phản ứng miễn dịch với" hoặc "liên kết đặc hiệu miễn dịch" có nghĩa là kháng thể phản ứng với một hoặc nhiều quyết định kháng nguyên của kháng nguyên mong muốn và không phản ứng với polypeptit khác hoặc liên kết ở ái lực thấp hơn nhiều ($K_d > 10^{-6}$).

Đơn vị cấu trúc kháng thể cơ bản được biết là có chứa tetrame. Mỗi tetrame được tạo thành bởi hai cặp giống nhau của chuỗi polypeptit, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (khoảng 25 kD) và một chuỗi "nặng" (khoảng 50-70 kD). Phần đầu tận cùng amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi có khoảng từ 100 đến 110 hoặc nhiều axit amin hơn chịu trách nhiệm chính cho sự nhận diện kháng nguyên. Phần đầu tận cùng carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng không đổi chủ yếu chịu trách nhiệm cho chức năng tác động. Nhìn chung, phân tử kháng thể thu được từ người liên quan đến lớp bất kỳ trong số các lớp IgG, IgM, IgA, IgE và IgD, mà khác nhau ở bản chất của chuỗi nặng có mặt trong phân tử. Các lớp nhất định cũng có các lớp phụ, chẳng hạn như IgG_1, IgG_2, và các lớp phụ khác. Hơn nữa, ở người, chuỗi nhẹ có thể là chuỗi kappa hoặc chuỗi lambda.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" (mAb) hoặc "hợp phần kháng thể đơn dòng", như dùng trong bản mô tả này, dùng để chỉ quần thể của phân tử kháng thể mà chỉ chứa một loại phân tử của phân tử kháng thể gồm có sản phẩm gen chuỗi nhẹ duy nhất và sản phẩm gen chuỗi nặng duy nhất. Cụ thể là, vùng xác định bổ sung (CDR) của kháng thể đơn dòng giống nhau ở tất cả các phân tử

của quần thể. MAb chứa vị trí liên kết kháng nguyên có khả năng phản ứng miễn dịch với epitop cụ thể của kháng nguyên đặc trưng bởi ái lực liên kết độc nhất đối với nó.

Thuật ngữ "vị trí liên kết kháng nguyên" hoặc "phần liên kết" dùng để chỉ phần của phân tử globulin miễn dịch mà tham gia vào sự liên kết kháng nguyên. Vị trí liên kết kháng nguyên được tạo thành bởi gốc axit amin của vùng biến đổi ("V") đầu tận cùng N của chuỗi nặng ("H") và chuỗi nhẹ ("L"). Ba đoạn kéo căng khác nhau nhiều ở trong các vùng V của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, được đề cập đến dưới dạng "vùng siêu biến," xen kẽ giữa các vùng kéo căng kẹp hai bên bảo toàn hơn đã biết dưới dạng "vùng khung," hoặc "FR". Do đó, thuật ngữ "FR" dùng để chỉ trình tự axit amin mà được phát hiện một cách tự nhiên giữa, và liền kề với, vùng siêu biến trong globulin miễn dịch. Trong phân tử kháng thể, ba vùng siêu biến của chuỗi nhẹ và ba vùng siêu biến của chuỗi nặng được bố trí tương quan với nhau trong không gian ba chiều để tạo thành bề mặt liên kết kháng nguyên. Bề mặt liên kết kháng nguyên bổ sung với bề mặt ba chiều của kháng nguyên được liên kết, và ba vùng siêu biến của mỗi trong số chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đề cập đến dưới dạng "vùng quyết định tính bổ sung," hoặc "CDR." Sự gán axit amin vào mỗi miền là theo định nghĩa của Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), hoặc Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al*. Nature 342:878-883 (1989).

Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "epitop" bao gồm quyết định protein bất kỳ có khả năng liên kết đặc hiệu với globulin miễn dịch, scFv, hoặc thụ thể tế bào T. Thuật ngữ "epitop" bao gồm quyết định protein bất kỳ có khả năng liên kết đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc thụ thể tế bào T. Yếu tố quyết định epitop thường gồm có các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của các phân tử chẳng hạn như axit amin hoặc chuỗi bên của đường và thường có các đặc điểm cấu trúc ba chiều đặc trưng, cũng như là đặc điểm điện tích đặc trưng. Ví dụ như, kháng thể có thể được sinh ra chống lại các peptit đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của polypeptit. Kháng thể được cho là liên kết đặc hiệu kháng nguyên khi hằng số phân ly ≤ 1 μM; theo một số phương án, ≤ 100 nM và theo một số phương án, ≤ 10 nM.

Như dùng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "liên kết đặc hiệu," "liên kết miễn dịch," và "tính chất liên kết miễn dịch" dùng để chỉ tương tác cộng hóa trị thuộc mà xảy ra giữa phân tử globulin miễn dịch và kháng nguyên mà globulin miễn dịch đặc hiệu đối với nó. Độ mạnh, hoặc ái lực của tương tác liên kết miễn dịch có thể được biểu diễn bằng hằng số phân ly (K_d) của tương tác, trong đó K_d càng nhỏ thể hiện ái lực càng lớn. Tính chất liên kết miễn dịch của polypeptit được chọn có thể được định lượng bằng cách sử dụng phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực. Một phương pháp như vậy tuân theo việc đo tốc độ của sự tạo thành phức hợp vị trí liên kết kháng nguyên/kháng nguyên và sự phân ly, trong đó các tốc độ này phụ thuộc vào nồng độ của các đối tác phức hợp, ái

lực của tương tác, và thông số hình học mà ảnh hưởng ngang bằng tốc độ này ở cả hai chiều. Do đó, cả "hằng số tốc độ on" (K_{on}) và "hằng số tốc độ off" (K_{off}) có thể được xác định bằng cách tính nồng độ và các tốc độ chính xác của sự kết hợp và sự phân ly. (*Xem* Nature 361:186-87 (1993)). Tỉ lệ của K_{off} /K_{on} có thể bỏ qua tất cả các thông số không liên quan đến ái lực, và bằng hằng số phân ly K_d. (*Xem, nhìn chung là*, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Kháng thể theo sáng chế được cho là liên kết đặc hiệu với đích, khi hằng số liên kết (K_d) bằng ≤1 μM, theo một số phương án ≤ 100 nM, theo một số phương án ≤ 10 nM, và theo một số phương án ≤ từ 100 pM đến khoảng 1 pM, như đo được bằng thử nghiệm chẳng hạn như thử nghiệm liên kết phối tử phóng xạ hoặc thử nghiệm tương tự đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Thuật ngữ "polynucleotit được phân lập" như dùng trong bản mô tả này có nghĩa là polynucleotit có nguồn gốc hệ gen, cADN, hoặc tổng hợp hoặc một số dạng kết hợp của chúng, mà theo nguồn gốc của nó "polynucleotit được phân lập" (1) không phải là kết hợp với tất cả hoặc một phần của polynucleotit trong đó "polynucleotit được phân lập" được tìm thấy trong tự nhiên, (2) được liên kết có điều khiển với polynucleotit mà nó không được liên kết với trong tự nhiên, hoặc (3) không có trong tự nhiên dưới dạng một phần của trình tự lớn hơn. Polynucleotit theo sáng chế bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa cho phân tử globulin miễn dịch chuỗi nặng được thể hiện trong bản mô tả này, và phân tử axit nucleic mã hóa cho phân tử globulin miễn dịch chuỗi nhẹ được thể hiện trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "protein được phân lập" được đề cập đến trong bản mô tả này có nghĩa là protein có nguồn gốc cADN, ARN tái tổ hợp, hoặc tổng hợp hoặc một số dạng kết hợp của chúng, mà theo nguồn gốc của nó, hoặc nguồn tạo dẫn xuất, "protein được phân lập" (1) không được kết hợp với protein được tìm thấy trong tự nhiên, (2) không có protein khác từ cùng nguồn, *ví dụ như,* không có protein chuột nhắt, (3) được biểu hiện bởi tế bào từ loài khác, hoặc (4) không có trong tự nhiên.

Thuật ngữ "polypeptit" được sử dụng trong bản mô tả này dưới dạng thuật ngữ chung để chỉ protein tự nhiên, mảnh, hoặc chất tương tự của trình tự polypeptit. Do đó, mảnh protein tự nhiên, và chất tương tự là các kiểu của loại polypeptit. Polypeptit theo sáng chế có chứa phân tử globulin miễn dịch chuỗi nặng được thể hiện trong bản mô tả này, và phân tử globulin miễn dịch chuỗi nhẹ được thể hiện trong bản mô tả này, cũng như là phân tử kháng thể tạo thành bởi dạng kết hợp có chứa phân tử globulin miễn dịch chuỗi nặng với phân tử globulin miễn dịch chuỗi nhẹ, chẳng hạn như phân tử globulin miễn dịch chuỗi nhẹ kappa, và ngược lại, cũng như là mảnh và chất tương tự của chúng.

Thuật ngữ "có trong tự nhiên" như dùng trong bản mô tả này như áp dụng cho đối tượng dùng để chỉ thực tế là đối tượng có thể được tìm thấy trong tự nhiên. Ví dụ như, trình tự polypeptit hoặc polynucleotit mà có mặt trong sinh vật (bao gồm virut) mà có thể được phân lập từ nguồn

trong tự nhiên và không được cải biến có chủ đích bởi con người trong phòng thí nghiệm hoặc theo cách khác có trong tự nhiên.

Thuật ngữ "được liên kết có điều khiển" như dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ vị trí của các thành phần so được mô tả ở trong mối quan hệ cho phép chúng thực hiện chức năng theo phương thức dự định của chúng. Trình tự điều khiển "được liên kết có điều khiển" với trình tự mã hoá được nối theo cách mà sự biểu hiện của trình tự mã hóa đạt được trong điều kiện tương thích với trình tự điều khiển.

Thuật ngữ "trình tự điều khiển" được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ trình tự polynucleotit cần thiết để thực hiện sự biểu hiện và xử lý các trình tự mã hóa mà chúng được nối vào. Bản chất của các trình tự điều khiển này khác nhau tùy thuộc vào sinh vật chủ; ở sinh vật nhân sơ, các trình tự điều khiển như vậy có chứa vùng khởi động, vị trí liên kết ribosom, và trình tự kết thúc phiên mã; ở sinh vật nhân chuẩn, nhìn chung, các trình tự điều khiển này bao gồm vùng khởi động và trình tự kết thúc phiên mã. Thuật ngữ "trình tự điều khiển" được dự định là bao gồm, tối thiểu là, tất cả các thành phần mà sự có mặt của chúng là thiết yếu đối với sự biểu hiện và xử lý, và có thể bao gồm các thành phần khác mà sự có mặt của chúng là có lợi, ví dụ, trình tự dẫn đầu và trình tự đối tác dung hợp. Thuật ngữ "polynucleotit" như được đề cập đến trong bản mô tả này có nghĩa là nucleotit có chiều dài ít nhất là 10 bazơ, ribonucleotit hoặc đeoxynucleotit hoặc dạng cải biến của một trong hai loại nucleotit. Thuật ngữ này bao gồm dạng sợi đơn và sợi kép của ADN.

Thuật ngữ oligonucleotit được đề cập đến trong bản mô tả này bao gồm các nucleotit có trong tự nhiên, và được cải biến được liên kết với nhau bằng oligonucleotit có trong tự nhiên, và không có trong tự nhiên liên kết. Oligonucleotit là tập hợp con polynucleotit thường có chiều dài 200 bazơ hoặc ít hơn. Theo một số phương án, oligonucleotit có chiều dài từ 10 đến 60 bazơ và theo một số phương án, có chiều dài từ 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 đến 40 bazơ. Oligonucleotit thường là sợi đơn, *ví dụ như,* đối với đoạn dò, mặc dù oligonucleotit có thể là sợi kép, *ví dụ như,* để sử dụng trong việc xây dựng thể đột biến gen. Oligonucleotit theo sáng chế là oligonucleotit có nghĩa hoặc đối nghĩa.

Thuật ngữ "nucleotit có trong tự nhiên" được đề cập đến trong bản mô tả này bao gồm đeoxyribonucleotit và ribonucleotit. Thuật ngữ "nucleotit được cải biến" được đề cập đến trong bản mô tả này bao gồm nucleotit với các nhóm đường được cải biến hoặc được thế và dạng tương tự. Thuật ngữ "liên kết oligonucleotit" được đề cập đến trong bản mô tả này bao gồm liên kết oligonucleotit chẳng hạn như phosphorothioat, phosphorođithioat, phosphoroselerloat, phosphorođiselenoat, phosphoroanilothioat, phoshoranilađat, phosphoronmiđat, và dạng tương tự. *Xem ví dụ như,* LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon *et al.* Anti Cancer Drug Design

6:539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec *et al.* Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Oligonucleotit có thể bao gồm nhãn để phát hiện, nếu muốn.

Như dùng trong bản mô tả này, hai mươi axit amin thông thường và các chữ viết tắt của chúng tuân theo việc sử dụng thông thường. *Xem* Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Các chất đồng phân lập thể (*ví dụ,* D-axit amin) của hai mươi axit amin thông thường, axit amin không tự nhiên chẳng hạn như axit amin được thế hai lần α, α, axit amin N-alkyl, axit lactic, và axit amin không thông thường khác cũng có thể là thành phần thích hợp cho polypeptit theo sáng chế. Ví dụ về axit amin không thông thường bao gồm: 4 hyđroxyprolin, γ-carboxyglutamat, ε-N,N,N-trimetyllysin, ε -N-axetyllysin, O-phosphoserin, N-axetylserin, N-formylmethionin, 3-metylhistiđin, 5-hyđroxylysin, σ-N-metylarginin, và các axit amin và axit imino tương tự khác (*ví dụ như,* 4-hyđroxyprolin). Trong ký hiệu polypeptit dùng trong bản mô tả này, hướng bên trái là hướng đầu tận cùng amino và hướng bên phải là hướng đầu tận cùng carboxy, theo cách sử dụng và quy ước tiêu chuẩn.

Tương tự, trừ khi có chỉ dẫn khác, đầu bên trái của trình tự polynucleotit sợi đơn là đầu 5' chiều phía trái của trình tự polynucleotit sợi kép được đề cập đến dưới dạng chiều 5'. Chiều của sự bổ sung từ 5' đến 3' của các bản phiên mã ARN mới sinh được đề cập đến dưới dạng chiều phiên mã vùng trình tự trên sợi ADN có cùng trình tự như ARN và từ đầu 5' đến đầu 5' của bản phiên mã ARN được đề cập đến dưới dạng "trình tự ngược dòng"; vùng trình tự trên sợi ADN có cùng trình tự như ARN và từ 3' đến đầu 3' của bản phiên mã ARN được đề cập đến dưới dạng "trình tự xuôi dòng".

Như áp dụng cho polypeptit, thuật ngữ "về cơ bản tương đồng" có nghĩa là hai trình tự peptit, khi được sắp xếp thẳng hàng tối ưu, chẳng hạn như bằng các chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng khối lượng chỗ cách quãng mặc định, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 80 phần trăm, theo một số phương án, độ tương đồng trình tự ít nhất là 90 phần trăm, theo một số phương án, độ tương đồng trình tự ít nhất là 95 phần trăm, và theo một số phương án, độ tương đồng trình tự ít nhất là 99 phần trăm.

Theo một số phương án, các vị trí gốc mà không tương đồng khác nhau bởi sự thế axit amin bảo toàn.

Như thảo luận trong bản mô tả này, các thay đổi nhỏ trong trình tự axit amin của kháng thể hoặc phân tử globulin miễn dịch được dự tính là được bao hàm bởi sáng chế, với điều kiện là các thay đổi trong trình tự axit amin duy trì ít nhất là 75%, theo một số phương án, ít nhất là 80%, 90%, 95%, và theo một số phương án, 99%. Cụ thể là, sự thay thế axit amin bảo toàn được dự định. Sự

thay thế bảo toàn là sự thay thế mà diễn ra ở trong họ axit amin mà có liên quan ở chuỗi bên của chúng. Axit amin được mã hóa di truyền thường được chia thành các họ: (1) axit amin có tính axit là aspartat, glutamat; (2) axit amin có tính bazơ là lysin, arginin, histiđin; (3) axit amin không phân cực là alanin, valin, lơxin, isolơxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan, và (4) axit amin phân cực không tích điện là glyxin, asparagin, glutamin, xystein, serin, threonin, tyrosin. Axit amin ưa nước bao gồm arginin, asparagin, aspartat, glutamin, glutamat, histiđin, lysin, serin, và threonin. Axit amin kỵ nước bao gồm alanin, xystein, isolơxin, lơxin, methionin, phenylalanin, prolin, tryptophan, tyrosin và valin. Các họ khác của axit amin bao gồm (i) serin và threonin, mà là họ hyđroxy béo; (ii) asparagin và glutamin, mà là họ chứa amit; (iii) alanin, valin, lơxin và isolơxin, mà là họ béo; và (iv) phenylalanin, tryptophan, và tyrosin, mà là họ thơm. Ví dụ như, hợp lý khi mong đợi rằng sự thay thế được phân lập của lơxin với isolơxin hoặc valin, aspartat với glutamat, threonin với serin, hoặc sự thay thế tương tự của axit amin với axit amin có liên quan về mặt cấu trúc sẽ không có ảnh hưởng lớn đến sự liên kết hoặc tính chất của phân tử thu được, đặc biệt là nếu sự thay thế không bao gồm axit amin ở trong vị trí khung. Sự thay đổi axit amin có dẫn đến peptit chức năng hay không có thể xác định dễ dàng bằng cách thử nghiệm hoạt tính đặc hiệu của dẫn xuất polypeptit. Thử nghiệm được mô tả chi tiết trong bản mô tả này. Mảnh hoặc chất tương tự của kháng thể hoặc phân tử globulin miễn dịch có thể được điều chế dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Các đầu tận cùng amino và carboxy thích hợp của mảnh hoặc chất tương tự có mặt ở gần ranh giới của các miền chức năng. Các miền cấu trúc và chức năng có thể được xác định bằng cách so sánh dữ liệu trình tự nucleotit và/hoặc axit amin với cơ sở dữ liệu trình tự công cộng hoặc độc quyền. Theo một số phương án, phương pháp so sánh được vi tính hóa được sử dụng để xác định mô típ trình tự hoặc miền cấu hình protein được dự đoán mà có trong các protein khác có cấu trúc và/hoặc chức năng đã biết. Phương pháp để xác định trình tự protein mà cuộn gập thành cấu trúc ba chiều đã biết đã được biết đến. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Do đó, các ví dụ nêu trên chứng tỏ rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể nhận ra mô típ trình tự và cấu hình cấu trúc mà có thể được sử dụng để xác định các miền cấu trúc và chức năng theo sáng chế.

Sự thế axit amin thích hợp là các đột biến thế mà: (1) làm giảm tính mẫn cảm đối với sự phân giải protein, (2) làm giảm tính mẫn cảm đối với sự oxy hóa, (3) làm thay đổi ái lực liên kết để tạo thành phức hợp protein, (4) làm thay đổi ái lực liên kết, và (5) mang lại hoặc cải biến các tính chất lý hóa hoặc chức năng khác của chất tương tự này. Chất tương tự có thể bao gồm các mutein khác nhau của trình tự không phải là trình tự peptit có trong tự nhiên. Ví dụ như, một hoặc nhiều sự thế axit amin (ví dụ như, sự thế axit amin bảo toàn) có thể được tạo ra trong trình tự có trong tự nhiên (ví dụ như, trong phần của polypeptit bên ngoài (các) miền tạo thành sự tiếp xúc liên phân tử. Sự

thế axit amin bảo toàn cần không làm thay đổi cơ bản đặc điểm cấu trúc của trình tự gốc (*ví dụ như,* axit amin thay thế cần không có khuynh hướng làm đứt gãy xoắn mà có mặt trong trình tự gốc, hoặc phá vỡ các dạng khác của cấu trúc bậc hai mà đặc trưng cho trình tự gốc). Các ví dụ của cấu trúc bậc hai và bậc ba polypeptit đã biết trong lĩnh vực được mô tả trong Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); và Thornton et at. Nature 354:105 (1991).

Thuật ngữ "mảnh polypeptit" như dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ polypeptit mà có sự làm khuyết đầu tận cùng amino và/hoặc đầu tận cùng carboxy và/hoặc một hoặc nhiều sự làm khuyết bên trong, nhưng trong đó trình tự axit amin còn lại tương đồng với các vị trí tương ứng trong trình tự có trong tự nhiên được suy ra, ví dụ như, từ trình tự cADN chiều dài đầy đủ. Mảnh thường dài ít nhất là 5, 6, 8 hoặc 10 axit amin, theo một số phương án, dài ít nhất là 14 axit amin, theo một số phương án, dài ít nhất là 20 axit amin, thường là dài ít nhất là 50 axit amin, và theo một số phương án, dài ít nhất là 70 axit amin. Thuật ngữ "chất tương tự" như dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ polypeptit mà tạo thành từ đoạn có ít nhất là 25 axit amin mà về cơ bản tương đồng với một phần của trình tự axit amin được suy ra và có liên kết đặc hiệu với đích, trong điều kiện liên kết thích hợp. Thông thường, chất tương tự polypeptit có chứa sự thế axit amin bảo toàn (hoặc sự thêm hoặc sự làm khuyết) đối với trình tự có trong tự nhiên. Chất tương tự thường dài ít nhất là 20 axit amin, theo một số phương án, dài ít nhất là 50 axit amin hoặc dài hơn, và có thể thường dài bằng polypeptit có trong tự nhiên chiều dài đầy đủ.

Thuật ngữ "tác nhân" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ hợp chất hóa học, hỗn hợp của các hợp chất hóa học, đại phân tử sinh học, hoặc chất chiết tạo ra từ nguyên liệu sinh học.

Như dùng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "nhãn" hoặc "được gắn nhãn" dùng để chỉ sự kết hợp của chỉ thị có thể phát hiện được, *ví dụ như,* bằng sự kết hợp của axit amin được gắn nhãn phóng xạ hoặc sự gắn vào polypeptit của gốc biotinyl mà có thể được phát hiện bằng aviđin được đánh dấu (*ví dụ như,* streptaviđin chứa chỉ thị huỳnh quang hoặc hoạt tính enzym mà có thể được phát hiện bằng phương pháp huỳnh quang hoặc đo nhiệt lượng). Trong các trường hợp nhất định, nhãn hoặc chỉ thị cũng có thể trị liệu. Các phương pháp khác nhau để gắn nhãn polypeptit và glycoprotein đã được biết đến trong lĩnh vực và có thể được sử dụng. Các ví dụ về nhãn đối với polypeptit bao gồm, nhưng giới hạn ở, các nhãn sau đây: đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ (*ví dụ như,* ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), nhãn huỳnh quang (*ví dụ như,* FITC, rhođamin, lanthanit photpho), nhãn enzym (*ví dụ như,* peroxiđaza củ cải ngựa, p-galactosiđaza, luxiferaza, phosphataza kiềm), chất phát quang hóa học, các nhóm biotinyl, epitop polypeptit định trước được nhận diện bởi chất báo cáo thứ cấp (*ví dụ như*, trình tự cặp khóa kéo lơxin, các vị trí

liên kết đối với kháng thể thứ cấp, miền liên kết kim loại, đuôi epitop). Theo một số phương án, nhãn được gắn bằng các nhánh đoạn đệm có chiều dài khác nhau để làm giảm sự cản trở không gian tiềm năng. Thuật ngữ "tác nhân dược hoặc thuốc" như dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ hợp chất hóa học hoặc hợp phần có khả năng gây ra tác dụng trị liệu mong muốn khi được dùng thích hợp cho bệnh nhân.

Các thuật ngữ hóa học khác trong bản mô tả này được sử dụng theo cách sử dụng thông thường trong lĩnh vực, như được lấy ví dụ bởi The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Như dùng trong bản mô tả này, "về cơ bản tinh khiết" có nghĩa là các loại đối tượng là các loại nổi trội có mặt (*tức là,* trên cơ sở mol nó nhiều hơn so với loại cụ thể khác bất kỳ trong hợp phần), và theo một số phương án, phân đoạn về cơ bản được tinh chế là hợp phần trong đó loại đối tượng có chứa ít nhất là khoảng 50 phần trăm (trên cơ sở mol) của tất cả các loại đại phân tử có mặt.

Nhìn chung, hợp phần về cơ bản tinh khiết sẽ chứa nhiều hơn khoảng 80 phần trăm của tất cả các loại đại phân tử có mặt trong hợp phần, theo một số phương án, nhiều hơn khoảng 85%, 90%, 95%, và 99%. Theo một số phương án, các loại đối tượng này được tinh chế đến độ đồng nhất cốt yếu (các loại tạp nhiễm không thể phát hiện được trong hợp phần này bằng các phương pháp phát hiện thông thường) trong đó hợp phần này về cơ bản gồm có các loại đại phân tử đơn lẻ.

Thuật ngữ bệnh nhân bao gồm người và đối tượng thú y.

Kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế liên kết đặc hiệu đích nhất định, ví dụ như, protein đích người chẳng hạn như CD71 người. Cũng được bao gồm trong sáng chế là kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa mà liên kết với cùng epitop như kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được mô tả trong bản mô tả này. Cũng được bao gồm trong sáng chế là kháng thể và/hoặc kháng thể kháng thể có thể hoạt hóa mà cạnh tranh với kháng thể kháng-CD71 và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 được mô tả trong bản mô tả này đối với việc liên kết với CD71, ví dụ như, CD71 người. Cũng được bao gồm trong sáng chế là kháng thể và/hoặc kháng thể kháng thể có thể hoạt hóa mà cạnh tranh chéo với kháng thể kháng-CD71 và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 được mô tả trong bản mô tả này đối với việc liên kết với CD71, ví dụ như, CD71 người.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng có thể xác định, mà không thực hiện thí nghiệm, nếu kháng thể đơn dòng (*ví dụ như*, kháng thể đơn dòng chuột nhắt hoặc được làm cho giống người) có cùng độ đặc hiệu như kháng thể đơn dòng được sử dụng trong phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bằng cách xác định liệu cái trước có ngăn chặn cái sau khỏi việc liên kết với đích hay không. Nếu kháng thể đơn dòng được thử nghiệm cạnh tranh với kháng thể

đơn dòng theo sáng chế, như được thể hiện bằng sự giảm đi của sự liên kết bằng kháng thể đơn dòng theo sáng chế, thì hai kháng thể đơn dòng liên kết với cùng epitop, hoặc epitop có quan hệ gần. Phương pháp khác để xác định liệu kháng thể đơn dòng có độ đặc hiệu của kháng thể đơn dòng theo sáng chế là ủ trước kháng thể đơn dòng theo sáng chế với đích và sau đó bổ sung kháng thể đơn dòng được thử nghiệm để xác định liệu kháng thể đơn dòng được thử nghiệm bị ức chế ở khả năng của nó để liên kết đích. Nếu kháng thể đơn dòng được thử nghiệm bị ức chế thì, trong tất cả khả năng xảy ra, nó có cùng, hoặc tương đương về mặt chức năng, độ đặc hiệu epitop như kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Sử dụng kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp

Rõ ràng rằng việc dùng thực thể trị liệu theo sáng chế sẽ được dùng với chất mang, tá dược, và các tác nhân khác dược dụng thích hợp mà được kết hợp vào chế phẩm để tạo ra việc truyền, phân phối, dung chịu, và dạng tương tự được cải thiện.

Chế phẩm trị liệu theo sáng chế, mà bao gồm để làm ví dụ mà không làm giới hạn sáng chế, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp, được sử dụng để ngăn ngừa, điều trị hoặc theo cách khác làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính đích bất thường. Ví dụ như, chế phẩm trị liệu theo sáng chế, mà bao gồm kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp, được sử dụng để điều trị hoặc theo cách khác làm thuyên giảm bệnh ung thư hoặc tình trạng có khối u khác, viêm, rối loạn viêm, và/hoặc bệnh tự miễn. Theo một số phương án, bệnh ung thư là khối u rắn hoặc bệnh máu ác tính mà đích được biểu hiện ở đó. Theo một số phương án, bệnh ung thư là khối u rắn mà đích được biểu hiện ở đó. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh máu ác tính mà đích được biểu hiện ở đó. Theo một số phương án, đích được biểu hiện trên nhu mô (ví dụ như, ở bệnh ung thư, phần của cơ quan hoặc mô mà thường thực hiện (các) chức năng của cơ quan hoặc mô). Theo một số phương án, đích được biểu hiện trên tế bào, mô, hoặc cơ quan. Theo một số phương án, đích được biểu hiện trên chất nền (tức là, giá đỡ liên kết của tế bào, mô, hoặc cơ quan). Theo một số phương án, đích được biểu hiện trên nguyên bào xương. Theo một số phương án, đích được biểu hiện trên nội mô (mạch máu). Theo một số phương án, đích được biểu hiện trên tế bào gốc ung thư. Theo một số phương án, tác nhân mà kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp với là chất ức chế vi ống. Theo một số phương án, tác nhân mà kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp với là tác nhân làm hư hỏng axit nucleic.

Tính hiệu quả của việc ngăn ngừa, làm thuyên giảm hoặc điều trị được xác định kết hợp với phương pháp đã biết bất kỳ để chẩn đoán hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính đích, chẳng hạn như, ví dụ như, sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính đích bất thường. Việc kéo dài tuổi thọ của đối tượng hoặc theo cách khác làm trì hoãn sự tiến triển của bệnh hoặc

rối loạn kết hợp với sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính đích, ví dụ như, sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính đích bất thường, ở đối tượng chỉ ra rằng kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mang lại lợi ích lâm sàng.

Kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có thể được dùng ở dạng dược phẩm. Theo một số phương án trong đó mảnh kháng thể được sử dụng, mảnh nhỏ nhất mà liên kết đặc hiệu với miền liên kết của đích protein được chọn. Ví dụ như, dựa trên trình tự vùng biến đổi của kháng thể, phân tử peptit có thể được thiết kế mà giữ lại khả năng để liên kết trình tự protein đích. Peptit này có thể được tổng hợp theo cách hóa học và/hoặc được sản xuất bằng công nghệ ADN tái tổ hợp. (*Xem*, *ví dụ như*, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)).

Chế phẩm để được sử dụng cho việc dùng *in vivo* phải tiệt trùng. Điều này được thực hiện dễ dàng bằng cách lọc qua màng lọc tiệt trùng.

Theo một số phương án, kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp chứa nhãn có thể phát hiện được. Kháng thể nguyên vẹn, hoặc mảnh của chúng (*ví dụ như*, Fab, scFv, hoặc $F(ab)_2$) được sử dụng. Thuật ngữ "được gắn nhãn", đối với đoạn dò hoặc kháng thể, được dự định để bao hàm việc gắn nhãn trực tiếp của đoạn dò hoặc kháng thể bằng cách ghép nối (*tức là*, liên kết vật lý) chất có thể phát hiện được vào đoạn dò hoặc kháng thể, cũng như là việc gắn nhãn gián tiếp của đoạn dò hoặc kháng thể bằng khả năng phản ứng với chất phản ứng khác mà được gắn nhãn trực tiếp. Các ví dụ về việc gắn nhãn gián tiếp bao gồm sự phát hiện của kháng thể sơ cấp sử dụng kháng thể thứ cấp được gắn nhãn huỳnh quang và việc gắn nhãn đầu của đoạn dò ADN với biotin sao cho nó có thể được phát hiện bằng streptaviđin được gắn nhãn huỳnh quang. Thuật ngữ "mẫu sinh học" được dự định để bao gồm mô, tế bào và dịch sinh học được phân lập từ đối tượng, cũng như là mô, tế bào và dịch có mặt trong đối tượng. Do đó, được bao gồm trong việc sử dụng thuật ngữ "mẫu sinh học" là máu và phân đoạn hoặc thành phần của máu bao gồm huyết thanh máu, huyết tương máu, hoặc bạch huyết. Tức là, phương pháp phát hiện theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện mARN phân tích, protein, hoặc ADN hệ gen trong mẫu sinh học *in vitro* cũng như là *in vivo*. Ví dụ như, kỹ thuật *in vitro* để phát hiện của mARN phân tích bao gồm sự lai hóa Northern và sự lai hóa *in situ*. Kỹ thuật *in vitro* để phát hiện của protein phân tích bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thẩm tách Western, kết tủa miễn dịch, nhuộm màu hóa học miễn dịch, và huỳnh quang miễn dịch. Kỹ thuật *in vitro* để phát hiện của ADN hệ gen phân tích bao gồm sự lai hóa Southern. Quy trình thực hiện thử nghiệm miễn dịch được mô tả, ví dụ như trong "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulus, Academic Press, Inc., San Diego,

CA, 1996; và "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Hơn nữa, các kỹ thuật *in vivo* để phát hiện protein phân tích bao gồm việc đưa vào trong đối tượng kháng thể kháng-protein phân tích được gắn nhãn. Ví dụ như, kháng thể có thể được gắn nhãn bằng chỉ thị có hoạt tính phóng xạ mà sự có mặt và định vị của nó ở đối tượng có thể được phát hiện bằng các kỹ thuật chụp ảnh tiêu chuẩn.

Kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế cũng hữu dụng trong nhiều chế phẩm chẩn đoán và phòng ngừa. Theo một phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được dùng cho bệnh nhân mà có nguy cơ phát triển một hoặc nhiều rối loạn nêu trên. Khuynh hướng của bệnh nhân hoặc cơ quan đối với một hoặc nhiều rối loạn nêu trên có thể được xác định sử dụng chỉ thị kiểu gen, huyết thanh hoặc sinh hóa.

Theo một số phương án theo sáng chế, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được dùng cho cá thể người được chẩn đoán với chỉ định lâm sàng kết hợp với một hoặc nhiều rối loạn nêu trên. Khi chẩn đoán, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được dùng để làm giảm nhẹ hoặc làm đảo ngược tác dụng của chỉ định lâm sàng.

Kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa, và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế cũng hữu dụng trong sự phát hiện của đích ở mẫu bệnh nhân và theo đó hữu dụng để chẩn đoán. Ví dụ như, kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa, và các phiên bản được liên hợp của chúng, theo sáng chế được sử dụng trong thử nghiệm *in vitro*, *ví dụ như*, ELISA, để phát hiện hàm lượng đích trong mẫu bệnh nhân.

Theo một phương án, kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được cố định trên giá đỡ rắn (*ví dụ như*, (các) giếng của đĩa vi chuẩn độ). Kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp đã được cố định đóng vai trò làm kháng thể bắt giữ đối với đích bất kỳ mà có thể có mặt trong mẫu thử nghiệm. Trước khi cho kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa, và/hoặc các phiên bản được liên hợp của chúng đã được cố định, tiếp xúc với mẫu bệnh nhân, giá đỡ rắn được rửa và được xử lý bằng tác nhân phong bế chẳng hạn như protein sữa hoặc albumin để ngăn ngừa sự hấp thụ không đặc hiệu của chất phân tích.

Tiếp đó các giếng được xử lý bằng mẫu thử nghiệm bị nghi ngờ chứa kháng nguyên, hoặc với dung dịch chứa lượng tiêu chuẩn của kháng nguyên. Mẫu này là, *ví dụ như*, mẫu huyết thanh từ đối tượng bị nghi ngờ có hàm lượng của kháng nguyên tuần hoàn được coi là chẩn đoán của bệnh lý. Sau khi rửa mẫu thử nghiệm hoặc mẫu chuẩn, giá đỡ rắn được xử lý bằng kháng thể thứ hai mà được gắn nhãn có thể phát hiện được. Kháng thể thứ hai được gắn nhãn đóng vai trò làm kháng thể phát hiện. Hàm lượng của nhãn có thể phát hiện được được đo, và nồng độ của kháng

nguyên đích trong mẫu thử nghiệm được xác định bằng cách so sánh với đường cong tiêu chuẩn được phát triển từ các mẫu tiêu chuẩn.

Rõ ràng rằng dựa trên kết quả thu được sử dụng kháng thể và kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế, và các phiên bản được liên hợp của chúng, trong thử nghiệm chẩn đoán *in vitro*, có thể phân chia giai đoạn bệnh ở đối tượng dựa trên mức độ biểu hiện của kháng nguyên đích. Đối với bệnh nhất định, mẫu của máu được lấy từ đối tượng được chẩn đoán là ở các giai đoạn khác nhau trong sự tiến triển của bệnh, và/hoặc ở các thời điểm khác nhau trong việc điều trị trị liệu của bệnh. Bằng cách sử dụng tập hợp mẫu mà tạo ra kết quả có ý nghĩa thống kê đối với mỗi giai đoạn của sự tiến triển hoặc trị liệu, khoảng giá trị của nồng độ của kháng nguyên mà có thể được coi là đặc trưng của mỗi giai đoạn được thiết kế.

Kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp cũng có thể được dùng trong phương pháp chẩn đoán và/hoặc chụp ảnh. Theo một số phương án, phương pháp này là phương pháp *in vitro*. Theo một số phương án, phương pháp này là phương pháp *in vivo*. Theo một số phương án, phương pháp này là phương pháp *in situ*. Theo một số phương án, phương pháp này là phương pháp *ex vivo*. Ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa có CM có thể phân cắt bằng enzym có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của enzym mà có khả năng phân cắt CM. Kháng thể có thể hoạt hóa này có thể được dùng trong chẩn đoán, mà có thể bao gồm sự phát hiện *in vivo* (*ví dụ như*, định lượng hoặc định tính) của hoạt tính enzym (hoặc, theo một số phương án, môi trường của tiềm năng giảm tăng lên chẳng hạn như môi trường mà có thể mang lại sự giảm đi của liên kết đisulfua) thông qua sự tích lũy đo được của kháng thể được hoạt hóa (tức là, kháng thể bắt nguồn từ sự phân cắt của kháng thể có thể hoạt hóa) trong tế bào hoặc mô nhất định của sinh vật chủ nhất định. Sự tích lũy này của kháng thể được hoạt hóa không chỉ chỉ ra rằng mô biểu hiện hoạt tính enzym (hoặc tiềm năng giảm tăng lên tùy thuộc vào bản chất của CM) mà còn chỉ ra rằng mô biểu hiện đích mà kháng thể được hoạt hóa liên kết với.

Ví dụ như, CM có thể được chọn là cơ chất cho ít nhất là một proteaza được tìm thấy tại vị trí của khối u, tại vị trí của sự nhiễm virut hoặc vi khuẩn tại vị trí bị giới hạn sinh học (*ví dụ như*, chẳng hạn như trong chỗ áp xe, trong cơ quan, và dạng tương tự), và dạng tương tự. AB có thể là mảnh mà liên kết kháng nguyên đích. Bằng cách sử dụng phương pháp như bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc khi thích hợp, phương pháp quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, nhãn có thể phát hiện được (*ví dụ như*, nhãn huỳnh quang hoặc nhãn có hoạt tính phóng xạ hoặc chất phóng xạ đánh dấu) có thể được liên hợp vào AB hoặc vùng khác của kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa. Nhãn có thể phát hiện được thích hợp được thảo luận trong ngữ cảnh của phương pháp sàng lọc nêu trên và các ví dụ cụ thể khác được nêu dưới đây. Bằng cách sử dụng

AB đặc hiệu đối với protein hoặc peptit của tình trạng bệnh, cùng với ít nhất là một proteaza mà hoạt tính của nó được tăng lên trong mô bệnh được quan tâm, kháng thể có thể hoạt hóa sẽ thể hiện tốc độ tăng lên của việc liên kết với mô bệnh tương quan với mô trong đó enzym đặc hiệu CM không có mặt ở hàm lượng có thể phát hiện được hoặc có mặt ở hàm lượng thấp hơn so với ở mô bệnh hoặc bị bất hoạt (ví dụ như, ở dạng tiền enzym hoặc trong phức hợp với chất ức chế). Vì protein và peptit nhỏ được thanh thải nhanh chóng từ máu bằng hệ thống lọc thận, và bởi vì enzym đặc hiệu đối với CM không có mặt ở hàm lượng có thể phát hiện được (hoặc có mặt ở hàm lượng thấp hơn ở mô không bị bệnh hoặc có mặt trong cấu hình bất hoạt), sự tích lũy của kháng thể được hoạt hóa trong mô bệnh được tăng cường tương quan với mô không bị bệnh.

Trong ví dụ khác, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt trong mẫu. Ví dụ như, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa chứa CM dễ bị phân cắt bằng enzym, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được sử dụng để phát hiện (định lượng hoặc định tính) sự có mặt của enzym trong mẫu. Trong ví dụ khác, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa chứa CM dễ bị phân cắt bằng tác nhân khử, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được sử dụng để phát hiện (định lượng hoặc định tính) sự có mặt của điều kiện khử trong mẫu. Để làm thuận tiện cho phân tích trong các phương pháp này, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được gắn nhãn có thể phát hiện, và có thể được liên kết với giá đỡ (*ví dụ như*, giá đỡ rắn, chẳng hạn như bản kính hoặc hạt). Nhãn có thể phát hiện được có thể được định vị trên một phần của kháng thể có thể hoạt hóa mà không được giải phóng sau khi phân cắt, ví dụ như, nhãn có thể phát hiện được có thể là nhãn huỳnh quang đã được dập tắt hoặc nhãn khác mà không phát hiện được đến khi sự phân cắt xảy ra. Thử nghiệm có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ như, cho kháng thể có thể hoạt hóa được gắn nhãn có thể phát hiện được, được cố định tiếp xúc với mẫu bị nghi ngờ chứa enzym và/hoặc tác nhân khử trong thời gian đủ để sự phân cắt xảy ra, sau đó rửa để loại bỏ mẫu dư và tạp chất. Sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt (*ví dụ như*, enzym hoặc tác nhân khử) trong mẫu sau đó được đánh giá bởi sự thay đổi ở tín hiệu có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa trước khi cho tiếp xúc với mẫu *ví dụ như*, sự có mặt của và/hoặc sự tăng lên của tín hiệu có thể phát hiện được do sự phân cắt của kháng thể có thể hoạt hóa bằng tác nhân phân cắt trong mẫu.

Phương pháp phát hiện này có thể được điều chỉnh để cũng mang lại sự phát hiện của sự có mặt hoặc không có mặt của đích mà có khả năng liên kết AB của kháng thể có thể hoạt hóa khi được phân cắt. Do đó, thử nghiệm có thể được điều chỉnh để đánh giá sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt và sự có mặt hoặc không có mặt của đích được quan tâm. Sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt có thể được phát hiện bằng sự có mặt của và/hoặc sự tăng lên của nhãn có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa như được mô tả ở trên, và sự có

mặt hoặc không có mặt của đích có thể được phát hiện bằng sự phát hiện của phức hợp đích-AB *ví dụ như*, bằng cách sử dụng kháng thể kháng-đích được gắn nhãn có thể phát hiện được.

Kháng thể có thể hoạt hóa cũng hữu dụng trong việc chụp ảnh *in situ* để đánh giá kháng thể có thể hoạt hóa sự hoạt hóa, *ví dụ như*, bằng sự phân cắt proteaza, và việc liên kết với đích cụ thể. Chụp ảnh *in situ* là kỹ thuật mà giúp cho có thể định vị hoạt tính phân giải protein và đích trong mẫu sinh học chẳng hạn như môi trường nuôi cấy tế bào hoặc phần mô. Bằng cách sử dụng kỹ thuật này, có thể xác nhận cả hai việc liên kết với đích nhất định và hoạt tính phân giải protein dựa trên sự có mặt của nhãn có thể phát hiện được (ví dụ như, nhãn huỳnh quang).

Các kỹ thuật này hữu dụng với tế bào hoặc mô đông lạnh bất kỳ có nguồn gốc từ vị trí bệnh (*ví dụ như* mô khối u) hoặc mô khỏe mạnh. Các kỹ thuật này cũng hữu dụng với mẫu tế bào hoặc mô tươi.

Trong các kỹ thuật này, kháng thể có thể hoạt hóa được gắn nhãn bằng nhãn có thể phát hiện được. Nhãn có thể phát hiện được có thể là thuốc nhuộm huỳnh quang, (ví dụ như chất huỳnh quang, Fluorescein Isothioxyanat (FITC), Rhođamin Isothioxyanat (TRITC), nhãn Alexa Fluor®), thuốc nhuộm hồng ngoại gần (NIR) (ví dụ như, tinh thể nano Qdot®), kim loại keo, hapten, chỉ thị có hoạt tính phóng xạ, biotin và chất phản ứng khuếch đại chẳng hạn như streptaviđin, hoặc enzym (ví dụ như peroxiđaza củ cải ngựa hoặc phosphataza kiềm).

Sự phát hiện của nhãn trong mẫu mà đã được ủ với kháng thể có thể hoạt hóa, được gắn nhãn chỉ ra rằng mẫu chứa đích và chứa proteaza mà đặc hiệu đối với CM của kháng thể có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, sự có mặt của proteaza có thể được xác nhận bằng cách sử dụng chất ức chế proteaza phổ rộng chẳng hạn như các chất ức chế được mô tả trong bản mô tả này, và/hoặc bằng cách sử dụng tác nhân mà đặc hiệu đối với proteaza, ví dụ như, kháng thể chẳng hạn như A11, mà đặc hiệu đối với proteaza matriptaza và ức chế hoạt tính phân giải protein của matriptaza; xem ví dụ như, công bố quốc tế số WO 2010/129609, công bố ngày 11 tháng 11 năm 2010. Cùng phương pháp sử dụng chất ức chế proteaza phổ rộng chẳng hạn như các chất được mô tả trong bản mô tả này, và/hoặc bằng cách sử dụng tác nhân ức chế chọn lọc hơn có thể được sử dụng để xác định proteaza mà đặc hiệu đối với CM của kháng thể có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, sự có mặt của đích có thể được xác nhận bằng cách sử dụng tác nhân mà đặc hiệu đối với đích, *ví dụ như*, kháng thể khác, hoặc nhãn có thể phát hiện được có thể được cạnh tranh với đích không được gắn nhãn. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa không được gắn nhãn có thể được sử dụng, với sự phát hiện bằng kháng thể thứ cấp được gắn nhãn hoặc nhiều hệ thống phát hiện phức hợp.

Các kỹ thuật tương tự cũng hữu dụng để chụp ảnh *in vivo* trong đó sự phát hiện của tín hiệu huỳnh quang ở đối tượng, *ví dụ như*, động vật có vú, bao gồm người, chỉ ra rằng vị trí bệnh chứa đích và chứa proteaza mà đặc hiệu đối với CM của kháng thể có thể hoạt hóa.

Các kỹ thuật này cũng hữu dụng trong bộ kit và/hoặc làm chất phản ứng đối với sự phát hiện, sự xác định hoặc sự xác định đặc điểm của hoạt tính proteaza trong nhiều tế bào, mô, và sinh vật dựa trên CM đặc hiệu proteaza trong kháng thể có thể hoạt hóa.

Sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa trong nhiều chẩn đoán và/hoặc phòng ngừa các chỉ định. Ví dụ như, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt và đích được quan tâm ở đối tượng hoặc mẫu bằng cách (i) cho đối tượng hoặc mẫu tiếp xúc với kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa gốc che giấu (MM), gốc có thể phân cắt (CM) mà được phân cắt bằng tác nhân phân cắt, ví dụ như, proteaza, và miền liên kết kháng nguyên hoặc mảnh của chúng (AB) mà liên kết đặc hiệu đích được quan tâm, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được hoạt hóa, không được phân cắt có chứa sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB hoặc AB-CM-MM; (a) trong đó MM là peptit mà ức chế sự liên kết của AB với đích, và trong đó MM không có trình tự axit amin của đối tác liên kết có trong tự nhiên của AB và không phải là dạng được cải biến của đối tác liên kết tự nhiên của AB; và (b) trong đó, ở trạng thái không được hoạt hóa, không được phân cắt, MM cản trở sự liên kết đặc hiệu của AB với đích, và ở trạng thái được hoạt hóa, được phân cắt MM không cản trở hoặc cạnh tranh với sự liên kết đặc hiệu của AB với đích; và (ii) đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu chỉ ra rằng tác nhân phân cắt và đích có mặt trong đối tượng hoặc mẫu và trong đó không có hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu chỉ ra rằng tác nhân phân cắt, đích hoặc cả tác nhân phân cắt và đích không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa là kháng thể có thể hoạt hóa mà tác nhân trị liệu được liên hợp với. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa không được liên hợp vào tác nhân. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, nhãn có thể phát hiện được được định vị trên AB. Theo một số phương án, việc đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng thứ cấp mà liên kết đặc hiệu với kháng thể được hoạt hóa, trong đó chất phản ứng có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, chất phản ứng thứ cấp là kháng thể có chứa nhãn có thể phát hiện được.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt ở đối tượng hoặc mẫu bằng cách (i) cho đối tượng hoặc mẫu tiếp xúc với kháng thể có thể hoạt hóa trong sự có mặt của đích được quan tâm, *ví dụ như*, đích, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa gốc che giấu (MM), gốc có thể phân cắt (CM) mà được phân cắt bằng tác nhân phân cắt, ví dụ như, proteaza, và miền liên kết kháng nguyên hoặc mảnh của chúng (AB) mà liên kết đặc hiệu đích được quan tâm, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được hoạt hóa, không được phân cắt có chứa sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB hoặc AB-CM-MM; (a) trong đó MM là peptit mà ức chế sự liên kết của AB với đích, và trong đó MM không có trình tự axit amin của đối tác liên kết có trong tự nhiên của AB và không phải là dạng được cải biến của đối tác liên kết tự nhiên của AB; và (b) trong đó, ở trạng thái không được hoạt hóa, không được phân cắt, MM cản trở sự liên kết đặc hiệu của AB với đích, và ở trạng thái được hoạt hóa, được phân cắt MM không cản trở hoặc cạnh tranh với sự liên kết đặc hiệu của AB với đích; và (ii) đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu chỉ ra rằng tác nhân phân cắt có mặt trong đối tượng hoặc mẫu và trong đó không có hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu chỉ ra rằng tác nhân phân cắt không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa là kháng thể có thể hoạt hóa mà tác nhân trị liệu được liên hợp với. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa không được liên hợp vào tác nhân. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, nhãn có thể phát hiện được được định vị trên AB. Theo một số phương án, việc đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng thứ cấp mà liên kết đặc hiệu với kháng thể được hoạt hóa, trong đó chất phản ứng có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, chất phản ứng thứ cấp là kháng thể có chứa nhãn có thể phát hiện được.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để sử dụng trong phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt và đích ở đối tượng hoặc mẫu, trong đó bộ kit bao gồm ít nhất là kháng thể có thể hoạt hóa có chứa gốc che giấu (MM), gốc có thể phân cắt (CM) mà được phân cắt bằng tác nhân phân cắt, ví dụ như, proteaza, và miền liên kết kháng nguyên hoặc mảnh của chúng (AB) mà liên kết đặc hiệu đích được quan tâm, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được hoạt hóa, không được phân cắt có chứa sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB hoặc AB-CM-MM; (a) trong đó MM là peptit mà ức chế sự liên kết của AB với đích, và trong đó MM không có trình tự axit amin của đối tác liên kết có trong tự nhiên của AB và không phải là dạng được cải biến của đối tác liên kết tự nhiên của AB; và (b)

trong đó, ở trạng thái không được hoạt hóa, không được phân cắt, MM cản trở sự liên kết đặc hiệu của AB với đích, và ở trạng thái được hoạt hóa, được phân cắt MM không cản trở hoặc cạnh tranh với sự liên kết đặc hiệu của AB với đích; và (ii) đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu chỉ ra rằng tác nhân phân cắt có mặt trong đối tượng hoặc mẫu và trong đó không có hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu chỉ ra rằng tác nhân phân cắt không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa là kháng thể có thể hoạt hóa mà tác nhân trị liệu được liên hợp với. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa không được liên hợp vào tác nhân. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, nhãn có thể phát hiện được được định vị trên AB. Theo một số phương án, việc đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng thứ cấp mà liên kết đặc hiệu với kháng thể được hoạt hóa, trong đó chất phản ứng có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, chất phản ứng thứ cấp là kháng thể có chứa nhãn có thể phát hiện được.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt ở đối tượng hoặc mẫu bằng cách (i) cho đối tượng hoặc mẫu tiếp xúc với kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa gốc che giấu (MM), gốc có thể phân cắt (CM) mà được phân cắt bằng tác nhân phân cắt, ví dụ như, proteaza, miền liên kết kháng nguyên (AB) mà liên kết đặc hiệu đích, và nhãn có thể phát hiện được, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được hoạt hóa, không được phân cắt có chứa sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB hoặc AB-CM-MM; trong đó MM là peptit mà ức chế sự liên kết của AB với đích, và trong đó MM không có trình tự axit amin của đối tác liên kết có trong tự nhiên của AB và không phải là dạng được cải biến của đối tác liên kết tự nhiên của AB; trong đó, ở trạng thái không được hoạt hóa, không được phân cắt, MM cản trở sự liên kết đặc hiệu của AB với đích, và ở trạng thái được hoạt hóa, được phân cắt MM không cản trở hoặc cạnh tranh với sự liên kết đặc hiệu của AB với đích; và trong đó nhãn có thể phát hiện được được định vị trên một phần của kháng thể có thể hoạt hóa mà được giải phóng sau khi phân cắt của CM; và (ii) đo hàm lượng của nhãn có thể phát hiện được trong đối tượng hoặc mẫu, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của nhãn có thể phát hiện được trong đối tượng hoặc mẫu chỉ ra rằng tác nhân phân cắt không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu và trong đó không có hàm lượng có thể phát hiện được của nhãn có thể phát hiện được trong đối tượng hoặc mẫu chỉ ra rằng tác nhân phân cắt có mặt trong đối tượng hoặc mẫu. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt

hóa là kháng thể có thể hoạt hóa mà tác nhân trị liệu được liên hợp với. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa không được liên hợp vào tác nhân. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, nhãn có thể phát hiện được được định vị trên AB. Theo một số phương án, việc đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng thứ cấp mà liên kết đặc hiệu với kháng thể được hoạt hóa, trong đó chất phản ứng có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, chất phản ứng thứ cấp là kháng thể có chứa nhãn có thể phát hiện được.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để sử dụng trong phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt và đích ở đối tượng hoặc mẫu, trong đó bộ kit bao gồm ít nhất là kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp (ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa mà tác nhân trị liệu được liên hợp với) được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong việc cho tiếp xúc đối tượng hoặc mẫu sinh học và phương tiện để phát hiện hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt và đích có mặt trong đối tượng hoặc mẫu sinh học và trong đó không có hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt, đích hoặc cả tác nhân phân cắt và đích không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, sao cho việc liên kết đích và/hoặc sự phân cắt proteaza của kháng thể có thể hoạt hóa không thể được phát hiện trong đối tượng hoặc mẫu sinh học.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt ở đối tượng hoặc mẫu bằng cách (i) cho đối tượng hoặc mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể có thể hoạt hóa trong sự có mặt của đích, và (ii) đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt có mặt trong đối tượng hoặc mẫu sinh học và trong đó không có hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu sinh học ở hàm lượng có thể phát hiện được, sao cho sự phân cắt proteaza của kháng thể có thể hoạt hóa không thể được phát hiện trong đối tượng hoặc mẫu sinh học. Kháng thể có thể hoạt hóa này bao gồm gốc che giấu (MM), gốc có thể phân cắt (CM) mà được phân cắt bằng tác nhân phân cắt, ví dụ như, proteaza, và miền liên kết kháng nguyên hoặc mảnh của chúng (AB) mà liên kết đặc hiệu đích, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt (*tức là*, không được hoạt hóa)

có chứa sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB hoặc AB-CM-MM; (a) trong đó MM là peptit mà ức chế sự liên kết của AB với đích, và trong đó MM không có trình tự axit amin của đối tác liên kết có trong tự nhiên của AB; và (b) trong đó MM của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt cản trở sự liên kết đặc hiệu của AB với đích, và trong đó MM của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái được phân cắt (*tức là*, được hoạt hóa) không cản trở hoặc cạnh tranh với sự liên kết đặc hiệu của AB với đích. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa là kháng thể có thể hoạt hóa mà tác nhân trị liệu được liên hợp với. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa không được liên hợp vào tác nhân. Theo một số phương án, nhãn có thể phát hiện được được gắn vào gốc che giấu. Theo một số phương án, nhãn có thể phát hiện được được gắn vào gốc có thể phân cắt đầu tận cùng N đối với vị trí phân cắt proteaza. Theo một số phương án, vị trí liên kết kháng nguyên đơn lẻ của AB được che giấu. Theo một số phương án trong đó kháng thể theo sáng chế có ít nhất là hai vị trí liên kết kháng nguyên, ít nhất là một vị trí liên kết kháng nguyên được che giấu và ít nhất là một vị trí liên kết kháng nguyên không được che giấu. Theo một số phương án tất cả các vị trí liên kết kháng nguyên được che giấu. Theo một số phương án, bước đo bao gồm việc sử dụng chất phản ứng thứ cấp có chứa nhãn có thể phát hiện được.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để sử dụng trong phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt và đích ở đối tượng hoặc mẫu, trong đó bộ kit bao gồm ít nhất là kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong việc cho đối tượng hoặc mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể có thể hoạt hóa trong sự có mặt của đích, và đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt có mặt trong đối tượng hoặc mẫu sinh học và trong đó không có hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu sinh học ở hàm lượng có thể phát hiện được, sao cho sự phân cắt proteaza của kháng thể có thể hoạt hóa không thể được phát hiện trong đối tượng hoặc mẫu sinh học. Kháng thể có thể hoạt hóa này bao gồm gốc che giấu (MM), gốc có thể phân cắt (CM) mà được phân cắt bằng tác nhân phân cắt, ví dụ như, proteaza, và miền liên kết kháng nguyên hoặc mảnh của chúng (AB) mà liên kết đặc hiệu đích, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt (*tức là*, không được hoạt hóa) có chứa sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB hoặc AB-CM-MM; (a) trong đó MM là peptit mà ức chế sự liên kết của AB với đích, và trong đó MM không có trình tự axit amin của đối tác liên kết có trong tự nhiên của AB; và (b) trong đó MM của kháng thể có thể

hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt cản trở sự liên kết đặc hiệu của AB với đích, và trong đó MM của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái được phân cắt (*tức là*, được hoạt hóa) không cản trở hoặc cạnh tranh với sự liên kết đặc hiệu của AB với đích. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa là kháng thể có thể hoạt hóa mà tác nhân trị liệu được liên hợp với. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa không được liên hợp vào tác nhân. Theo một số phương án, nhãn có thể phát hiện được được gắn vào gốc che giấu. Theo một số phương án, nhãn có thể phát hiện được được gắn vào gốc có thể phân cắt đầu tận cùng N đối với vị trí phân cắt proteaza. Theo một số phương án, vị trí liên kết kháng nguyên đơn lẻ của AB được che giấu. Theo một số phương án trong đó kháng thể theo sáng chế có ít nhất là hai vị trí liên kết kháng nguyên, ít nhất là một vị trí liên kết kháng nguyên được che giấu và ít nhất là một vị trí liên kết kháng nguyên không được che giấu. Theo một số phương án tất cả các vị trí liên kết kháng nguyên được che giấu. Theo một số phương án, bước đo bao gồm việc sử dụng chất phản ứng thứ cấp có chứa nhãn có thể phát hiện được.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để sử dụng trong phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt ở đối tượng hoặc mẫu, trong đó bộ kit bao gồm ít nhất là kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong việc cho tiếp xúc đối tượng hoặc mẫu sinh học và phương tiện để phát hiện hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm nhãn có thể phát hiện được mà được định vị trên một phần của kháng thể có thể hoạt hóa mà được giải phóng sau khi phân cắt của CM, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu sinh học sao cho việc liên kết đích và/hoặc sự phân cắt proteaza của kháng thể có thể hoạt hóa không thể được phát hiện trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, và trong đó không có hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt có mặt trong đối tượng hoặc mẫu sinh học ở hàm lượng có thể phát hiện được.

Sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt và đích ở đối tượng hoặc mẫu bằng cách (i) cho đối tượng hoặc mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm nhãn có thể phát hiện được mà được định vị trên một phần của kháng thể có thể hoạt hóa mà được giải phóng sau khi phân cắt của CM và (ii) đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt, đích hoặc cả tác nhân phân cắt và

đích không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, sao cho việc liên kết đích và/hoặc sự phân cắt proteaza của kháng thể có thể hoạt hóa không thể được phát hiện trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, và trong đó hàm lượng có thể phát hiện được làm giảm của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt và đích có mặt trong đối tượng hoặc mẫu sinh học. Hàm lượng được làm giảm của nhãn có thể phát hiện được là, ví dụ như, sự giảm đi khoảng 5%, khoảng 10%, khoảng 15%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95% và/hoặc khoảng 100%. Kháng thể có thể hoạt hóa này bao gồm gốc che giấu (MM), gốc có thể phân cắt (CM) mà được phân cắt bằng tác nhân phân cắt, và miền liên kết kháng nguyên hoặc mảnh của chúng (AB) mà liên kết đặc hiệu đích, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt (*tức là*, không được hoạt hóa) có chứa sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB hoặc AB-CM-MM; (a) trong đó MM là peptit mà ức chế sự liên kết của AB với đích, và trong đó MM không có trình tự axit amin của đối tác liên kết có trong tự nhiên của AB; và (b) trong đó MM của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt cản trở sự liên kết đặc hiệu của AB với đích, và trong đó MM của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái được phân cắt (*tức là*, được hoạt hóa) không cản trở hoặc cạnh tranh với sự liên kết đặc hiệu của AB với đích. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa là kháng thể có thể hoạt hóa mà tác nhân trị liệu được liên hợp với. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa không được liên hợp vào tác nhân. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, nhãn có thể phát hiện được được định vị trên AB. Theo một số phương án, việc đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng thứ cấp mà liên kết đặc hiệu với kháng thể được hoạt hóa, trong đó chất phản ứng có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, chất phản ứng thứ cấp là kháng thể có chứa nhãn có thể phát hiện được.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để sử dụng trong phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt và đích ở đối tượng hoặc mẫu, trong đó bộ kit bao gồm ít nhất là kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong việc cho tiếp xúc đối tượng hoặc mẫu sinh học và phương tiện để phát hiện hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt, đích hoặc cả tác nhân phân cắt và đích không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, sao cho việc liên kết đích và/hoặc sự phân cắt proteaza của kháng thể có

thể hoạt hóa không thể được phát hiện trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, và trong đó hàm lượng có thể phát hiện được làm giảm của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt và đích có mặt trong đối tượng hoặc mẫu sinh học. Hàm lượng được làm giảm của nhãn có thể phát hiện được là, ví dụ như, sự giảm đi khoảng 5%, khoảng 10%, khoảng 15%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95% và/hoặc khoảng 100%.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt ở đối tượng hoặc mẫu bằng cách (i) cho đối tượng hoặc mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm nhãn có thể phát hiện được mà được định vị trên một phần của kháng thể có thể hoạt hóa mà được giải phóng sau khi phân cắt của CM; và (ii) đo hàm lượng của nhãn có thể phát hiện được trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của nhãn có thể phát hiện được trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu sinh học ở hàm lượng có thể phát hiện được, sao cho sự phân cắt proteaza của kháng thể có thể hoạt hóa không thể được phát hiện trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, và trong đó hàm lượng có thể phát hiện được làm giảm của nhãn có thể phát hiện được trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt có mặt trong đối tượng hoặc mẫu sinh học. Hàm lượng được làm giảm của nhãn có thể phát hiện được là, ví dụ như, sự giảm đi khoảng 5%, khoảng 10%, khoảng 15%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95% và/hoặc khoảng 100%. Kháng thể có thể hoạt hóa này bao gồm gốc che giấu (MM), gốc có thể phân cắt (CM) mà được phân cắt bằng tác nhân phân cắt, và miền liên kết kháng nguyên hoặc mảnh của chúng (AB) mà liên kết đặc hiệu đích, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt (*tức là*, không được hoạt hóa) có chứa sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB hoặc AB-CM-MM; (a) trong đó MM là peptit mà ức chế sự liên kết của AB với đích, và trong đó MM không có trình tự axit amin của đối tác liên kết có trong tự nhiên của AB; và (b) trong đó MM của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái không được phân cắt cản trở sự liên kết đặc hiệu của AB với đích, và trong đó MM của kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái được phân cắt (*tức là*, được hoạt hóa) không cản trở hoặc cạnh tranh với sự liên kết đặc hiệu của AB với đích. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa là kháng thể có thể hoạt hóa mà tác nhân trị liệu được liên hợp với. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa không được liên hợp vào tác nhân. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, nhãn có thể phát hiện được

được định vị trên AB. Theo một số phương án, việc đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng thứ cấp mà liên kết đặc hiệu với kháng thể được hoạt hóa, trong đó chất phản ứng có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, chất phản ứng thứ cấp là kháng thể có chứa nhãn có thể phát hiện được.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để sử dụng trong phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt được quan tâm ở đối tượng hoặc mẫu, trong đó bộ kit bao gồm ít nhất là kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong việc cho tiếp xúc đối tượng hoặc mẫu sinh học và phương tiện để phát hiện hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm nhãn có thể phát hiện được mà được định vị trên một phần của kháng thể có thể hoạt hóa mà được giải phóng sau khi phân cắt của CM, trong đó hàm lượng có thể phát hiện được của nhãn có thể phát hiện được trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt, đích, hoặc cả tác nhân phân cắt và đích không có mặt và/hoặc không có mặt đủ trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, sao cho việc liên kết đích và/hoặc sự phân cắt proteaza của kháng thể có thể hoạt hóa không thể được phát hiện trong đối tượng hoặc mẫu sinh học, và trong đó hàm lượng có thể phát hiện được làm giảm của nhãn có thể phát hiện được trong đối tượng hoặc mẫu sinh học chỉ ra rằng tác nhân phân cắt và đích có mặt trong đối tượng hoặc mẫu sinh học. Hàm lượng được làm giảm của nhãn có thể phát hiện được là, ví dụ như, sự giảm đi khoảng 5%, khoảng 10%, khoảng 15%, khoảng 20%, khoảng 25%, khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95% và/hoặc khoảng 100%.

Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, kháng thể có thể hoạt hóa bao gồm nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, nhãn có thể phát hiện được bao gồm tác nhân chụp ảnh, tác nhân tương phản, enzym, nhãn huỳnh quang, nhóm mang màu, thuốc nhuộm, một hoặc nhiều ion kim loại, hoặc nhãn dựa trên phối tử. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, tác nhân chụp ảnh có chứa đồng vị phóng xạ. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, đồng vị phóng xạ là inđi hoặc techneti. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, tác nhân tương phản có chứa iot, gađolini hoặc sắt oxit. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, enzym có chứa peroxiđaza củ cải ngựa, phosphataza kiềm, hoặc β-galactosiđaza. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, nhãn huỳnh quang có chứa protein huỳnh quang vàng (YFP), protein huỳnh quang màu xanh ngọc (CFP), protein huỳnh quang màu xanh lá cây (GFP), protein huỳnh quang màu đỏ được cải biến (mRFP), protein huỳnh quang màu đỏ tdimer2 (RFP tdimer2),

HCRED, hoặc dẫn xuất europi. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, nhãn phát quang có chứa dẫn xuất N-metylacryđi. Theo một số phương án của các phương pháp này, nhãn có chứa nhãn Alexa Fluor®, chẳng hạn như Alex Fluor® 680 hoặc Alexa Fluor® 750. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, nhãn dựa trên phối tử có chứa biotin, aviđin, streptaviđin hoặc một hoặc nhiều hapten.

Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, đối tượng là động vật có vú. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, đối tượng là người. Theo một số phương án, đối tượng là động vật có vú không phải là người, chẳng hạn như động vật linh trưởng không phải là người, động vật làm bạn (ví dụ như, mèo, chó, ngựa), động vật nông trại, động vật làm việc, hoặc động vật vườn thú. Theo một số phương án, đối tượng là động vật gặm nhấm.

Theo một số phương án của các phương pháp này, phương pháp này là phương pháp *in vivo*. Theo một số phương án của các phương pháp này, phương pháp là phương pháp *in situ*. Theo một số phương án của các phương pháp này, phương pháp là phương pháp *ex vivo*. Theo một số phương án của các phương pháp này, phương pháp là phương pháp *in vitro*.

Theo một số phương án, việc chụp ảnh *in situ* và/hoặc việc chụp ảnh *in vivo* hữu dụng trong phương pháp để xác định bệnh nhân nào cần điều trị. Ví dụ như, trong chụp ảnh *in situ*, kháng thể có thể hoạt hóa được sử dụng để sàng lọc mẫu bệnh nhân để xác định những bệnh nhân có (các) proteaza và (các) đích thích hợp ở nơi thích hợp, *ví dụ như*, tại vị trí khối u.

Theo một số phương án việc chụp ảnh *in situ* được sử dụng để xác định hoặc theo cách khác tinh giản quần thể bệnh nhân thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế. Ví dụ như, bệnh nhân mà thử nghiệm dương tính đối với cả đích (ví dụ như, đích) và proteaza mà phân cắt cơ chất ở gốc có thể phân cắt (CM) của kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm (ví dụ như, tích lũy kháng thể được hoạt hóa tại vị trí bệnh) được xác định là ứng viên thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa này có chứa CM này. Tương tự, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính đối với một trong hai hoặc cả đích (*ví dụ như*, đích) và proteaza mà phân cắt cơ chất ở CM trong kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm bằng cách sử dụng các phương pháp này có thể được xác định làm ứng viên thích hợp cho dạng trị liệu khác. Theo một số phương án, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính đối với kháng thể có thể hoạt hóa thứ nhất có thể được thử nghiệm với kháng thể khác có thể hoạt hóa có chứa các CM khác nhau đến khi kháng thể có thể hoạt hóa thích hợp để điều trị được xác định (ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa CM mà được phân cắt bởi bệnh nhân tại vị trí của bệnh). Theo một số phương án, sau đó bệnh nhân được dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể có thể hoạt hóa mà bệnh nhân đã được thử nghiệm dương tính đối với nó.

Theo một số phương án việc chụp ảnh *in vivo* được sử dụng để xác định hoặc theo cách khác tinh giản quần thể bệnh nhân thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế. Ví dụ như, bệnh nhân mà thử nghiệm dương tính đối với cả đích (ví dụ như, đích) và proteaza mà phân cắt cơ chất ở gốc có thể phân cắt (CM) của kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm (ví dụ như, tích lũy kháng thể được hoạt hóa tại vị trí bệnh) được xác định là ứng viên thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa này có chứa CM này. Tương tự, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính có thể được xác định làm ứng viên thích hợp cho dạng trị liệu khác. Theo một số phương án, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính đối với kháng thể có thể hoạt hóa thứ nhất có thể được thử nghiệm với kháng thể khác có thể hoạt hóa có chứa các CM khác nhau đến khi kháng thể có thể hoạt hóa thích hợp để điều trị được xác định (ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa CM mà được phân cắt bởi bệnh nhân tại vị trí của bệnh). Theo một số phương án, sau đó bệnh nhân được dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể có thể hoạt hóa mà bệnh nhân đã được thử nghiệm dương tính đối với nó.

Theo một số phương án của phương pháp và bộ kit, phương pháp hoặc bộ kit được sử dụng để xác định hoặc theo cách khác tinh giản quần thể bệnh nhân thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế. Ví dụ như, bệnh nhân mà thử nghiệm dương tính đối với cả hai đích (ví dụ như, đích) và proteaza mà phân cắt cơ chất ở gốc có thể phân cắt (CM) của kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm trong các phương pháp này được xác định là ứng viên thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa này có chứa CM này. Tương tự, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính đối với cả hai đích (*ví dụ như*, đích) và proteaza mà phân cắt cơ chất ở CM trong kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm bằng cách sử dụng các phương pháp này có thể được xác định làm ứng viên thích hợp cho dạng trị liệu khác. Theo một số phương án, bệnh nhân này có thể được thử nghiệm với kháng thể khác có thể hoạt hóa đến khi kháng thể có thể hoạt hóa thích hợp để điều trị được xác định (ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa CM mà được phân cắt bởi bệnh nhân tại vị trí của bệnh). Theo một số phương án, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính đối với một trong hai đích (*ví dụ như*, đích) được xác định là ứng viên thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa này có chứa CM này. Theo một số phương án, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính đối với một trong hai đích (*ví dụ như*, đích) được xác định là không phải là ứng viên thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa này có chứa CM này. Theo một số phương án, bệnh nhân này có thể được thử nghiệm với kháng thể khác có thể hoạt hóa đến khi kháng thể có thể hoạt hóa thích hợp để điều trị được xác định (ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa CM mà được phân cắt bởi bệnh nhân tại vị trí của bệnh). Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa là kháng thể có thể hoạt hóa mà tác nhân trị liệu được liên hợp với. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa không được liên hợp vào tác nhân. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa có

chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, nhãn có thể phát hiện được được định vị trên AB. Theo một số phương án, việc đo hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa trong đối tượng hoặc mẫu được thực hiện bằng cách sử dụng chất phản ứng thứ cấp mà liên kết đặc hiệu với kháng thể được hoạt hóa, trong đó chất phản ứng có chứa nhãn có thể phát hiện được. Theo một số phương án, chất phản ứng thứ cấp là kháng thể có chứa nhãn có thể phát hiện được.

Theo một số phương án, phương pháp hoặc bộ kit được sử dụng để xác định hoặc theo cách khác tinh giản quần thể bệnh nhân thích hợp để điều trị với kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-đích (ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa mà tác nhân trị liệu được liên hợp với) theo sáng chế, sau đó là điều trị bằng cách dùng kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp đó cho đối tượng cần chúng. Ví dụ như, bệnh nhân mà thử nghiệm dương tính đối với cả đích (ví dụ như, đích) và proteaza mà phân cắt cơ chất ở gốc có thể phân cắt (CM) của kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được thử nghiệm trong các phương pháp này được xác định là ứng viên thích hợp để điều trị bằng kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp này có chứa CM này, và sau đó bệnh nhân được dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà được thử nghiệm. Tương tự, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính đối với một trong hai hoặc cả đích (ví dụ như, đích) và proteaza mà phân cắt cơ chất ở CM trong kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm bằng cách sử dụng các phương pháp này có thể được xác định làm ứng viên thích hợp cho dạng trị liệu khác. Theo một số phương án, bệnh nhân này có thể được thử nghiệm với kháng thể khác và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp đến khi kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp thích hợp để điều trị được xác định (*ví dụ như*, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa CM mà được phân cắt bởi bệnh nhân tại vị trí của bệnh). Theo một số phương án, sau đó bệnh nhân được dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp mà bệnh nhân đã được thử nghiệm dương tính đối với nó.

Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, MM là peptit có chiều dài từ khoảng 4 đến 40 axit amin. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa cầu nối peptit, trong đó cầu nối peptit được định vị giữa MM và CM. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa cầu nối peptit, trong đó cầu nối peptit được định vị giữa AB và CM. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa cầu nối peptit thứ nhất (LP1) và cầu nối peptit thứ hai (LP2), trong đó cầu nối peptit thứ nhất được định vị giữa MM và CM và cầu nối peptit thứ hai được định vị giữa AB và CM. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, mỗi trong số LP1 và LP2 là peptit có chiều dài khoảng từ 1 đến 20 axit amin, và trong đó

mỗi trong số LP1 và LP2 không cần phải là cầu nối giống nhau. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, một hoặc cả hai LP1 và LP2 có chứa polyme glyxin-serin. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, ít nhất là một trong số LP1 và LP2 có chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có (GS)n, (GSGGS)n (SEQ ID NO: 24) và (GGGS)n (SEQ ID NO: 25), trong đó n là số nguyên bằng ít nhất là một. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, ít nhất là một trong số LP1 và LP2 có chứa trình tự axit amin có công thức (GGS)n, trong đó n là số nguyên bằng ít nhất là một. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, ít nhất là một trong số LP1 và LP2 có chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 26), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 27), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 28), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 29), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 30), và Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 31).

Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, AB có chứa kháng thể hoặc mảnh kháng thể trình tự được chọn từ các trình tự kháng thể liên kết chéo được thể hiện trong bản mô tả này. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, AB có chứa mảnh Fab, scFv hoặc kháng thể đơn chuỗi (scAb).

Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, tác nhân phân cắt là proteaza mà được đồng định vị trong đối tượng hoặc mẫu với đích và CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza, trong đó proteaza phân cắt CM trong kháng thể có thể hoạt hóa khi kháng thể có thể hoạt hóa được bộc lộ ra với proteaza. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, CM là polypeptit có chiều dài lên đến 15 axit amin. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, CM được ghép nối với đầu tận cùng N của AB. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, CM được ghép nối với đầu tận cùng C của AB. Theo một số phương án của các phương pháp và bộ kit này, CM được ghép nối với đầu tận cùng N của chuỗi VL của AB.

Các đầu tận cùng N và C của các chuỗi polypeptit kháng thể theo sáng chế có thể khác với trình tự được mô tả trong bản mô tả này do sự cải biến sau dịch mã thường được quan sát thấy. Ví dụ như, gốc lysin ở đầu tận cùng C thường bị mất đi từ chuỗi nặng kháng thể. Dick et al. (2008) Biotechnol. Bioeng. 100:1132. Gốc glutamin ở đầu tận cùng N, và đến gốc glutamat ít kéo dài, thường được biến đổi thành gốc pyroglutamat trên cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể trị liệu. Dick et al. (2007) Biotechnol. Bioeng. 97:544; Liu et al. (2011) JBC 28611211; Liu et al. (2011) J. Biol. Chem. 286:11211. Theo đó, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) và/hoặc Công thức (II) có thể có kháng thể (AB) trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng thiếu một hoặc nhiều axit amin ở đầu tận cùng, thiếu lysin đầu tận cùng C, có lysin đầu tận cùng C được loại bỏ do việc xử lý sau dịch mã, hoặc lysin đầu tận cùng C là axit amin

không phải là lysin. Nếu gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng là axit amin không phải là lysin, theo một phương án, nó là axit amin không thường thay đổi để tạo thành liên kết đisulfua hoặc theo cách khác không thay đổi để liên hợp với tác nhân gây độc tế bào.

Theo các phương án nhất định, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) và/hoặc Công thức (II), có thể có kháng thể (AB) trong đó glutamat đầu tận cùng N trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tùy ý là pyroglutamat hoặc được cải biến sau dịch mã thành pyroglutamat.

Theo các phương án nhất định, vùng không đổi chuỗi nặng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) và/hoặc Công thức (II) có chứa lysin hoặc axit amin khác ở đầu tận cùng C, ví dụ như, nó có chứa các axit amin cuối cùng sau đây: PGK đối với chuỗi nặng. Theo các phương án nhất định, vùng không đổi chuỗi nặng thiếu một hoặc nhiều axit amin ở đầu tận cùng C, và có, ví dụ như, trình tự PG hoặc P đầu tận cùng C.

Theo các phương án nhất định, vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có Công thức (I) và/hoặc Công thức (II) có chứa axit amin glutamat hoặc pyroglutamat ở đầu tận cùng N, ví dụ như, nó có chứa các axit amin cuối cùng sau đây: pQGQ đối với chuỗi nhẹ, và/hoặc pQVQ đối với chuỗi nặng, trong đó "pQ" thể hiện pyroglutamat.

Kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được sử dụng trong chế phẩm chẩn đoán và phòng ngừa. Theo một phương án, kháng thể có thể hoạt hóa được dùng cho bệnh nhân mà có nguy cơ phát triển một hoặc nhiều trong số viêm, rối loạn viêm, bệnh ung thư hoặc rối loạn khác nêu trên.

Khuynh hướng của bệnh nhân hoặc cơ quan đối với một hoặc nhiều rối loạn nêu trên có thể được xác định sử dụng chỉ thị kiểu gen, huyết thanh hoặc sinh hóa.

Theo một số phương án theo sáng chế, kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được dùng cho cá thể người được chẩn đoán với chỉ định lâm sàng kết hợp với một hoặc nhiều rối loạn nêu trên. Khi chẩn đoán, kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp được dùng để làm giảm nhẹ hoặc làm đảo ngược tác dụng của chỉ định lâm sàng.

Kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế cũng hữu dụng trong sự phát hiện đích ở mẫu bệnh nhân và theo đó hữu dụng làm chẩn đoán. Ví dụ như, kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế được sử dụng trong thử nghiệm *in vitro*, *ví dụ như*, ELISA, để phát hiện hàm lượng đích trong mẫu bệnh nhân.

Theo một phương án, kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế được cố định trên giá đỡ rắn (*ví dụ như*, (các) giếng của đĩa vi chuẩn độ). Kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa đã được cố định đóng vai trò làm kháng thể bắt giữ đối với đích bất kỳ mà có thể có

mặt trong mẫu thử nghiệm. Trước khi cho tiếp xúc kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa đã được cố định với mẫu bệnh nhân, giá đỡ rắn được rửa và được xử lý bằng tác nhân phong bế chẳng hạn như protein sữa hoặc albumin để ngăn ngừa sự hấp thụ không đặc hiệu của chất phân tích.

Tiếp đó các giếng được xử lý bằng mẫu thử nghiệm bị nghi ngờ chứa kháng nguyên, hoặc với dung dịch chứa lượng tiêu chuẩn của kháng nguyên. Mẫu này là, *ví dụ như*, mẫu huyết thanh từ đối tượng bị nghi ngờ có hàm lượng của kháng nguyên tuần hoàn được coi là chẩn đoán của bệnh lý. Sau khi rửa mẫu thử nghiệm hoặc mẫu chuẩn, giá đỡ rắn được xử lý bằng kháng thể thứ hai mà được gắn nhãn có thể phát hiện được. Kháng thể thứ hai được gắn nhãn đóng vai trò làm kháng thể phát hiện. Hàm lượng của nhãn có thể phát hiện được được đo, và nồng độ của kháng nguyên đích trong mẫu thử nghiệm được xác định bằng cách so sánh với đường cong tiêu chuẩn được phát triển từ các mẫu tiêu chuẩn.

Rõ ràng rằng dựa trên kết quả thu được sử dụng kháng thể và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế trong thử nghiệm chẩn đoán *in vitro*, có thể phân chia giai đoạn bệnh ở đối tượng dựa trên mức độ biểu hiện của kháng nguyên đích. Đối với bệnh nhất định, mẫu của máu được lấy từ đối tượng được chẩn đoán là ở các giai đoạn khác nhau trong sự tiến triển của bệnh, và/hoặc ở các thời điểm khác nhau trong việc điều trị trị liệu của bệnh. Bằng cách sử dụng tập hợp mẫu mà tạo ra kết quả có ý nghĩa thống kê đối với mỗi giai đoạn của sự tiến triển hoặc trị liệu, khoảng giá trị của nồng độ của kháng nguyên mà có thể được coi là đặc trưng của mỗi giai đoạn được thiết kế.

Kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp cũng có thể được dùng trong phương pháp chẩn đoán và/hoặc chụp ảnh. Theo một số phương án, phương pháp này là phương pháp *in vitro*. Theo một số phương án, phương pháp này là phương pháp *in vivo*. Theo một số phương án, phương pháp này là phương pháp *in situ*. Theo một số phương án, phương pháp này là phương pháp *ex vivo*. Ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa có CM có thể phân cắt bằng enzym có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của enzym mà có khả năng phân cắt CM. Kháng thể có thể hoạt hóa này có thể được dùng trong chẩn đoán, mà có thể bao gồm sự phát hiện *in vivo* (*ví dụ như*, định lượng hoặc định tính) của hoạt tính enzym (hoặc, theo một số phương án, môi trường của tiềm năng giảm tăng lên chẳng hạn như môi trường mà có thể mang lại sự giảm đi của liên kết đisulfua) thông qua sự tích lũy đo được của kháng thể được hoạt hóa (tức là, kháng thể bắt nguồn từ sự phân cắt của kháng thể có thể hoạt hóa) trong tế bào hoặc mô nhất định của sinh vật chủ nhất định. Sự tích lũy này của kháng thể được hoạt hóa không chỉ chỉ ra rằng mô biểu hiện hoạt tính enzym (hoặc tiềm năng giảm tăng lên tùy thuộc vào bản chất của CM) mà còn chỉ ra rằng mô biểu hiện đích mà kháng thể được hoạt hóa liên kết với.

Ví dụ như, CM có thể được chọn là cơ chất proteaza cho proteaza được tìm thấy tại vị trí của khối u, tại vị trí của sự nhiễm virut hoặc vi khuẩn tại vị trí bị giới hạn sinh học (*ví dụ như*, chẳng hạn như trong chỗ áp xe, trong cơ quan, và dạng tương tự), và dạng tương tự. AB có thể là mảnh mà liên kết kháng nguyên đích. Bằng cách sử dụng phương pháp quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, nhãn có thể phát hiện được (*ví dụ như*, nhãn huỳnh quang hoặc nhãn có hoạt tính phóng xạ hoặc chất phóng xạ đánh dấu) có thể được liên hợp vào AB hoặc vùng khác của kháng thể có thể hoạt hóa. Nhãn có thể phát hiện được thích hợp được thảo luận trong ngữ cảnh của phương pháp sàng lọc nêu trên và các ví dụ cụ thể khác được nêu dưới đây. Bằng cách sử dụng AB đặc hiệu đối với protein hoặc peptit của tình trạng bệnh, cùng với proteaza mà hoạt tính của nó được tăng lên trong mô bệnh được quan tâm, kháng thể có thể hoạt hóa sẽ thể hiện tốc độ tăng lên của việc liên kết với mô bệnh tương quan với mô trong đó enzym đặc hiệu CM không có mặt ở hàm lượng có thể phát hiện được hoặc có mặt ở hàm lượng thấp hơn so với ở mô bệnh hoặc bị bất hoạt (ví dụ như, ở dạng tiền enzym hoặc trong phức hợp với chất ức chế). Vì protein và peptit nhỏ được thanh thải nhanh chóng từ máu bằng hệ thống lọc thận, và bởi vì enzym đặc hiệu đối với CM không có mặt ở hàm lượng có thể phát hiện được (hoặc có mặt ở hàm lượng thấp hơn ở mô không bị bệnh hoặc có mặt trong cấu hình bất hoạt), sự tích lũy của kháng thể được hoạt hóa trong mô bệnh được tăng cường tương quan với mô không bị bệnh.

Trong ví dụ khác, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt trong mẫu. Ví dụ như, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa chứa CM dễ bị phân cắt bằng enzym, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được sử dụng để phát hiện (định lượng hoặc định tính) sự có mặt của enzym trong mẫu. Trong ví dụ khác, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa chứa CM dễ bị phân cắt bằng tác nhân khử, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được sử dụng để phát hiện (định lượng hoặc định tính) sự có mặt của điều kiện khử trong mẫu. Để làm thuận tiện cho phân tích trong các phương pháp này, kháng thể có thể hoạt hóa có thể được gắn nhãn có thể phát hiện, và có thể được liên kết với giá đỡ (*ví dụ như*, giá đỡ rắn, chẳng hạn như bản kính hoặc hạt). Nhãn có thể phát hiện được có thể được định vị trên một phần của kháng thể có thể hoạt hóa mà không được giải phóng sau khi phân cắt, ví dụ như, nhãn có thể phát hiện được có thể là nhãn huỳnh quang đã được dập tắt hoặc nhãn khác mà không phát hiện được đến khi sự phân cắt xảy ra. Thử nghiệm có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ như, cho kháng thể có thể hoạt hóa được gắn nhãn có thể phát hiện được, được cố định tiếp xúc với mẫu bị nghi ngờ chứa enzym và/hoặc tác nhân khử trong thời gian đủ để sự phân cắt xảy ra, sau đó rửa để loại bỏ mẫu dư và tạp chất. Sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt (*ví dụ như*, enzym hoặc tác nhân khử) trong mẫu sau đó được đánh giá bởi sự thay đổi ở tín hiệu có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa

trước khi cho tiếp xúc với mẫu *ví dụ như*, sự có mặt của và/hoặc sự tăng lên của tín hiệu có thể phát hiện được do sự phân cắt của kháng thể có thể hoạt hóa bằng tác nhân phân cắt trong mẫu.

Phương pháp phát hiện này có thể được điều chỉnh để cũng mang lại sự phát hiện của sự có mặt hoặc không có mặt của đích mà có khả năng liên kết AB của kháng thể có thể hoạt hóa khi được phân cắt. Do đó, thử nghiệm có thể được điều chỉnh để đánh giá sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt và sự có mặt hoặc không có mặt của đích được quan tâm. Sự có mặt hoặc không có mặt của tác nhân phân cắt có thể được phát hiện bằng sự có mặt của và/hoặc sự tăng lên của nhãn có thể phát hiện được của kháng thể có thể hoạt hóa như được mô tả ở trên, và sự có mặt hoặc không có mặt của đích có thể được phát hiện bằng sự phát hiện của phức hợp đích-AB *ví dụ như*, bằng cách sử dụng kháng thể kháng-đích được gắn nhãn có thể phát hiện được.

Kháng thể có thể hoạt hóa cũng hữu dụng trong việc chụp ảnh *in situ* để đánh giá kháng thể có thể hoạt hóa sự hoạt hóa, *ví dụ như*, bằng sự phân cắt proteaza, và việc liên kết với đích cụ thể. Chụp ảnh *in situ* là kỹ thuật mà giúp cho có thể định vị hoạt tính phân giải protein và đích trong mẫu sinh học chẳng hạn như môi trường nuôi cấy tế bào hoặc phần mô. Bằng cách sử dụng kỹ thuật này, có thể xác nhận cả hai việc liên kết với đích nhất định và hoạt tính phân giải protein dựa trên sự có mặt của nhãn có thể phát hiện được (ví dụ như, nhãn huỳnh quang).

Các kỹ thuật này hữu dụng với tế bào hoặc mô đông lạnh bất kỳ có nguồn gốc từ vị trí bệnh (*ví dụ như* mô khối u) hoặc mô khỏe mạnh. Các kỹ thuật này cũng hữu dụng với mẫu tế bào hoặc mô tươi.

Trong các kỹ thuật này, kháng thể có thể hoạt hóa được gắn nhãn bằng nhãn có thể phát hiện được. Nhãn có thể phát hiện được có thể là thuốc nhuộm huỳnh quang, (ví dụ như Fluorescein Isothioxyanat (FITC), Rhođamin Isothioxyanat (TRITC), thuốc nhuộm hồng ngoại gần (NIR) (ví dụ như, tinh thể nano Qdot®), kim loại keo, hapten, chỉ thị có hoạt tính phóng xạ, biotin và chất phản ứng khuếch đại chẳng hạn như streptaviđin, hoặc enzym (ví dụ như peroxiđaza củ cải ngựa hoặc phosphataza kiềm).

Sự phát hiện của nhãn trong mẫu mà đã được ủ với kháng thể có thể hoạt hóa, được gắn nhãn chỉ ra rằng mẫu chứa đích và chứa proteaza mà đặc hiệu đối với CM của kháng thể có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, sự có mặt của proteaza có thể được xác nhận bằng cách sử dụng chất ức chế proteaza phổ rộng chẳng hạn như các chất ức chế được mô tả trong bản mô tả này, và/hoặc bằng cách sử dụng tác nhân mà đặc hiệu đối với proteaza, ví dụ như, kháng thể chẳng hạn như A11, mà đặc hiệu đối với proteaza matriptaza và ức chế hoạt tính phân giải protein của matriptaza; xem ví dụ như, công bố quốc tế số WO 2010/129609, công bố ngày 11 tháng 11 năm 2010. Cùng phương pháp sử dụng chất ức chế proteaza phổ rộng chẳng hạn như các chất được mô tả trong bản mô tả này, và/hoặc bằng cách sử dụng tác nhân ức chế chọn lọc hơn có thể được sử dụng để xác định

proteaza hoặc lớp proteaza đặc hiệu đối với CM của kháng thể có thể hoạt hóa. Theo một số phương án, sự có mặt của đích có thể được xác nhận bằng cách sử dụng tác nhân mà đặc hiệu đối với đích, *ví dụ như*, kháng thể khác, hoặc nhãn có thể phát hiện được có thể được cạnh tranh với đích không được gắn nhãn. Theo một số phương án, kháng thể có thể hoạt hóa không được gắn nhãn có thể được sử dụng, với sự phát hiện bằng kháng thể thứ cấp được gắn nhãn hoặc nhiều hệ thống phát hiện phức hợp.

Các kỹ thuật tương tự cũng hữu dụng để chụp ảnh *in vivo* trong đó sự phát hiện của tín hiệu huỳnh quang ở đối tượng, *ví dụ như*, động vật có vú, bao gồm người, chỉ ra rằng vị trí bệnh chứa đích và chứa proteaza mà đặc hiệu đối với CM của kháng thể có thể hoạt hóa.

Các kỹ thuật này cũng hữu dụng trong bộ kit và/hoặc làm chất phản ứng đối với sự phát hiện, sự xác định hoặc sự xác định đặc điểm của hoạt tính proteaza trong nhiều tế bào, mô, và sinh vật dựa trên CM đặc hiệu proteaza trong kháng thể có thể hoạt hóa.

Theo một số phương án, việc chụp ảnh *in situ* và/hoặc việc chụp ảnh *in vivo* hữu dụng trong phương pháp để xác định bệnh nhân nào cần điều trị. Ví dụ như, trong chụp ảnh *in situ*, kháng thể có thể hoạt hóa được sử dụng để sàng lọc mẫu bệnh nhân để xác định những bệnh nhân có (các) proteaza và (các) đích thích hợp ở nơi thích hợp, *ví dụ như*, tại vị trí khối u.

Theo một số phương án việc chụp ảnh *in situ* được sử dụng để xác định hoặc theo cách khác tinh giản quần thể bệnh nhân thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế. Ví dụ như, bệnh nhân mà thử nghiệm dương tính đối với cả đích và proteaza mà phân cắt cơ chất ở gốc có thể phân cắt (CM) của kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm (ví dụ như, tích lũy kháng thể được hoạt hóa tại vị trí bệnh) được xác định là ứng viên thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa này có chứa CM này. Tương tự, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính đối với một trong hai hoặc cả đích và proteaza mà phân cắt cơ chất ở CM trong kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm bằng cách sử dụng các phương pháp này được xác định là ứng viên thích hợp cho dạng trị liệu khác (*tức là*, không thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm). Theo một số phương án, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính đối với kháng thể có thể hoạt hóa thứ nhất có thể được thử nghiệm với kháng thể khác có thể hoạt hóa có chứa các CM khác nhau đến khi kháng thể có thể hoạt hóa thích hợp để điều trị được xác định (ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa CM mà được phân cắt bởi bệnh nhân tại vị trí của bệnh).

Theo một số phương án việc chụp ảnh *in vivo* được sử dụng để xác định hoặc theo cách khác tinh giản quần thể bệnh nhân thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa theo sáng chế. Ví dụ như, bệnh nhân mà thử nghiệm dương tính đối với cả đích và proteaza mà phân cắt cơ chất ở gốc có thể phân cắt (CM) của kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm (ví dụ như, tích lũy kháng thể được hoạt hóa tại vị trí bệnh) được xác định là ứng viên thích hợp để điều trị bằng kháng

thể có thể hoạt hóa này có chứa CM này. Tương tự, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính được xác định là ứng viên thích hợp cho dạng trị liệu khác (*tức là*, không thích hợp để điều trị bằng kháng thể có thể hoạt hóa được thử nghiệm). Theo một số phương án, bệnh nhân mà thử nghiệm âm tính đối với kháng thể có thể hoạt hóa thứ nhất có thể được thử nghiệm với kháng thể khác có thể hoạt hóa có chứa các CM khác nhau đến khi kháng thể có thể hoạt hóa thích hợp để điều trị được xác định (ví dụ như, kháng thể có thể hoạt hóa có chứa CM mà được phân cắt bởi bệnh nhân tại vị trí của bệnh).

Dược phẩm

Kháng thể, kháng thể được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa và/hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế (còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng "hợp chất hoạt tính"), và dẫn xuất, mảnh, chất tương tự và thể tương đồng của chúng, có thể được kết hợp vào dược phẩm thích hợp để sử dụng.

Đặc biệt có lợi để tạo chế phẩm các hợp phần dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa ở dạng liều đơn vị để dễ dùng và độ đồng đều của liều lượng. Dạng đơn vị liều lượng như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ các đơn vị riêng rẽ về mặt vật lý thích hợp làm liều lượng đơn vị cho đối tượng cần điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng định trước của hoạt chất được tính để tạo ra tác dụng trị liệu mong muốn khi kết hợp với chất mang dược dụng cần thiết. Đặc điểm kỹ thuật đối với dạng đơn vị liều lượng theo sáng chế bị áp chế bởi và trực tiếp phụ thuộc vào các đặc điểm độc nhất của hợp chất hoạt tính và tác dụng trị liệu cụ thể cần đạt được, và các giới hạn vốn có trong lĩnh vực của việc pha chế hợp chất hoạt tính này để điều trị cho các cá thể.

Dược phẩm có thể được bao gồm trong vật chứa, gói, hoặc dụng cụ phân tán cùng với hướng dẫn sử dụng.

Sáng chế sẽ được mô tả thêm trong các phương án được đánh số và các ví dụ sau đây, mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế mà được mô tả trong yêu cầu bảo hộ.

CÁC PHƯƠNG ÁN ĐƯỢC ĐÁNH SỐ

Sáng chế có thể được xác định bằng cách tham chiếu đến các phương án minh họa, được đánh số sau đây.

Bộ I

I-1. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa:

(a) kháng thể có thể hoạt hóa (AA) có chứa ở trạng thái không được phân cắt sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB, trong đó:

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 động vật có vú và có chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 5 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 7;

(ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ghép nối với AB ức chế sự liên kết của AB với CD71 khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt;

(iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156 ghép nối với AB trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và

(b) monometyl auristatin E (MMAE), trong đó kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp vào hai đương lượng của MMAE.

I-2. Hợp phần có chứa: kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có công thức AA-(AG)p trong đó

(a) AA là kháng thể có thể hoạt hóa có chứa ở trạng thái không được phân cắt sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB, trong đó:

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 động vật có vú và có chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 5 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 7,

(ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ghép nối với AB ức chế sự liên kết của AB với CD71 khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, và

(iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156 ghép nối với AB trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và

(b) AG là tác nhân được liên hợp vào AA, trong đó tác nhân này là MMAE và trong đó p bằng 2.

I-3. Phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa: liên hợp ít nhất là một MMAE với kháng thể có thể hoạt hóa (AA) bằng cách đó tạo ra hợp phần có chứa AA-(MMAE)p, trong đó p nằm trong khoảng từ 1 đến 8; và làm giàu hợp phần đối với các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó p bằng 2, trong đó AA có chứa ở trạng thái không được phân cắt có chứa sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-CM-AB trong đó:

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 động vật có vú và có chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 5 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 7,

(ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ghép nối với AB mà ức chế sự liên kết của AB với CD71 khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt, và

(iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156 ghép nối với AB trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza.

I-4. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án I-1 hoặc hợp phần theo phương án I-2 hoặc phương pháp theo phương án I-3, trong đó AB có chứa chuỗi nặng trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20.

I-5. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án I-1 hoặc hợp phần theo phương án I-2 hoặc phương pháp theo phương án I-3, trong đó AB có chứa chuỗi nặng trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167.

I-6. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1, I-4, và I-5 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2, I-4, và I-5 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-5, trong đó AB có chứa trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 19.

I-7. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-6 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-6 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I- từ 3 đến 6, trong đó AA có chứa peptit nối LP1 giữa AB và MM.

I-8. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp hoặc hợp phần hoặc phương pháp theo phương án I-7, trong đó LP1 có chứa trình tự axit amin GGGSSGGS (SEQ ID NO: 207).

I-9. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I- 1 và từ 4 đến 8 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-8 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-8, trong đó AA có chứa peptit nối LP2 giữa AB và CM.

I-10. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp hoặc hợp phần hoặc phương pháp theo phương án I-9, trong đó LP2 có chứa trình tự axit amin GGGS (SEQ ID NO: 38).

I-11. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-10 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-10 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-10, trong đó AA có chứa peptit nối thứ nhất (LP1) và peptit nối thứ hai (LP2), và trong đó AA ở trạng thái không được phân cắt có sự sắp xếp cấu trúc từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C như sau: MM-LP1-CM-LP2-AB.

I-12. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-11 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-11 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-11, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa chuỗi nhẹ có chứa trình tự đoạn đệm được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID NO: 138 và 143-145, và GQG.

I-13. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp hoặc hợp phần hoặc phương pháp theo phương án I-12, trong đó trình tự đoạn đệm là từ đầu tận cùng N đến MM.

I-14. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-13 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-13 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-13, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 201.

I-15. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-13 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-13 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-13, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 202.

I-16. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-13 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-13 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-13, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 169.

I-17. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-13 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-13 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-13, trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 170.

I-18. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-17 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-17 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-17, trong đó AB liên kết đặc hiệu CD71 người và CD71 khỉ cynomolgus.

I-19. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-18 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ 4 đến 18 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-18, trong đó MM có hằng số phân ly đối với việc liên kết với AB mà lớn hơn so với hằng số phân ly của AB đối với CD71.

I-20. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-19 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-

4 đến I-19 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-19, trong đó MM không cản trở hoặc cạnh tranh với AB để liên kết với CD71 khi kháng thể có thể hoạt hóa ở tình trạng được phân cắt.

I-21. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-20 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-20 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-20, trong đó MM là polypeptit có chiều dài không nhiều hơn 40 axit amin.

I-22. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-21 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-21 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-21, trong đó CM là cơ chất cho proteaza mà có hoạt tính ở mô bị bệnh.

I-23. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-22 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-22 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-22, trong đó tác nhân được liên hợp vào AB thông qua cầu nối.

I-24. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-23 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-23 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-23, trong đó cầu nối mà nhờ nó tác nhân được liên hợp vào AB có chứa gốc valin-xitrullin.

I-25. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-24 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-24 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-24, trong đó cầu nối mà nhờ nó tác nhân được liên hợp vào AB có chứa gốc maleimit caproyl-valin-xitrullin.

I-26. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-25 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-25 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-25, trong đó cầu nối mà nhờ nó tác nhân được liên hợp vào AB có chứa gốc maleimit caproyl-valin-xitrullin para aminobenzyloxycarbonyl.

I-27. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó ít nhất là 50% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần thuộc loại khi p bằng 2.

I-28. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó ít nhất là 75% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần thuộc loại khi p bằng 2.

I-29. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó ít nhất là 90% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần thuộc loại khi p bằng 2.

I-30. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó ít nhất là 95% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần thuộc loại khi p bằng 2.

I-31. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó ít nhất là 98% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần thuộc loại khi p bằng 2.

I-32. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó đương lượng của mỗi trong số các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần trong đó p bằng 1 hoặc từ 3 đến 8 nhỏ hơn so với đương lượng của các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần trong đó p bằng 2.

I-33. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần trong đó p bằng 1 hoặc từ 3 đến 8 nhỏ hơn so với đương lượng của các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần trong đó p bằng 2.

I-34. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó ít hơn 50% của các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần thuộc loại khi p bằng 1 hoặc từ 3 đến 8.

I-35. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó ít hơn 25% của các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần thuộc loại khi p bằng 1 hoặc từ 3 đến 8.

I-36. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó ít hơn 10% của các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần thuộc loại khi p bằng 1 hoặc từ 3 đến 8.

I-37. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó ít hơn 5%

của các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần thuộc loại khi p bằng 1 hoặc từ 3 đến 8.

I-38. Hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-26 hoặc phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ I-3 đến I-26, trong đó ít hơn 2% của các loại kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của hợp phần thuộc loại khi p bằng 1 hoặc từ 3 đến 8.

I-39. Dược phẩm có chứa:

kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-26 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-38; và chất mang.

I-40. Phương pháp điều trị, làm nhẹ bớt triệu chứng của, hoặc làm trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư ở đối tượng, phương pháp này có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-1 và từ I-4 đến I-26 hoặc hợp phần theo phương án bất kỳ trong số các phương án I-2 và từ I-4 đến I-38 hoặc dược phẩm theo phương án I-39 cho đối tượng cần chúng.

I-41. Phương pháp theo phương án I-40, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư dạ dày.

I-42. Phương pháp theo phương án I-40, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư buồng trứng.

I-43. Phương pháp theo phương án I-40, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư thực quản.

I-44. Phương pháp theo phương án I-40, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ.

I-45. Phương pháp theo phương án I-40, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư vú.

I-46. Phương pháp theo phương án I-40, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư kết trực tràng.

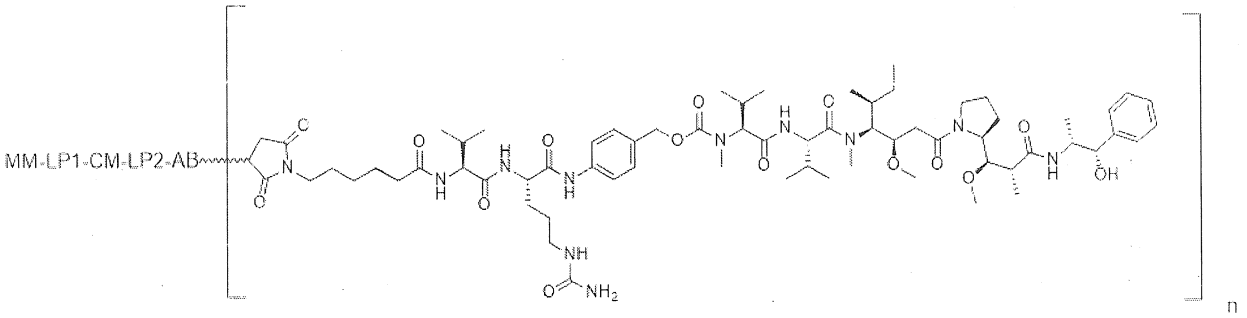
I-47. Phương pháp theo phương án I-40, trong đó bệnh ung thư là u melanin.

I-48. Phương pháp theo phương án I-40, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

I-49. Phương pháp theo phương án I-40, trong đó bệnh ung thư là u trung biểu mô.

Bộ II

II-1. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng:



Công thức (I)

(a) trong đó

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa

i. vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự CDRH1 có chứa SEQ ID NO: 9, trình tự CDRH2 có chứa SEQ ID NO: 10, và trình tự CDRH3 có chứa SEQ ID NO: 11; và

ii. vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự CDRL1 có chứa SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO:13, trình tự CDRL2 có chứa SEQ ID NO: 14, và trình tự CDRL3 có chứa SEQ ID NO: 15;

(ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt;

(iii) LP1 là gốc liên kết thứ nhất có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207;

(iv) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và

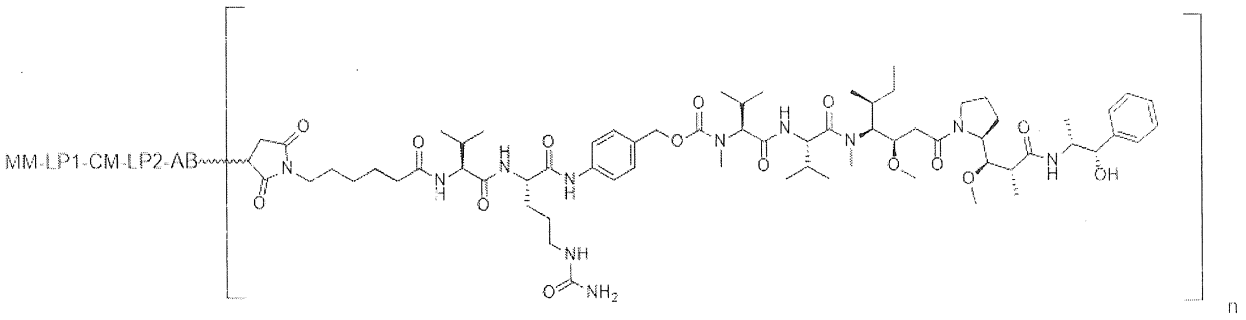
(v) LP2 là gốc liên kết thứ hai có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38; và

(b) trong đó "n" bằng 2.

II-2. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-1, trong đó AB có chứa isotyp IgG1.

II-3. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-1 hoặc II-2, trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin.

II-4. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng:



Công thức (I)

(a) trong đó

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7;

(ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt;

(iii) LP1 là gốc liên kết thứ nhất có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207;

(iv) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và

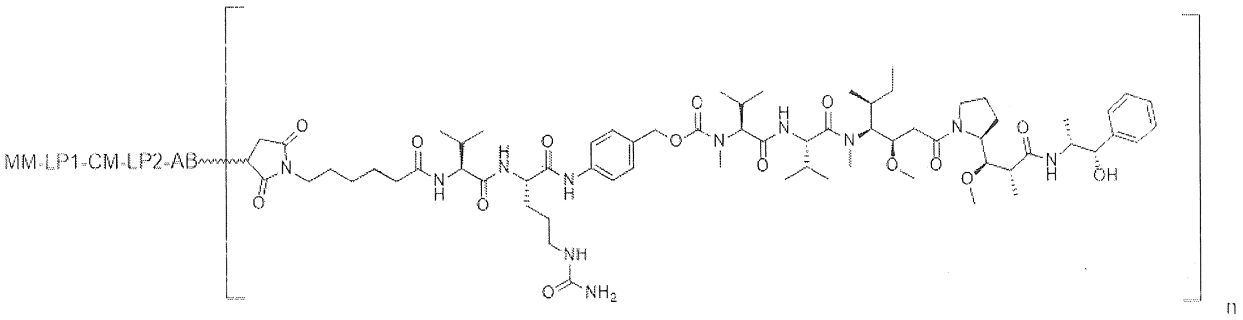
(v) LP2 là gốc liên kết thứ hai có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38; và

(b) trong đó "n" bằng 2.

II-5. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-4, trong đó AB có chứa isotyp IgG1.

II-6. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-4 hoặc II-5, trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin.

II-7. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng:



Công thức (I)

(a) trong đó

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19;

(ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt;

(iii) LP1 là gốc liên kết thứ nhất có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207;

(iv) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và

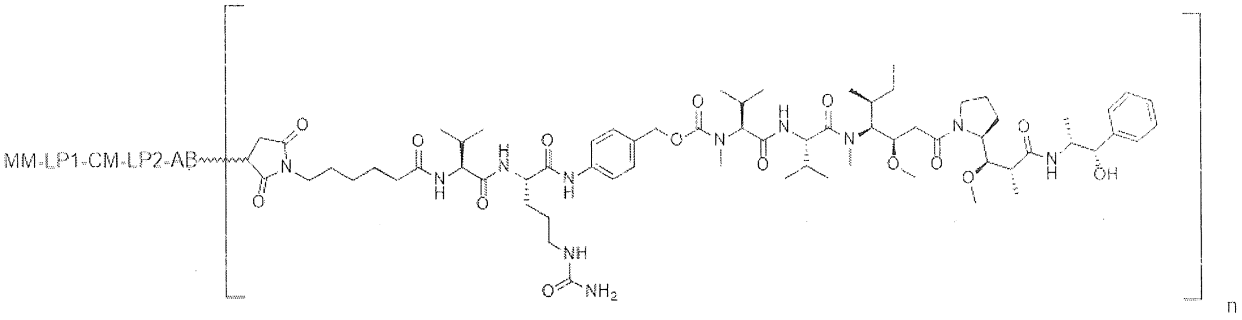
(v) LP2 là gốc liên kết thứ hai có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38; và

(b) trong đó "n" bằng 2.

II-8. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-7, trong đó AB có chứa isotyp IgG1.

II-9. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-7 hoặc II-8, trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin.

II-10. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng:



Công thức (I)

trong đó MM-LP1-CM-LP2-AB là kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người,

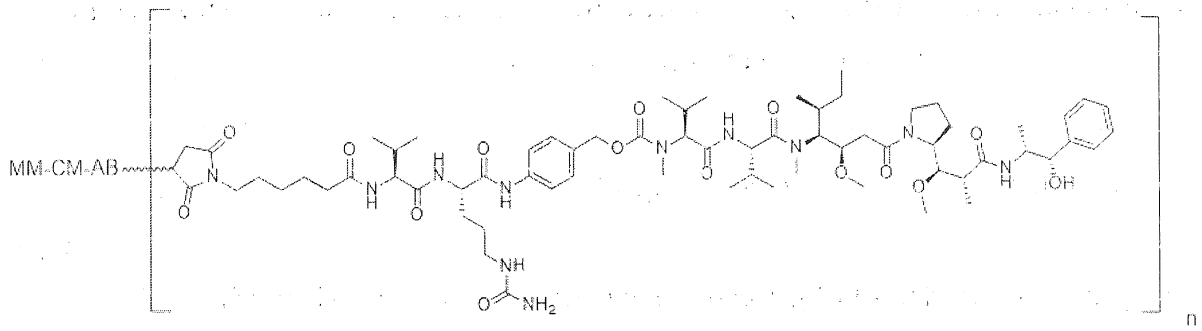
trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 170, và

trong đó "n" bằng 2.

II-11. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-10, trong đó AB có chứa isotyp IgG1.

II-12. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-10 hoặc II-11, trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin.

II-13. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng:



Công thức (II)

(a) trong đó

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa

i. vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự CDRH1 có chứa SEQ ID NO: 9, trình tự CDRH2 có chứa SEQ ID NO: 10, và trình tự CDRH3 có chứa SEQ ID NO: 11; và

ii. vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự CDRL1 có chứa SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO:13, trình tự CDRL2 có chứa SEQ ID NO: 14, và trình tự CDRL3 có chứa SEQ ID NO: 15;

(ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; và

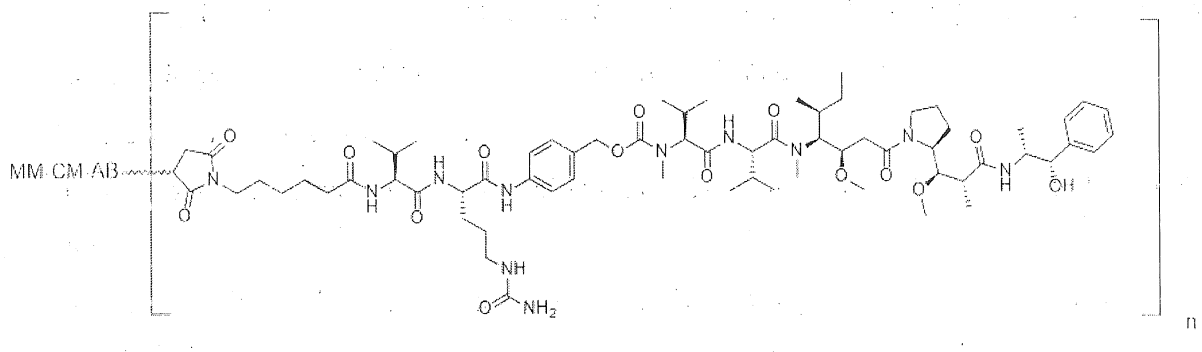
(iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và

(b) trong đó "n" bằng 2.

II-14. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-13, trong đó AB có chứa isotyp IgG1.

II-15. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-13 hoặc II-14, trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin.

II-16. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng:



Công thức (II)

(a) trong đó

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7;

(ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; và

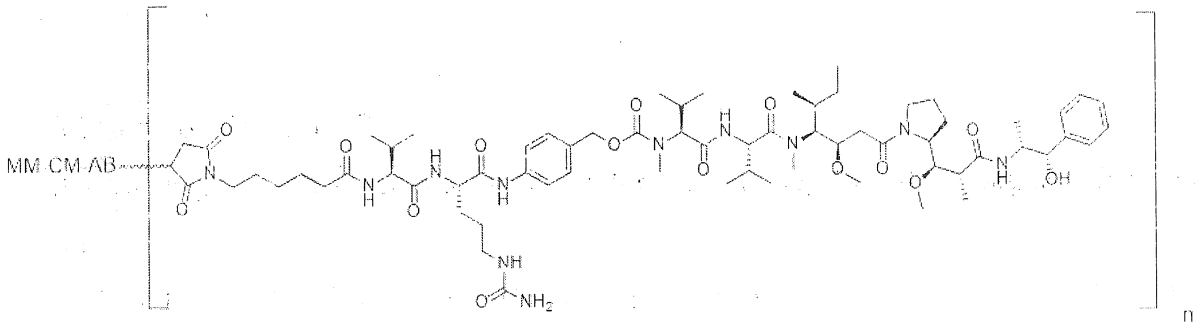
(iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và

(b) trong đó "n" bằng 2.

II-17. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-16, trong đó AB có chứa isotyp IgG1.

II-18. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-16 hoặc II-17, trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin.

II-19. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng:



Công thức (II)

(a) trong đó

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19;

(ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt; và

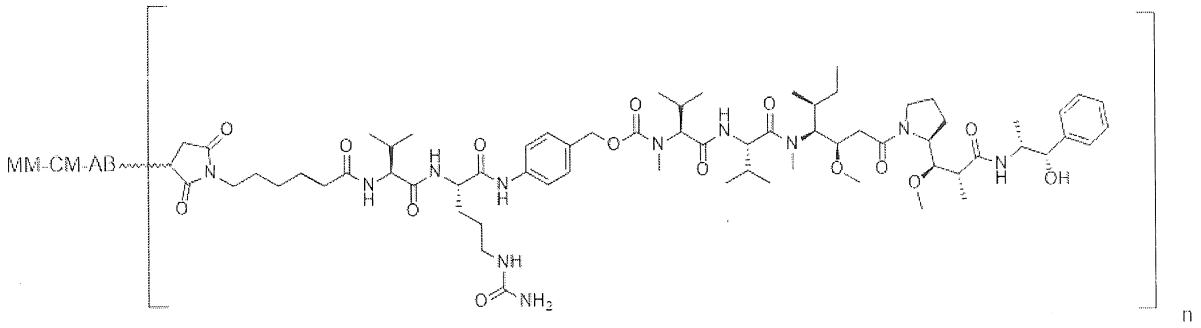
(iii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và

(b) trong đó "n" bằng 2.

II-20. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-19, trong đó AB có chứa isotyp IgG1.

II-21. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-19 hoặc II-20, trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin.

II-22. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng:



Công thức (II)

trong đó MM-CM-AB là kháng thể có thể hoạt hóa, trong đó AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người,

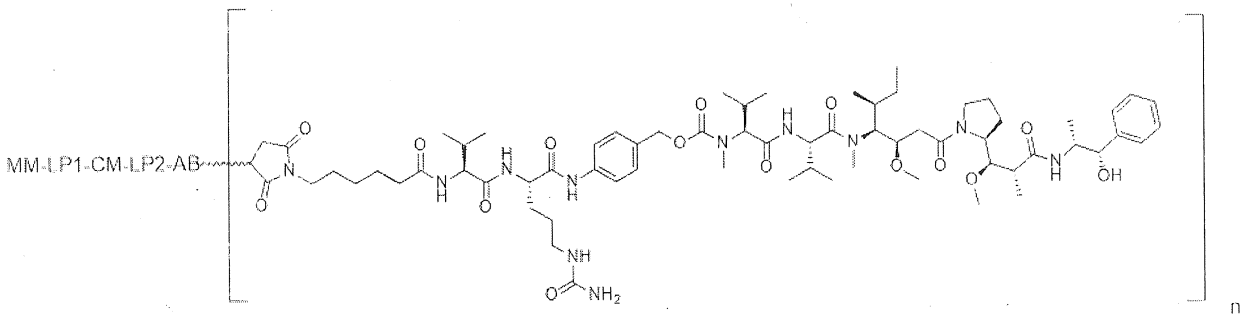
trong đó kháng thể có thể hoạt hóa có chứa chuỗi nặng có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 169, và

trong đó "n" bằng 2.

II-23. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-22, trong đó AB có chứa isotyp IgG1.

II-24. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp của phương án II-22 hoặc II-23, trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu tận cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin.

II-25. Phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của chúng:



Công thức (I)

(a) trong đó

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa

i. vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự CDRH1 có chứa SEQ ID NO: 9, trình tự CDRH2 có chứa SEQ ID NO: 10, và trình tự CDRH3 có chứa SEQ ID NO: 11; và

ii. vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự CDRL1 có chứa SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO:13, trình tự CDRL2 có chứa SEQ ID NO: 14, và trình tự CDRL3 có chứa SEQ ID NO: 15;

(ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt;

(iii) LP1 là gốc liên kết thứ nhất có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 207;

(iv) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và

(v) LP2 là gốc liên kết thứ hai có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38;

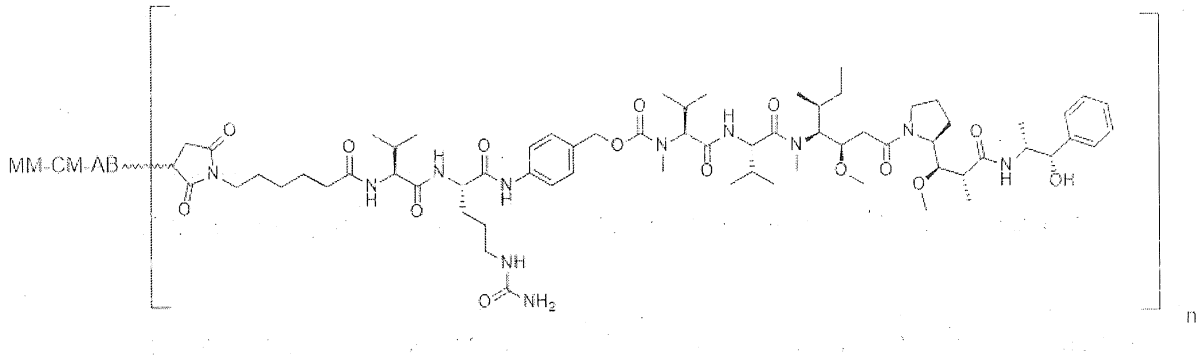
và trong đó "n" bằng 2;

(b) phương pháp này có chứa bước

(i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-LP1-CM-LP2-AB bằng tác nhân khử; và

(ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử.

II-26. Phương pháp sản xuất kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có chứa cấu trúc có Công thức (II) hoặc muối của chúng:



Công thức (II)

(a) trong đó

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và có chứa

i. vùng biến đổi chuỗi nặng có chứa trình tự CDRH1 có chứa SEQ ID NO: 9, trình tự CDRH2 có chứa SEQ ID NO: 10, và trình tự CDRH3 có chứa SEQ ID NO: 11; và

ii. vùng biến đổi chuỗi nhẹ có chứa trình tự CDRL1 có chứa SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO:13, trình tự CDRL2 có chứa SEQ ID NO: 14, và trình tự CDRL3 có chứa SEQ ID NO: 15;

(ii) MM là gốc che giấu có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt;

(ii) CM là gốc có thể phân cắt có chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và

và trong đó "n" bằng 2;

(b) phương pháp này có chứa bước

(i) khử kháng thể có thể hoạt hóa có chứa MM-CM-AB bằng tác nhân khử; và

(ii) liên hợp một hoặc nhiều vcMMAE với kháng thể có thể hoạt hóa đã được khử.

II-27. Dược phẩm có chứa: kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ II-1 đến II-24; và tùy ý chất mang dược dụng.

II-28. Phương pháp điều trị, làm nhẹ bớt triệu chứng của, hoặc làm trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư ở đối tượng, phương pháp này có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ II-1 đến II-24 hoặc dược phẩm theo phương án II-27 cho đối tượng cần chúng đối với bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có: bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư vú ER+, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính, bệnh ung thư kết trực tràng, u melanin, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, đa u tủy, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, ung thư biểu mô tế bào nhỏ đầu và cổ, bệnh ung thư tụy, u trung biểu mô, u lympho không Hodgkin, ung thư biểu mô tế bào gan, và u nguyên bào đệm.

II-29. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ II-1 đến II-24 hoặc dược phẩm theo phương án II-27, để sử dụng làm thuốc.

II-30. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ II-1 đến II-24 hoặc dược phẩm theo phương án II-27, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư, tùy ý trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có: bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, bệnh ung thư vú ER+, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính, bệnh ung thư kết trực tràng, u melanin, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, đa u tủy, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, ung thư biểu mô tế bào nhỏ đầu và cổ, bệnh ung thư tụy, u trung biểu mô, u lympho không Hodgkin, ung thư biểu mô tế bào gan, và u nguyên bào đệm.

VÍ DỤ THỰC HIỆN SÁNG CHẾ

VÍ DỤ 1. Kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 (AADC)

Các nghiên cứu được đề xuất ở đây được thiết kế để tạo ra một số kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 theo sáng chế.

Như được mô tả trong đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 2016/0355599 A1, mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó, kháng thể đơn dòng M21 kháng-CD71 được thu lấy bằng cách sử dụng công nghệ lai tế bào chuột theo các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực. Chuột được gây miễn dịch bằng miền ngoại bào (ECD) CD71 người và các tế bào lai tiếp theo được sàng lọc bằng cách sử dụng thử nghiệm piggyback gây độc tế bào, và các dòng dương tính gây độc tế bào từ thử nghiệm này được xác nhận bằng ELISA để liên kết polypeptit ECD CD71 người và được xác nhận liên kết bề mặt tế bào bằng FACS. Kháng thể đơn dòng M21 kháng-CD71 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự SEQ ID NO: 1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự SEQ ID NO: 2.

Kháng thể kháng-CD71 được làm cho giống người sau đây, mà dựa trên kháng thể đơn dòng M21 chuột kháng-CD71, cũng được thử nghiệm: Ab21.10 LcB:HcA (VH có trình tự SEQ ID NO: 3 và VL có trình tự SEQ ID NO: 7), Ab21.11 LcB:HcB (VH có trình tự SEQ ID NO: 4 và VL có trình tự SEQ ID NO: 7), Ab21.12 LcB:HcC (VH có trình tự SEQ ID NO: 5 và VL có trình tự SEQ ID NO: 7), và M21 (VH có trình tự SEQ ID NO: 1 và VL có trình tự SEQ ID NO: 2). Khả năng của các kháng thể kháng-CD71 khác nhau theo sáng chế để liên kết CD71 bề mặt tế bào được xác nhận bằng FACS.

Tất cả các kháng thể kháng-CD71 được làm cho giống người thể hiện việc liên kết với CD71 người và khỉ cynomolgus mà có thể so sánh được với sự liên kết được chứng minh bởi kháng thể chuột M21 CD71. Sự liên kết của kháng thể kháng-CD71 được làm cho giống người được xác nhận trên dòng tế bào BxPC3 bằng FACS. Một cách vắn tắt, tế bào BxPC3 được gắn nhãn bằng kháng thể Mab21 đơn dòng chuột hoặc huCD71 (Ab21.10, Ab21.11, và Ab21.12) ở nồng độ được chỉ ra và tiếp đó được phát hiện lần lượt bằng IgG kháng-chuột ở dê được gắn nhãn Alexa Fluor 647 IgG kháng-người Alexa Fluor 647.

Trong nghiên cứu ví dụ, sự liên kết hoạt tính của Ab21.12 LcB:HcC kháng-CD71 (VH có trình tự SEQ ID NO: 5 và VL có trình tự SEQ ID NO: 7) với CD71 tái tổ hợp (bằng cách sử dụng ELISA) và tế bào biểu hiện CD71 (bằng cách sử dụng đếm tế bào theo dòng) từ các nguồn người, khỉ cynomolgus, chuột nhắt, và chuột cống được đo. Như được thể hiện trong các kết quả ví dụ của Bảng 1, kháng thể kháng-CD71 được liên kết CD71 tái tổ hợp người và khỉ với ái lực tương đương như được đo bằng ELISA, và tương đương với ái lực của holo-transferrin người với CD71 người.

Kháng thể được liên kết dòng tế bào biểu hiện CD71 người và khỉ (lần lượt tế bào ung thư tụy BxPC3 người và tế bào biểu mô thận sơ cấp khỉ cynomolgus) với ái lực tương đương như được đo bằng cách đếm tế bào theo dòng. Không có sự liên kết đáng kể bởi kháng thể kháng-CD71 được đo với dòng tế bào biểu hiện CD71 chuột nhắt hoặc CD71 chuột cống tái tổ hợp (tế bào ung thư gan loại H-4-11-E).

Bảng 1: Sự liên kết của kháng-CD71 với CD71 người, khỉ, chuột cống, và chuột nhắt bằng ELISA và đếm tế bào theo dòng, và sự liên kết của holo-transferrin với CD71 người bằng ELISA

Vật phẩm thử nghiệm		**ELISA (ECD)**	**Đếm tế bào theo dòng (dòng tế bào)**
	Loài CD71	**Kapp (nM)**	**Kapp (nM)**
Kháng thể Ab21.12 kháng-CD71	Người	0,3	3,0
	Rh.	0,4	3,0
	Chuột cống	Không được thử nghiệm	Không liên kết
	Chuột nhắt	Không liên kết	Không được thử nghiệm
*Holo-transferrin	Người	0,5	Không được thử nghiệm

VÍ DỤ 2. Phát hiện che giấu

Các nghiên cứu được đề xuất ở đây được thiết kế để xác định và xác định đặc điểm gốc che giấu để sử dụng trong kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa theo sáng chế.

Như được mô tả trong đơn đăng ký sáng chế Mỹ số US 2016/0355599 A1, kháng thể 21.12 kháng-CD71, có chứa VH có trình tự SEQ ID NO: 5 và VL có trình tự SEQ ID NO: 7, được sử dụng để sàng lọc thư viện peptit X_{15} ngẫu nhiên với tổng độ đa dạng bằng $6x10^{10}$, trong đó X là axit amin bất kỳ, bằng cách sử dụng phương pháp tương tự với phương pháp được mô tả trong công bố quốc tế PCT số WO 2010/081173, công bố ngày 15 tháng 7 năm 2010. Việc sàng lọc gồm có một chu kỳ của MACS và năm chu kỳ của phân loại FACS. Phân loại MACS ban đầu được thực hiện với protein-A Dynabeads (Invitrogen) và kháng thể 21.12 kháng-CD71 ở nồng độ bằng 200 nM. Đối với MACS, xấp xỉ $1x10^{12}$ tế bào được sàng lọc về sự liên kết và $1x\ 10^7$ tế bào được thu gom. 21.12 kháng-CD71 được liên hợp với DyLight-488 (ThermoFisher), hoạt tính liên kết CD71 được xác nhận và 21.12-488 kháng-CD71 được sử dụng làm đoạn dò huỳnh quang đối với tất cả các chu kỳ FACS. Tế bào vi khuẩn được nhuộm màu và các dòng dương tính được thu gom như sau: 20 nM 21.12-488 kháng-CD71 với $1x10^6$ tế bào được thu gom trong chu kỳ FACS 1, 5nM 21.12-488 kháng-CD71 với $6,2x10^4$ tế bào được thu gom trong chu kỳ FACS 2 và 5 nM 21.12-488 kháng-CD71 với $5x10^3$ tế bào và 1 nM 21.12-488 kháng-CD71 với $5x10^2$ tế bào được thu gom

trong chu kỳ FACS 3, 1 nM 21.12-488 kháng-CD71 với > $2x10^2$ tế bào được thu gom trong các chu kỳ FACS 4 và 5. Quần thể dương tính từ chu kỳ FACS thứ hai được xác nhận là ức chế sự liên kết của kháng thể 21.12-488 kháng-CD71 với protein CD71 tái tổ hợp. Các dòng peptit riêng lẻ được xác định bằng cách phân tích trình tự từ 5 nM chất gắn từ chu kỳ FACS 3 và 1 nM chất gắn từ các chu kỳ FACS 3, 4 và 5.

Các gốc che giấu xác định được bao gồm TF01 (QFCPWSYYLIGDCDI; SEQ ID NO: 16) và TF02 (NLCTEHSFALDCRSY; SEQ ID NO: 17). Các gốc che giấu TF01 và TF02 được cắt cụt và được quét alanin để tạo ra các họ của kháng thể có thể hoạt hóa có hiệu quả che giấu khác nhau, bao gồm gốc che giấu TF02.13 (NLCTEHSAALDCRSY; SEQ ID NO: 18).

Các peptit che giấu này được sử dụng để tạo ra kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 theo sáng chế. Trình tự đối với kháng thể nhất định trong số các kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 được thể hiện dưới đây trong Bảng A. Theo một số phương án, các kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 này bao gồm gốc có thể phân cắt 2001 (ISSGLLSGRSDNH; SEQ ID NO: 91), gốc có thể phân cắt 3001 (AVGLLAPPGGLSGRSDNH; SEQ ID NO: 97), gốc có thể phân cắt 2011 (ISSGLLSGRSDNP; SEQ ID NO: 156) hoặc gốc có thể phân cắt 3011 (AVGLLAPPGGLSGRSDNP; SEQ ID NO: 164) như được chỉ ra.

Mặc dù trình tự nhất định được thể hiện dưới đây bao gồm trình tự đoạn đệm nêu trong SEQ ID NO: 138, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa theo sáng chế có thể bao gồm trình tự đoạn đệm thích hợp bất kỳ, chẳng hạn như, ví dụ như, trình tự đoạn đệm được chọn từ nhóm gồm có QGQSGQG (SEQ ID NO: 138), QGQSGQ (SEQ ID NO: 109), QGQSG (SEQ ID NO: 139), QGQS (SEQ ID NO: 140), QGQ, QG, GQSGQG (SEQ ID NO: 143), QSGQG (SEQ ID NO: 144), SGQG (SEQ ID NO: 145), GQG, G, hoặc Q. Theo một số phương án, kháng thể kháng-CD71 có thể hoạt hóa theo sáng chế có thể không có trình tự đoạn đệm nào kết hợp vào đầu tận cùng N của nó.

Bảng A. Trình tự kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71

Vùng biến đổi chuỗi nặng HuCD71_HcC

Trình tự axit amin

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIY
PGNSETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFA
FWGQGTLITVSS (SEQ ID NO: 5)

Trình tự nucleotit

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCG
TGAAGATGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCAC
TGGGTGCGACAGGCTCCAGGCCAGGGCCTCGAATGGATCGGCGCCATCTACC
CCGGCAACTCCGAGACAGGCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCT
GACCGCCGACACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGTCCAGCCTGCGGA
GCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGAGAGAACTGGGACCCCGGCTT
CGCCTTCTGGGGCCAGGGCACCCTGATCACCGTGTCCTCC (SEQ ID NO: 206)

Chuỗi nặng HuCD71_HcC-des

Trình tự axit amin

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIY
PGNSETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFA
FWGQGTLITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 167)

Trình tự nucleotit

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCG
TGAAGATGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCAC
TGGGTGCGACAGGCTCCAGGCCAGGGCCTCGAATGGATCGGCGCCATCTACC
CCGGCAACTCCGAGACAGGCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCT
GACCGCCGACACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGTCCAGCCTGCGGA
GCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGAGAGAACTGGGACCCCGGCTT
CGCCTTCTGGGGCCAGGGCACCCTGATCACCGTGTCCTCCGCCAGCACCAAGG
GCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACA
GCTGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTC
CTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGC

AGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACAGTGCCCTCCTCCAGC
CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCA
AGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCC
TCCCTGCCCTGCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCC
AAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTG
GTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACA
ACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG
AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCA
TCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTA
CACACTGCCACCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA
ACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCACCTGTGCTGGACTCCGA
CGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGC
AGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA
CACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGC (SEQ ID NO: 168)

Chuỗi nặng HuCD71_HcC

Trình tự axit amin

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIY
PGNSETGYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFA
FWGQGTLITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 20)

Trình tự nucleotit

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCG
TGAAGATGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCAC

TGGGTGCGACAGGCTCCAGGCCAGGGCCTCGAATGGATCGGCGCCATCTACC
CCGGCAACTCCGAGACAGGCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAGAGCCACCCT
GACCGCCGACACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGTCCAGCCTGCGGA
GCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGAGAGAACTGGGACCCCGGCTT
CGCCTTCTGGGGCCAGGGCACCCTGATCACCGTGTCCTCCGCCAGCACCAAGG
GCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACA
GCTGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTC
CTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGC
AGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACAGTGCCCTCCTCCAGC
CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCA
AGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCC
TCCCTGCCCTGCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCC
AAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTG
GTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACA
ACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG
AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCA
TCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTA
CACACTGCCACCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
TGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA
ACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCACCTGTGCTGGACTCCGA
CGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGC
AGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA
CACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAG (SEQ ID NO: 21)

HuCD71_LcB

Trình tự axit amin

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 19)

HuCD71_LcB

Trình tự nucleotit

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCAGCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACAG
AGTGACAATCACCTGTTCCGCCAGCTCCTCCGTGTACTACATGTACTGGTTCC
AGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCT
GGCCTCCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTACA
CCCTGACCATCTCCAGCATGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG
CAGCGGCGGAACTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCA
AGCGGACCGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAG
CTGAAGTCCGGCACCGCCAGCGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCG
CGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCC
CAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCT
CCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTG
CGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGC
GGCGAGTGC (SEQ ID NO: 208)

Chuỗi nhẹ kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF01-2001

[đoạn đệm (SEQ ID NO: 138)] [huCD71Lc_TF01_2001 (SEQ ID NO: 141)]

Trình tự axit amin

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFS
GSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 22)

Chuỗi nhẹ kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF02.13-2001

[đoạn đệm (SEQ ID NO: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_2001 (SEQ ID NO: 142)]

Trình tự axit amin

[QGQSGQG][NLCTEHSAALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQ
SPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFS
GSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP

PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 23)

Chuỗi nhẹ kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF02.13-3011
[đoạn đệm (SEQ ID NO: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_3011 (SEQ ID NO: 146)]
Trình tự axit amin
[QGQSGQG][NLCTEHSAALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO:
147)

Chuỗi nhẹ kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF02.13-2011
[đoạn đệm (SEQ ID NO: 138)] [huCD71Lc_TF02.13_2011 (SEQ ID NO: 169)]
Trình tự axit amin
[QGQSGQG][NLCTEHSAALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGGSDIQMTQ
SPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFS
GSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 170)

Chuỗi nhẹ kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF01-3011
[đoạn đệm (SEQ ID NO: 138)] [huCD71Lc_TF01_3011 (SEQ ID NO: 173)]
Trình tự axit amin
[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO:
174)

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF02.13-2001 [đoạn đệm (SEQ ID NO: 138)] [miền VL huCD71Lc_TF02.13_2001 (SEQ ID NO: 197)]

Trình tự axit amin

[QGQSGQG][NLCTEHSAALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 198)

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF02.13-3011 [đoạn đệm (SEQ ID NO: 138)] [miền VL huCD71Lc_TF02.13_3011 (SEQ ID NO: 199)]

Trình tự axit amin

[QGQSGQG][NLCTEHSAALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 200)

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF02.13-2011 [đoạn đệm (SEQ ID NO: 138)] [miền VL huCD71Lc_TF02.13_2011 (SEQ ID NO: 201)]

Trình tự axit amin

[QGQSGQG][NLCTEHSAALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 202)

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF01-2001 [đoạn đệm (SEQ ID NO: 138)] [miền VL huCD71Lc_TF01_2001 (SEQ ID NO: 195)]

Trình tự axit amin

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFS

GSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 196)

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF01-3011 [đoạn đệm (SEQ ID NO: 138)] [miền VL huCD71Lc_TF01_3011 (SEQ ID NO: 203)]

Trình tự axit amin

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGV PSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 204)

VÍ DỤ 3. Tạo ra và xác định đặc điểm kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 có thể hoạt hóa và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71

Các nghiên cứu được đề xuất ở đây được thiết kế để tạo ra một số kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 theo sáng chế.

Kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 được tạo ra có hiệu quả che giấu khác nhau (tức là, số đo của khả năng của MM của kháng thể có thể hoạt hóa để phong bế sự liên kết của AB của kháng thể có thể hoạt hóa với đích của nó). Các peptit TF01 và TF02 được gây đột biến bằng cách cắt cụt và quét alanin như được mô tả trong Ví dụ 2, và các biến thể peptit che giấu này được sử dụng để tạo ra các họ của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 theo sáng chế với khoảng giá trị của hiệu quả che giấu.

Sự liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 theo sáng chế với dòng tế bào NCI H292 (còn được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng H292) được đánh giá bằng cách sử dụng FACS. Một cách vắn tắt, tế bào được gắn nhãn bằng kháng thể huCD71 hoặc kháng thể có thể hoạt hóa ở khoảng giá trị của nồng độ và tiếp đó được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp IgG kháng-người ở dê được gắn nhãn Alexa Fluor 647 để xác định đường cong liên kết. Như tóm tắt trong dữ liệu liên kết ví dụ dưới đây trong Bảng 2, kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 theo sáng chế thể hiện khoảng giá trị của hiệu quả che giấu so với kháng thể gốc kháng-CD71 (Ab huCD71 21 12).

Bảng 2: Hiệu quả che giấu của gốc che giấu

Gốc che giấu kháng thể có thể hoạt hóa	VL chuỗi nhẹ SEQ ID NO	K_{app} (nM)	Hiệu quả che giấu

Không (Ab 21.12)	7	2,288	1
TF01	809	809,5	352
TF02.13	813	127,4	55

Các dữ liệu ví dụ trong Bảng 2 cho thấy rằng cả hai gốc che giấu (TF01 và TF02.13) ức chế sự liên kết của kháng thể kháng-CD71 với CD71 khi kháng thể có thể hoạt hóa ở trạng thái nguyên vẹn hoặc không được phân cắt. Các dữ liệu ví dụ này cũng chứng tỏ rằng gốc che giấu TF01 chứng tỏ hiệu quả che giấu cao hơn so với gốc che giấu TF02.13.

VÍ DỤ 4: Xác định đặc điểm của hoạt tính liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa CD71 và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp CD71

Ví dụ này cho thấy rằng kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 theo sáng chế chứng tỏ ái lực liên kết thấp hơn với protein CD71 người và khỉ cynomolgus bề mặt tế bào và tái tổ hợp khi ở dạng nguyên vẹn, không được phân cắt của chúng như so với dạng được phân cắt bằng proteaza tương ứng của chúng.

Như được thể hiện trên Fig.3A và Fig.3B, thử nghiệm liên kết pha rắn (ELISA) được sử dụng để chứng minh ái lực liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 theo sáng chế với CD71 tái tổ hợp, đều ở dạng nguyên vẹn, không được phân cắt của chúng và dạng được phân cắt, được hoạt hóa bằng proteaza của chúng. Trong các ví dụ này, protein khỉ cynomolgus tái tổ hợp (Fig.3B) hoặc CD71 người (Fig.3A) (R&D Systems) được phủ lên đĩa ELISA ở nồng độ bằng 1 µg/ml, và sau đó được ủ với nồng độ được chỉ ra của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 không được phân cắt, nguyên vẹn ("kháng-CD71-TF02.13-2011") theo sáng chế hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 E2 (tức là có DAR bằng ~2) không được phân cắt, nguyên vẹn ("kháng-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2") theo sáng chế. Cũng được thử nghiệm là kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 ("kháng-CD71-TF02.13-2011 (Act)") hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 E2 (tức là có DAR bằng ~2) ("kháng-CD71-TF02.13-2011 (Act)") theo sáng chế sau khi xử lý bằng proteaza mà phân cắt gốc có thể phân cắt của thành phần kháng thể có thể hoạt hóa.

Như thảo luận trong bản mô tả này, "E2" dùng để chỉ hợp phần của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 nhất định theo sáng chế mà về cơ bản chỉ bao gồm loại của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp trong đó tải lượng thuốc bằng 2 phân tử thuốc đối với mỗi phân tử kháng thể có thể hoạt hóa, và về cơ bản không bao gồm lượng bất kỳ hoặc tối thiểu của các loại có thể có khác (*tức là* trong đó tải lượng thuốc bằng 0, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, v.v.) như thảo luận trong bản mô tả này, "DAR" dùng để chỉ tỉ lệ trung bình giữa thuốc (trong trường hợp này, MMAE) với kháng thể có thể hoạt hóa (*tức là* CD71-TF02.13-2011) trong quần thể của kháng thể có thể hoạt

hóa được liên hợp này. Do đó, trong ví dụ này, kháng-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2 dùng để chỉ hợp phần mà chỉ bao gồm kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF02.13-2011 trong đó mỗi kháng thể có thể hoạt hóa có tải lượng thuốc bằng 2 đương lượng của vc-MMAE và DAR bằng khoảng 2 như được mô tả trong ví dụ 26.

Lượng của kháng thể được liên kết trong mỗi mẫu được phát hiện bằng cách ủ và phát hiện bằng kháng thể kháng-người ở dê được liên hợp vào peroxiđaza củ cải ngựa và sự phát hiện Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific). Tóm tắt của ái lực liên kết được thể hiện dưới đây:

Bảng 3A: Hoạt tính liên kết CD71 quan sát được ví dụ của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 được phân cắt và không được phân cắt và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71

Vật Phẩm Thử Nghiệm	CD71 người $K_{d(app)}$ nM	CD71 khỉ cynomolgus $K_{d(app)}$ nM
kháng-CD71-TF02.13-2011	0,42	1,24
kháng-CD71-TF02.13-2011 (Được hoạt hóa)	0,04	0,06
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	0,48	1,49
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (Được hoạt hóa)	0,05	0,07

Các Fig.3C và 3D thể hiện trong thử nghiệm FACS các kết quả ví dụ rằng kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 theo sáng chế và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 theo sáng chế liên kết tế bào biểu hiện CD71 người (Fig.3C) và CD71 khỉ cynomolgus (Fig.3D) với hằng số phân ly cao hơn và ái lực thấp hơn so với hằng số phân ly và ái lực của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 được hoạt hóa bằng proteaza hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 được hoạt hóa bằng proteaza tương ứng theo sáng chế. Các kết quả ví dụ này cho thấy rằng ái lực liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 được hoạt hóa bằng proteaza, được phân cắt theo sáng chế và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 được hoạt hóa bằng proteaza, được phân cắt theo sáng chế liên kết với tế bào ở ái lực tương tự với ái lực của kháng thể kháng-CD71 ban đầu, do đó chứng tỏ hiệu quả của gốc che giấu trong việc ức chế sự liên kết của kháng-CD71 với đích của nó trong kháng thể có thể hoạt hóa nguyên vẹn hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp nguyên vẹn.

Trong nghiên cứu ví dụ được thể hiện trên các hình vẽ Fig.3C và Fig.3D, sự liên kết của kháng thể theo sáng chế với dòng tế bào được chỉ ra được thực hiện bằng cách sử dụng phương

pháp gắn nhãn FACS tiêu chuẩn. Một cách vắn tắt, tế bào được gắn nhãn bằng kháng thể hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được chỉ ra theo sáng chế: kháng thể đối chứng (AB095), kháng thể kháng-CD71 người (Ab 21.12, có VH có trình tự SEQ ID NO: 5 và VL có trình tự SEQ ID NO: 7), kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 (kháng-CD71-TF02.13-2011), hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 E2 (tức là có DAR bằng ~2) (kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2). Ngoài ra, ái lực liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 (kháng-CD71-TF02.13-2011 (Act)) và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 E2 (tức là có DAR bằng ~2) (kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (Act)) cũng được thử nghiệm sau khi hoạt hóa bằng proteaza mà phân cắt gốc có thể phân cắt trong bản mô tả này. Mỗi vật phẩm thử nghiệm được áp dụng ở nồng độ được chỉ ra và tiếp đó được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp IgG kháng-người ở dê được gắn nhãn Alexa Fluor 647.

Bảng 3B dưới đây thể hiện giá trị EC50 dựa trên đường cong liên kết được minh họa trên các hình vẽ từ Fig.3C đến Fig.3D. Các kết quả này cho thấy rằng kháng thể có thể hoạt hóa nguyên vẹn và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp nguyên vẹn liên kết với đích của nó với ái lực thấp hơn so với đối ứng được hoạt hóa bằng proteaza của chúng, và kháng thể có thể hoạt hóa được hoạt hóa bằng proteaza được liên kết với ái lực mà tương tự với ái lực của kháng thể kháng-CD71 bố mẹ.

Bảng 3B: Hoạt tính liên kết CD71 quan sát được ví dụ của chất gắn kháng-CD71

Vật Phẩm Thử Nghiệm	**Tế bào H292 người EC50 FACS**	**CHO w/ CD71 khỉ cynomolgus EC50 FACS**
Ab 21.12	1,021	-
Ab 21.12-vc-MMAE	-	0,2912
Kháng-CD71-TF02.13-2011	46,06	27,83
Kháng-CD71-TF02.13-2011 (Được hoạt hóa)	1,429	0,4639
Kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	50,97	35,30
Kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (Được hoạt hóa)	1,854	0,7292

Trong nghiên cứu ví dụ tương tự, các thử nghiệm ELISA và đếm tế bào theo dòng được sử dụng để chứng minh ái lực liên kết của kháng thể kháng-CD71, kháng thể được liên hợp kháng-CD71, kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 (dạng không được phân cắt, nguyên vẹn và dạng được phân cắt, được hoạt hóa bằng proteaza) và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-

CD71 (dạng không được phân cắt, nguyên vẹn và dạng được phân cắt, được hoạt hóa bằng proteaza) theo sáng chế với CD71 tái tổ hợp với CD71 người và khỉ cynomolgus tái tổ hợp và dòng tế bào biểu hiện CD71 người và khỉ cynomolgus. Vật phẩm thử nghiệm là kháng thể Ab21.12 kháng-CD71 (VH có trình tự SEQ ID NO: 5 và VL có trình tự SEQ ID NO: 7), kháng thể được liên hợp kháng-CD71 Ab21.12-vcMMAE E2 (tức là có DAR bằng ~2), kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71-TF02.13-2011, và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp DAR2 kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (tức là có DAR bằng ~2).

Trong các ví dụ ELISA, các protein ECD CD71 khỉ cynomolgus hoặc người tái tổ hợp được phủ lên đĩa ELISA, và sau đó được ủ với một trong số khoảng giá trị của nồng độ của vật phẩm thử nghiệm theo sáng chế, sau đó là đo lượng của vật phẩm thử nghiệm được liên kết với kháng thể thứ cấp. Vật phẩm thử nghiệm mà được hoạt hóa được ủ với enzym matriptaza proteaza. Giá trị Kd biểu kiến ví dụ đối với mỗi vật phẩm thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 3C.

Trong nghiên cứu ví dụ cũng được thể hiện trong Bảng 3C, sự liên kết của kháng thể theo sáng chế với dòng tế bào được chỉ ra được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp gắn nhãn FACS tiêu chuẩn. Kết quả đếm tế bào theo dòng phản ánh Kapp đo được trung bình từ bốn dòng tế bào người (bệnh ung thư vú người HCC1806, bệnh ung thư kết trực tràng người HT-29, bệnh ung thư phổi người NCI-H292, và bệnh ung thư phổi người NCI-H520) và một dòng tế bào CHO-K1 biểu hiện CD71 khỉ cynomolgus. Giá trị Kd biểu kiến ví dụ đối với mỗi vật phẩm thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 3C.

Bảng 3C: Hoạt tính liên kết CD71 quan sát được ví dụ của kháng thể kháng-CD71, kháng thể được liên hợp kháng-CD71, kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 được phân cắt và không được phân cắt và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71

	Vật phẩm thử nghiệm	ELISA rhCD71	ELISA rcCD71	Giá trị trung bình đếm tế bào theo dòng của 4 dòng tế bào người	Đếm tế bào theo dòng CHO-K1 cyno CD71
		Kapp (nM)	Kapp (nM)	Kapp (nM)	Kapp (nM)
1	Ab21.12	0,03	0,03	0,8	0,3
2	Ab21.12-vc-MMAE E2	0,04	0,03	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm
3	kháng-CD71-TF02.13-2011	1,94	1,11	105,5	28
4	kháng-CD71-TF02.13-2011, được hoạt hóa bằng matriptaza	0,06	0,04	2,0	0,5
5	kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	2,58	1,02	98,1	35
6	kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, được hoạt hóa bằng matriptaza	0,05	0,04	2,0	0,7
	Tỉ lệ				
	kháng-CD71-TF02.13-2011 / Ab21.12	65	37	127	93
	kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 / Ab21.12	86	34	117	117
	kháng-CD71-TF02.13-2011 / kháng-CD71-TF02.13-2011, được hoạt hóa bằng matriptaza	32	28	55	56
	kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 / kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, được hoạt hóa bằng matriptaza	52	26	48	50

Các kết quả ví dụ này cho thấy rằng kháng thể có thể hoạt hóa nguyên vẹn và kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp nguyên vẹn thể hiện ái lực biểu kiến thấp hơn với CD71 như so với đối ứng được hoạt hóa của chúng hoặc kháng thể bố mẹ của chúng.

<u>VÍ DỤ 5</u>: Sự biểu hiện CD71 trong nhiều khối u nguyên phát và di căn có nguồn gốc từ bệnh nhân

Ví dụ này cho thấy rằng CD71 được biểu hiện ở lượng lớn của các loại khối u nguyên phát và di căn bằng cách nhuộm màu hóa mô miễn dịch (IHC) bằng cách sử dụng kháng thể kháng-CD71.

Fig.1 và Fig.2 cho thấy rằng CD71 được biểu hiện ở mức độ cao ở số lượng lớn của mẫu khối u nguyên phát và di căn, bằng cách sử dụng nhuộm màu IHC với kháng thể kháng-CD71 mua được trên thị trường trên nhiều khối u nguyên phát có nguồn gốc từ bệnh nhân và vi mảng mô di căn có nguồn gốc từ bệnh nhân (TMA). Fig.1 thể hiện việc nhuộm màu IHC của CD71 ở bệnh ung thư đầu và cổ (1), bệnh ung thư cổ tử cung (2), bệnh ung thư vú (3), u lympho không Hodgkin (NHL) ở hạch bạch huyết (4), bệnh ung thư phổi (5), bệnh ung thư bàng quang (6), bệnh ung thư buồng trứng (7), và bệnh ung thư thực quản (8). Fig.2 thể hiện việc nhuộm màu IHC của CD71 trong vi mảng mô (TMA) gồm có lõi từ khối u di căn chứng tỏ mức độ từ trung bình đến cao của sự biểu hiện của CD71 trong phần lớn lõi. Tóm tắt về sự biểu hiện CD71 ở mẫu khối u người bằng hóa mô miễn dịch (IHC) được thể hiện trong Bảng 4A.

<u>Bảng 4A</u>: Tóm tắt về sự biểu hiện CD71 ở mẫu khối u người bằng IHC

Chỉ định	Vị trí	Tổng số ca	% Mạnh/ trung bình (IHC 2+ hoặc lớn hơn)
Thực quản	nguyên phát	56	82,1
	di căn	69	75,4
Dạ dày	nguyên phát	209	63,6
	di căn	74	83,7
Tụy	nguyên phát	151	57
	di căn	15	80
u lympho không Hodgkin	nguyên phát	132	66,7
	di căn	59	88,1
ung thư biểu mô phổi tế bào không nhỏ	nguyên phát	127	74,8
	di căn	87	70,1
Vú	nguyên phát	45	66,7
	di căn	80	85
Nội mạc tử cung	nguyên phát	147	98
	di căn	9	88,9
Đại trực tràng	nguyên phát	146	77,4
	di căn	98	74,5
ung thư biểu mô tế bào vảy đầu và cổ	nguyên phát	160	53,8
	di căn	25	60

<u>VÍ DỤ 6</u>: Hiệu quả che giấu và hiệu quả *in vivo* AADC kháng-CD71 có thể hoạt hóa trong mô hình mảnh ghép khác loài CRC

Ví dụ này cho thấy rằng hiệu quả che giấu của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 người với độc tố được liên hợp (AADC) theo sáng chế là yếu tố trong hiệu quả của nó trong mô hình ghép khác loài chuột nhắt ung thư kết trực tràng (CRC) HT29.

Trong các nghiên cứu này, khối u ghép khác loài HT29 ở chuột nhắt được cho phát triển đến thể tích trung bình bằng 150 mm^3. Sau đó các con chuột nhắt được phân ngẫu nhiên vào các nhóm và được dùng liều lượng vào ngày 1 với 3 mg/kg (hoặc theo cách khác được chỉ ra) của mỗi vật phẩm thử nghiệm được chỉ ra. Thể tích khối u trung bình ± SEM được dựng đồ thị đối với mỗi thời điểm.

Fig.4A cho thấy rằng AADC kháng-CD71 ví dụ theo sáng chế (TF01-3011-vc-MMAE kháng-CD71) với gốc che giấu ái lực cao hơn thể hiện sự ức chế phát triển khối u ở mức độ nào đó tương quan với đối chứng tá dược lỏng sau liều lượng 3 mg/kg đơn lẻ. Để so sánh, Fig.4B thể hiện AADC kháng-CD71 ví dụ theo sáng chế (TF02.13-3011-vc-MMAE kháng-CD71) với gốc che giấu ái lực thấp hơn nhưng với cùng cơ chất có thể phân cắt thể hiện sự thoái triển về cơ bản hoàn toàn của mảnh ghép khác loài sau liều lượng 3 mg/kg đơn lẻ. Fig.4C thể hiện AADC kháng-CD71 ví dụ theo sáng chế (TF02.13-3011-vc-MMAE kháng-CD71) với gốc che giấu ái lực thấp hơn nhưng với cùng cơ chất có thể phân cắt cũng thể hiện sự thoái triển về cơ bản hoàn toàn của mảnh ghép khác loài HT29 ở cả hai liều lượng đơn lẻ 2 mg/kg hoặc 3 mg/kg. Các kết quả ví dụ này cho thấy rằng AADC với gốc che giấu ái lực thấp hơn chứng tỏ hiệu quả cao hơn so với AADC với gốc che giấu ái lực cao hơn.

<u>VÍ DỤ 7</u>: Cơ chất có thể phân cắt và hiệu quả *in vivo* AADC kháng-CD71 có thể hoạt hóa trong mô hình mảnh ghép khác loài CRC

Ví dụ này thể hiện tác dụng của cơ chất có thể phân cắt lên hiệu quả của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 người (AADC) ví dụ theo sáng chế trong mô hình ghép khác loài chuột nhắt.

Trong các nghiên cứu này, khối u ghép khác loài HT29 (có nguồn gốc từ bệnh ung thư kết trực tràng) ở chuột nhắt được cho phát triển đến thể tích trung bình bằng 150 mm^3. Sau đó các con chuột nhắt được phân ngẫu nhiên vào các nhóm và được dùng liều lượng vào ngày 1 với lượng được chỉ ra của vật phẩm thử nghiệm được chỉ ra. Thể tích khối u trung bình ± SEM được dựng đồ thị đối với mỗi thời điểm.

Fig.5 cho thấy rằng AADC kháng-CD71 ví dụ theo sáng chế (TF02.13-2011-vc-MMAE CD71) thể hiện sự thoái triển hoàn toàn hoặc gần như hoàn toàn trong mô hình ghép khác loài

chuột nhắt ở hai liều lượng khác nhau. Các dữ liệu ví dụ chứng tỏ rằng hiệu quả của AADC được chỉ ra (TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71) với cơ chất có thể phân cắt ít hơn về cơ bản giống như hiệu quả của AADC (TF02.13-3011-vc-MMAE kháng-CD71) với cơ chất có thể phân cắt nhiều hơn được thể hiện trên các hình vẽ Fig.4B và Fig.4C.

<u>VÍ DỤ 8</u>: Hiệu quả *in vivo* AADC kháng-CD71 có thể hoạt hóa trong nhiều mô hình mảnh ghép khác loài

Ví dụ này thể hiện hiệu quả của AADC TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 theo sáng chế ở hai tỉ lệ thuốc với kháng thể (DAR) khác nhau trong các mô hình ghép khác loài chuột nhắt khác nhau.

Trong các nghiên cứu này, khối u ghép khác loài bệnh ung thư buồng trứng (OV-90; Fig.6B), bệnh ung thư dạ dày (NCI-N87; Fig.6A), bệnh ung thư vú ER+ (BT474; Fig.6C), hoặc bệnh ung thư vú bộ ba âm tính (HCC-70; Fig.6D) ở chuột nhắt được cho phát triển đến thể tích trung bình bằng 150 mm^3. Sau đó các con chuột nhắt được phân ngẫu nhiên vào các nhóm và được dùng liều lượng vào ngày 1 với vật phẩm thử nghiệm được chỉ ra. Lượng của mỗi AADC mà được dùng phù hợp liều lượng dựa trên lượng của độc tố MMAE, sao cho TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 (có DAR trung bình bằng ~3) được dùng ở 3 mg/kg và TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 (có DAR trung bình bằng ~2) được dùng ở 4,3 mg/kg. Thể tích khối u trung bình ± SEM được dựng đồ thị đối với mỗi thời điểm.

Các Fig.6A-6B cho thấy rằng AADC kháng-CD71 ví dụ theo sáng chế (TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71) thể hiện sự thoái triển hoàn toàn hoặc gần như hoàn toàn ở mô hình ghép khác loài chuột nhắt ung thư buồng trứng và dạ dày. TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 (tức là có DAR bằng ~2), mà được bao gồm mỗi AADC được tinh chế với hai đương lượng của độc tố MMAE, cũng thể hiện sự thoái triển hoàn toàn trong cùng mô hình. Trong tất cả các trường hợp, chẳng hạn như được thể hiện trên các hình vẽ Fig.6C và Fig.6D, thậm chí khi sự thoái triển hoàn toàn hoặc gần như hoàn toàn không được quan sát thấy, hoạt tính của AADC E2 (tức là có DAR bằng ~2) và DAR cao hơn tương đương hoặc gần như tương đương. Các dữ liệu ví dụ chứng tỏ rằng hiệu quả ngang bằng về liều lượng của AADC E2 (tức là có DAR bằng ~2) (TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2) có thể so sánh được với AADC DAR cao hơn tương ứng.

Như được thể hiện trong Bảng 4B, hiệu quả của TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 AADC có DAR bằng ~2 được thử nghiệm đối với nhiều dòng tế bào có nguồn gốc từ bệnh nhân (PDX) hoặc bệnh ung thư (CDX) trong mô hình ghép khác loài chuột nhắt, và được dùng liều lượng với nhỏ hơn hoặc bằng 6 mg/kg một lần hoặc hai lần. Kết quả, mà được tóm tắt dưới đây, cho thấy

rằng AADC chứng tỏ ít nhất là một số hiệu quả, nằm trong khoảng từ thoái triển đến ngưng trệ đến sự ức chế phát triển khối u ở hầu hết tất cả các mô hình được thử nghiệm.

Bảng 4B: Hiệu quả của TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 ở mảnh ghép khác loài có ngồn gốc từ dòng tế bào

Loại khối u	CDX hoặc PDC	Thoái triển hoặc ngưng trệ	Ức chế phát triển khối u	Không đáp ứng
Dạ dày	CDX	1		
	PDX	4		1
Thực quản	CDX	3	1	
	CDX	4		
Buồng trứng	PDX	2	1	
Bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ	CDX	3	1	
	PDX	2	1	1
Vú	CDX	3	2	
	PDX	5		
Đại trực tràng	CDX	2		1
Đa u tủy xương			1	
Tuyến tiền liệt	CDX	1		
U trung biểu mô			1	
U lympho tế bào B lớn lan tỏa	PDX	4	1	
Ung thư biểu mô tế bào nhỏ đầu và cổ	PDX	5		
Tụy	PDX	6		1

<u>VÍ DỤ 9</u>: Thử nghiệm phân tích sinh học để xác định mức độ của độc tố được liên hợp và tự do, và AADC nguyên vẹn và tổng số trong mẫu từ con vật được điều trị

Ví dụ này thể hiện sơ đồ tiến trình ví dụ đối với thử nghiệm để đo hàm lượng của các chất chuyển hóa trong mẫu thử nghiệm, bao gồm hàm lượng của độc tố được liên hợp và tự do, và hàm lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp nguyên vẹn và tổng số.

Các Fig.7A, 7B, và 7C thể hiện sơ đồ tiến trình đối với thử nghiệm phân tích sinh học ví dụ để xác định lượng của kháng thể có thể hoạt hóa nguyên vẹn và tổng số (*tức là* nguyên vẹn được kết hợp và được phân cắt) ở khỉ được điều trị, cũng như là lượng của AADC nguyên vẹn (với độc tố không được phân cắt) và độc tố được phân cắt ở khỉ được điều trị. Bằng cách sử dụng quy trình

thử nghiệm ví dụ được minh họa trên Fig.7A, tổng lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được phân cắt và nguyên vẹn (*ví dụ như* TF02.13-3001 kháng-CD71) trong mẫu có thể được bắt giữ bằng hạt Protein A từ tính, và tiếp đó được khử bắt giữ (RapiGest™), được khử bằng đithiothreitol, được alkyl hóa, và được phân giải bằng trypsin. Mảnh peptit thu được có thể được phân tích bằng cách sử dụng LC-MS/MS pha đảo để xác định và định lượng mảnh peptit đặc trưng từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể. Trong thử nghiệm cụ thể này, một hoặc nhiều peptit mà đặc trưng cho phần kháng thể của kháng thể có thể hoạt hóa hoặc kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp có thể được xác định và được định lượng bằng cách sử dụng LC-MS/MS pha đảo để xác định tổng lượng của cả kháng thể có thể hoạt hóa được phân cắt và nguyên vẹn, do đó đo lượng của kháng thể có thể hoạt hóa được phân cắt và nguyên vẹn tổng số trong mẫu.

Trong cùng thử nghiệm, một hoặc nhiều peptit mà đặc trưng cho gốc có thể phân cắt (CM) không được phân cắt và phần gốc che giấu (MM) của kháng thể có thể hoạt hóa (*ví dụ như* từ đầu tận cùng N của chuỗi nhẹ của kháng-CD71-TF02.13-2011) có thể được xác định và được định lượng bằng cách sử dụng LC-MS/MS pha đảo để xác định tổng lượng của kháng thể có thể hoạt hóa nguyên vẹn, do đó đo lượng của kháng thể có thể hoạt hóa nguyên vẹn trong mẫu.

Bằng cách sử dụng quy trình thử nghiệm ví dụ được minh họa trên Fig.7B, tổng lượng của AADC (*ví dụ như* TF02.13-3001-vc-MMAE kháng-CD71) mà vẫn được liên hợp vào độc tố của nó (MMAE) trong mẫu có thể được xác định. Trong thử nghiệm này, tổng lượng của kháng thể có thể hoạt hóa, cả hai được liên hợp và không được liên hợp, được bắt giữ bằng Protein A MabSelect®. Phân đoạn này được xử lý xystein proteaza để phân cắt cầu nối-độc tố, do đó giải phóng độc tố bất kỳ mà vẫn được liên hợp vào kháng thể có thể hoạt hóa của nó. Bằng cách sử dụng LC-MS/MS pha đảo để phân tích phân đoạn được phân cắt bằng xystein proteaza, độc tố đặc trưng (*ví dụ như* MMAE) mà vẫn được liên hợp vào kháng thể có thể hoạt hóa được bắt giữ có thể được xác định và được định lượng, do đó đo lượng của độc tố được liên hợp trong mẫu.

Bằng cách sử dụng quy trình thử nghiệm ví dụ được minh họa trên Fig.7C, tổng lượng của độc tố trong mẫu, mà bao gồm độc tố được phân cắt từ AADC ở động vật, có thể được xác định. Trong thử nghiệm ví dụ này được minh họa trên Fig.7C, protein tổng số từ mẫu được kết tủa, để lại độc tố tự do, không được liên hợp (MMAE) trong dịch nổi bề mặt. Dịch nổi bề mặt có thể được phân tích bằng cách sử dụng LC-MS/MS pha đảo để xác định và định lượng độc tố đặc trưng (*ví dụ như* MMAE) mà không kết hợp với protein đã kết tủa, do đó đo lượng của không độc tố được liên hợp trong mẫu. Trong các thử nghiệm này, các nội chuẩn (*ví dụ như* SILu™ Mab, Sigma-Aldrich) được bao gồm để cho phép định lượng.

<u>VÍ DỤ 10</u>: Khả năng dung chịu và độ ổn định của AADC kháng-CD71 và ADC kháng-CD71 ở khỉ cynomolgus

Ví dụ này cho thấy rằng kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 người với độc tố được liên hợp (AADC) theo sáng chế được dung chịu tốt ở khỉ cynomolgus so với thể liên hợp thuốc kháng thể (ADC) kháng-CD71 bố mẹ tương ứng dựa trên một hoặc nhiều kết quả đọc huyết học và triệu chứng lâm sàng. Kết quả được tóm tắt dưới đây trong Bảng 5 và được tóm tắt trên Fig.17.

Trong nghiên cứu này, khỉ cynomolgus được điều trị trong tĩnh mạch bằng AADC hoặc ADC được chỉ ra với liều lượng được chỉ ra vào ngày 1 và 21. Chỉ một liều lượng được dung chịu đối với AADC TF02.13-3011-vc-MMAE kháng-CD71 và chỉ một liều lượng được dùng đối với ADC vc-MMAE kháng-CD71 E2 (tức là có DAR bằng ~2). Độ ổn định của kháng thể có thể hoạt hóa (*tức là* kháng thể có thể hoạt hóa tổng số so với kháng thể có thể hoạt hóa nguyên vẹn) trong các mẫu thu được từ mỗi con vật được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 9 sử dụng LC/MS/MS pha đảo)

Bảng 5: Tóm tắt về khả năng dung chịu và độ ổn định AADC và ADC kháng-CD71 ở khỉ cynomolgous

Vật phẩm thử nghiệm (tỉ lệ thuốc-protein (DAR))	**Liều lượng (mg/kg)**	**Sự giảm khối lượng cơ thể**	**Số đếm bạch cầu trung tính trung bình ± SD (trong mỗi µl)**	**Độ ổn định tương đối của kháng thể có thể hoạt hóa tuần hoàn**	**Dấu hiệu lâm sàng / khả năng dung chịu**
TF02.13-3011-vc-MMAE kháng-CD71 (~3)	6	~10%	98 ± 60	Thấp hơn	Giảm bạch cầu trung tính nghiêm trọng, ngủ lịm, ăn mất ngon. Không dung chịu
TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 (~3)	6	~8%	290 ± 290	Cao hơn	Không có. Được dung chịu
TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 (~2)	12	0%	180 ± 210	Cao hơn	Không có. Được dung chịu

Ab21.12-vc-MMAE E2 (~2)	2	~8%	70	N/A	Chết ở ~ 1 tuần sau liều thứ 1

Sự giảm khối lượng cơ thể được xác định trên số đo thấp nhất được cân sau liều được dùng lần thứ 1. Số đếm bạch cầu trung tính đường cơ sở ít nhất là 1000 trong mỗi µl.

Như tóm tắt trong Bảng 5, ADC E2 (tức là có DAR bằng ~2) không được che giấu (E2 vc-MMAE kháng-CD71) chứng tỏ khả năng gây chết ở trong 8 ngày của liều thứ nhất.

Các kết quả ví dụ được tóm tắt trong Bảng 5 cũng cho thấy rằng AADC với cơ chất có thể phân cắt ít hơn (*tức là* TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 và TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2) được dung chịu tốt hơn và chứng tỏ mức độ cao hơn của độ ổn định tuần hoàn ở động vật linh trưởng không phải là người so với AADC tương ứng với cơ chất có thể phân cắt tốt hơn (*tức là* TF02.13-3011-vc-MMAE kháng-CD71). Cuối cùng, các kết quả ví dụ cho thấy rằng AADC (TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 (tức là có DAR bằng ~2)) chứng tỏ khả năng dung chịu được cải thiện đo được ở động vật linh trưởng không phải là người so với AADC DAR cao hơn tương ứng (TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71).

VÍ DỤ 11: Độ ổn định và dược động học của AADC kháng-CD71 ở khỉ cynomolgus

Ví dụ này thể hiện độ ổn định và dược động học của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 người với độc tố được liên hợp (AADC) theo sáng chế ở khỉ cynomolgus. Trong nghiên cứu này,

Trong nghiên cứu này, kết quả của chúng được mô tả chi tiết hơn trong các Ví dụ từ 12 đến 14, bốn nhóm khỉ cynomolgus được điều trị trong tĩnh mạch bằng TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 (tức là có DAR bằng ~2) được chỉ ra hoặc đối chứng tá dược lỏng với liều lượng được chỉ ra và phác đồ được thể hiện trong Bảng 6. Các mẫu từ mỗi động vật được thu lấy vào ngày được chỉ ra trong Bảng 6, mà được thử nghiệm đối với kháng thể có thể hoạt hóa tổng số và nguyên vẹn và độc tố MMAE được liên hợp và không được liên hợp theo phương thức được mô tả trong Ví dụ 9.

Bảng 6: Thiết kế nghiên cứu gây độc AADC kháng-CD71

Nhóm	Vật phẩm thử nghiệm	Liều lượng (mg/kg)	# Liều lượng	# Con vật	Thời điểm lấy mẫu tương quan với liều lượng (ngày)
1	Tá dược lỏng	N/A	2 (Q3W)	3 (2 đực; 1 cái)	Ngày 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 Ngày 22: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7
2	TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2	6	2 (Q3W)	3 (2 đực; 1 cái)	Ngày 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 Ngày 22: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7
3	TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2	12	2 (Q3W)	3 (2 đực; 1 cái)	Ngày 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21 Ngày 22: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7
4	TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2	18	1	3 (2 đực; 1 cái)	Ngày 1: + 0,003, 0,17, 1, 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21

Như tóm tắt trong Bảng 6, khỉ cynomolgus được dùng liều lượng với tá dược lỏng hoặc AADC TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 bằng liều bolus IV chậm ở các mức liều lượng và phác đồ được thể hiện. Các mẫu máu để phân tích động học độc tố được xử lý thành huyết tương và được lưu trữ ở nhiệt độ -80°C trước khi phân tích. Các mẫu huyết thanh được thu lấy để phân tích kháng-thuốc trước khi dùng liều lượng và 7 ngày sau liều thứ hai đối với các Nhóm 1-3 và 22 ngày sau liều thứ nhất đối với Nhóm 4. Tất cả các nhóm chứa ba con vật (2 đực và 1 cái).

<u>VÍ DỤ 12</u>: Độ ổn định của AADC kháng-CD71 ở khỉ cynomolgus

Ví dụ này thể hiện độ ổn định của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 người với độc tố được liên hợp (AADC) theo sáng chế ở khỉ cynomolgus.

Như được thể hiện trong các kết quả ví dụ của Fig.8A và Fig.8B, nồng độ trong huyết tương của kháng thể có thể hoạt hóa tổng số và nguyên vẹn (TF02.13-2011 kháng-CD71) của AADC được dùng được xác định theo phương thức được mô tả trong Ví dụ 9 và Ví dụ 11. Các giới hạn dưới của sự định lượng (LLOQ) đối với cả kháng thể có thể hoạt hóa nguyên vẹn và tổng số là 0,633 nM như được chỉ ra. Các kết quả ví dụ này chứng tỏ rằng nồng độ trong huyết tương của kháng thể có thể hoạt hóa nguyên vẹn thường được duy trì trong khoảng thời gian dùng liều lượng 21 ngày, và ở hàm lượng mà tỉ lệ với liều lượng được dùng ban đầu. Thậm chí 7 ngày sau khi dùng liều lượng, xấp xỉ 80% của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp (kháng-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2) trong huyết tương ở dạng tiền dược chất, nguyên vẹn.

Như được thể hiện trong các kết quả ví dụ của Fig.9A và Fig.9B, nồng độ trong huyết tương của độc tố MMAE được liên hợp và không được liên hợp được xác định theo phương thức được mô tả trong Ví dụ 9 và Ví dụ 11. Giới hạn dưới của sự định lượng (LLOQ) là 1,77 nM đối với MMAE được liên hợp và 0,31 nM đối với MMAE không được liên hợp như được chỉ ra. Các kết quả ví dụ này chứng tỏ rằng ít hơn 1% của tổng MMAE được đo trong nồng độ trong huyết tương của ở dạng không được liên hợp.

<u>VÍ DỤ 13</u>: Sự thay đổi của tỉ lệ thuốc với kháng thể có thể hoạt hóa sau khi dùng liều lượng AADC kháng-CD71 ở khỉ cynomolgus

Ví dụ này thể hiện tỉ lệ quan sát được của thuốc (MMAE) với kháng thể có thể hoạt hóa (TF02.13-2011 kháng-CD71) trong huyết tương sau khi dùng liều lượng của khỉ cynomolgus với kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 người với độc tố được liên hợp (AADC) theo sáng chế.

Nồng độ trong huyết tương của kháng thể có thể hoạt hóa tổng số và nguyên vẹn (TF02.13-2011 kháng-CD71) được xác định theo phương thức được mô tả trong Ví dụ 9 và Ví dụ 11. Như được thể hiện trong Fig.10, tỉ lệ thuốc với kháng thể có thể hoạt hóa được tính bằng cách chia nồng độ của MMAE được liên hợp (xem Ví dụ 12 và Fig.9A) cho nồng độ của kháng thể có thể hoạt hóa tổng số (xem ví dụ 11 và Fig.8A) ở mỗi thời điểm được chỉ ra. Tỉ lệ trung bình và độ lệch chuẩn đối với thời điểm cụ thể được thể hiện trong Bảng 7. Các kết quả ví dụ này chứng tỏ rằng tỉ lệ quan sát được của thuốc MMAE với kháng thể có thể hoạt hóa thay đổi theo thời gian theo phương thức mà nhất quán giữa mỗi trong số ba (3) liều lượng. Trong mỗi liều lượng, DAR tính được của AADC nguyên vẹn bắt đầu ở ~2 ngay sau khi và trong vòng 4 giờ của việc dùng, và tỉ lệ này hạ xuống khoảng 1 xấp xỉ 96 giờ (*tức là* khoảng 4 ngày) sau khi dùng liều lượng.

Bảng 7: Tỉ lệ thuốc với kháng thể có thể hoạt hóa

Vật phẩm thử nghiệm	Liều lượng (mg/kg)	Tỉ lệ (5 phút)	Tỉ lệ (4 giờ)	Tỉ lệ (24 giờ)	Tỉ lệ (4 ngày)	Tỉ lệ (7 ngày)
TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2	6	1,98 ± 0,081	1,95 ± 0,008	1,65 ± 0,075	1,08 ± 0,029	0,874 ± 0,077
TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2	12	2,05 ± 0,080	2,00 ± 0,283	1,69 ± 0,030	1,06 ± 0,023	0,835 ± 0,100
TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2	18	2,34 ± 0,295	2,01 ± 0,072	1,63 ± 0,164	1,03 ± 0,030	0,835 ± 0,119

<u>VÍ DỤ 14</u>: Thông số dược động học của AADC kháng-CD71 ở khỉ cynomolgus

Ví dụ này thể hiện thông số dược động học của kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71 người với độc tố được liên hợp (AADC) theo sáng chế ở khỉ cynomolgus.

Nồng độ trong huyết tương của kháng thể có thể hoạt hóa tổng số và nguyên vẹn (TF02.13-2011 kháng-CD71) được xác định theo phương thức được mô tả trong Ví dụ 9 và Ví dụ 11. Như được thể hiện trong Bảng 8, $C_{lớn\ nhất}$ trung bình đối với chất phân tích nhất định được dựa trên nồng độ trong huyết tương quan sát được lớn nhất. AUC_{0-7} trung bình được dựa trên diện tích dưới đường cong nồng độ trong huyết tương-thời gian từ ngày 0 đến 7. Số ước lượng thời gian bán thải đối với kháng thể có thể hoạt hóa tổng số được liên hợp, kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp nguyên vẹn, và thể liên hợp MMAE nằm trong khoảng từ 2,5 đến 6,3 ngày. Số ước lượng thời gian bán thải không được tạo ra đối với MMAE không được liên hợp.

Bảng 8: Tỉ lệ thuốc với kháng thể có thể hoạt hóa

Chất phân tích	$C_{lớn\ nhất}$ trung bình (nM)			AUC_{0-7} trung bình (ngày·nM)		
	18 mg/kg	12 mg/kg	6 mg/kg	18 mg/kg	12 mg/kg	6 mg/kg
Kháng thể có thể hoạt hóa tổng số	2610	1810	1060	5560	5490	2850
Kháng thể có thể hoạt hóa nguyên vẹn	2530	1190	1080	4804	4970	2520

MMAE được liên hợp	6090	3820	2090	12500	7850	4000
MMAE không được liên hợp	0,696	0,487	0,195	1680	1170	531

VÍ DỤ 15: Thử nghiệm của kháng thể kháng-thuốc

Ví dụ này mô tả việc sử dụng thử nghiệm bắc cầu để theo dõi sự tạo thành của kháng thể kháng-thuốc (ADA) trong động vật được thử nghiệm.

Các mẫu huyết tương để phân tích ADA được thu gom trước khi nghiên cứu và 7 ngày sau liều thứ hai. Kháng thể kháng-thuốc được phát hiện ở 3 trong số 9 con vật được dùng liều lượng trong nghiên cứu.

VÍ DỤ 16: Sự gây độc tế bào *in vitro* của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71

Ví dụ này mô tả thử nghiệm gây độc tế bào *in vitro* trên dòng tế bào có nguồn gốc từ khối u người của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 được hoạt hóa và nguyên vẹn theo sáng chế so với ADC đối chứng isotyp.

Hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* ví dụ của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp theo sáng chế kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (HC có trình tự SEQ ID NO: 167 và LC có trình tự SEQ ID NO: 169), có hoặc không có xử lý sơ bộ bằng matriptaza, được đánh giá và so với đối chứng kháng thể được liên hợp không liên kết CD71 isotyp (AB095-vcMMAE với DAR bằng 2, trong đó AB095 đặc hiệu đối với độc tố uốn ván). Sự gây độc tế bào của vật phẩm thử nghiệm được thử nghiệm trên HT29 (dòng tế bào ung thư kết trực tràng người), H292 (dòng tế bào ung thư phổi người), H520 (dòng tế bào ung thư phổi người), và HCC1806 (dòng tế bào ung thư vú người) bằng cách ủ mỗi vật phẩm thử nghiệm với mỗi dòng tế bào trong thời gian 5 ngày, và sau đó đo khả năng sống tế bào trong khoảng giá trị của nồng độ của mỗi vật phẩm thử nghiệm để xác định EC50 đối với mỗi vật phẩm thử nghiệm. Kết quả được tóm tắt dưới đây trong Bảng 9.

Bảng 9: Giá trị EC50 đối với thử nghiệm gây độc tế bào *in vitro* ở tế bào khối u người

Vật phẩm thử nghiệm	HT29 EC_{50} (nM)	HCC1806 EC_{50} (nM)	H520 EC_{50} (nM)	H292 EC_{50} (nM)
TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2	≥50	≥50	≥50	≥50
TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2, được hoạt hóa bằng matriptaza	1,3	3,2	1,2	3,3
ADC isotyp	Không đáp ứng	>50	>50	>50

Các kết quả ví dụ này cho thấy rằng sự gây độc tế bào *in vitro* của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 nguyên vẹn là tương tự với sự gây độc tế bào của đối chứng isotyp, nhưng về cơ bản tăng lên khi hoạt hóa bằng matriptaza.

VÍ DỤ 17: Sự liên kết Fc và sự hoạt hóa bổ thể bằng kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71

Ví dụ này chứng tỏ khả năng của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 theo sáng chế để điều biến cơ chế dựa trên chức năng tác động chẳng hạn như sự gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và sự gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

Phần có thể kết tinh hóa mảnh (Fc) của kháng thể IgG có thể điều hòa nhiều chức năng, một số trong số chúng xảy ra thông qua việc liên kết với thụ thể Fc và C1q. Các chức năng này bao gồm sự cảm ứng xytokin, sự gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), sự gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) thông qua sự hoạt hóa của con đường cổ điển của hệ thống bổ thể, sự thực bào, và nội cân bằng kháng thể thông qua sự tái tuần hoàn IgG. (Ravetch *et al.*, *Annu Rev Immunol.*, 2001;19:275-290; Roopenian *et al.*, *Nat Rev Immunol.* 2007;7:715-725).

Nội cân bằng kháng thể được điều hòa một phần bằng thụ thể sơ sinh liên quan đến Fc, FcRn, mà có mặt trên tế bào biểu mô ruột, tế bào nội mô mạch, và tế bào trình diện kháng nguyên chuyên nghiệp. Trong nội bào, FcRn có mặt trong các túi; trong endosom có tính axit ở độ pH thấp nó có thể liên kết phần Fc của IgG mà đã được hấp thụ bằng sự ẩm bào. Sau đó IgG được giải phóng khi endosom tái tuần hoàn đến bề mặt tế bào là kết quả của sự tiếp xúc với độ pH trung tính ngoại bào. Quy trình này cho phép kiểm soát IgG lưu thông qua hàng rào biểu mô đơn lớp, và bảo vệ phân tử IgG khỏi sự dị hóa, kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh của IgG. (Roopenian). Thực vậy, các đột biến mà tăng cường liên kết FcRn ở độ pH thấp nhưng duy trì liên kết thấp ở độ pH sinh lý đã được thể hiện là có thời gian bán thải trong huyết thanh lâu hơn. (Hinton *et al.*, *J Biol Chem.* 2004;279:6213-6216; Hinton *et al.*, *J Immunol.* 2006;176:346-356).

Hệ thống FcγR người gồm có cả thụ thể hoạt hóa (FcγRI, FcγRIIa, và FcγRIIIa) và thụ thể ức chế (FcγRIIb). FcγRI, thụ thể IgG1 ái lực cao, được biểu hiện bởi tế bào của dòng bạch cầu đơn

nhân. (Li *et al., J Immunol.* 2008;181:1012-1018) FcγRIIa là thụ thể IgG ái lực thấp được biểu hiện rộng hơn mà liên kết ưu tiên các phức hợp miễn dịch. (Littaua *et al., J Immunol.*, 1990;144:3183-3186) FcγRIIb được biểu hiện nhiều nhất trên dòng bạch cầu đơn nhân và tế bào B và là thụ thể IgG ức chế ái lực thấp. Khi liên kết FcγRIIb với phức hợp IgG, các quy trình phụ thuộc canxi chẳng hạn như sự mất hạt, sự thực bào, ADCC, sự giải phóng xytokin, và sự hoạt hóa tiền viêm đều được phong bế. (Clynes *et al., Nat. Med.*, 6:446-446 (2000); Minard-Colin *et al., Blood*, 112:1205-1213 (2008); và Hamaguchi *et al., J. Exp. Med.*, 203:743-753 (2006)). FcγRIIIa là thụ thể ái lực thấp chịu trách nhiệm đối với hoạt tính ADCC của tế bào NK. (Ravetch) Để bổ sung vào tính đa dạng của thụ thể Fcγ, có các biến thể đa hình của FcγRIIa (H131 so với R131) và FcγRIIIa (V158 so với F158) mà có sự khác biệt ở ái lực đối với phân tử IgG. (Bruhns *et al., Blood*, 2008;113:3716-3725).

Khả năng của kháng thể để điều biến nhiều chức năng thông qua FcγR hoặc hệ thống tác động bổ thể cho phép khả năng xảy ra của dược tính được phóng đại ngoài dự tính trong sinh học được thiết kế dựa trên IgG. Khả năng phản ứng chéo chưa biết trên tế bào lympho máu ngoại vi có khả năng kích hoạt sự liên kết chéo của thụ thể Fcγ. Bởi vì tương tác thụ thể Fcγ liên kết chéo có thể điều biến nhiều chức năng bao gồm sự cảm ứng xytokin, ADCC, và sự thực bào (Ravetch), điều quan trọng là xác định khả năng của kháng thể trị liệu để liên kết đích ngoài dự tính trong máu hoặc mô.

Phương pháp - Thử nghiệm liên kết FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, và FcRn cộng hưởng plasmon bề mặt.

FcγRII & FcγRIII người tái tổ hợp được bắt giữ thông qua đuôi 6xHis để đánh giá việc liên kết của chúng với TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71, Ab21.12 kháng-CD71 (IgG1/κ), AB095-MMAE-E2, và AB095 (IgG1/κ) bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (Biacore). Kháng thể kháng-6xHis chuột nhắt được cố định trực tiếp trên chip CM5 bằng cách ghép nối amin theo quy trình của nhà sản xuất đến tỉ trọng bằng 10000 RU. Sau đó FcγR người được bắt giữ Tế Bào Dòng 2, 3 và 4 để đạt được mức độ bắt giữ của FcγR bằng 250-500 RU. Tế Bào Dòng 1 được sử dụng làm bề mặt tham chiếu. Chất đệm HBS-EP+ (GE, Healthcare) được sử dụng làm chất đệm chạy. TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2, Ab21.12 kháng-CD71 (IgG1/κ), AB095-MMAE-E2, AB095 (IgG1/κ), và trastuzumab (IgG1/κ) được phun lên tất cả các tế bào dòng ở tốc độ dòng chảy bằng 50 µl/phút trong từ một đến hai phút (một phút đối với FcγRIIb và FcγRIIa H131, và hai phút đối với FcγRIIa F158 và FcγRIIIa V158) ở nồng độ nằm trong khoảng từ 46,9 đến 12000 nM đối với FcγRII và từ 7,8 đến 4000 nM đối với FcγRIII (pha loãng theo dãy 2 lần đối với cả hai), sau đó là thời gian phân ly từ một đến năm phút (một phút đối với FcγRIIb, FcγRIIa H131, và năm phút đối với FcγRIIa F158 và FcγRIIIa V158). Bề mặt chip được tái tạo bằng cách phun 100 mM HCl ở tốc độ dòng chảy bằng 100 µl/phút trong hai giây trên cả bốn tế bào dòng. Ba thí nghiệm với việc

sử dụng ba chip CM5 khác nhau được chạy đối với mỗi mẫu (mỗi mẫu trong hai bản sao) để hóa giải tất cả các loại sai số thí nghiệm (thiết bị, bề mặt và người điều khiển). Kết quả của ba thí nghiệm này được tính trung bình.

Đối với phân tích liên kết FcRn, TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2, kháng-CD71-TF02.13-2011 (IgG1/κ mà không có vc-MMAE), AB095-vcMMAE-E2 (kháng thể IgG1/κ biến độc tố kháng-uốn ván người đơn dòng, không đặc hiệu chứa MMAE với DAR được làm giàu=2), AB095 (kháng thể IgG1/κ biến độc tố kháng-uốn ván người đơn dòng, không đặc hiệu) và trastuzumab (IgG1/κ) được cố định trực tiếp trên chip CM5 bằng cách ghép nối amin theo quy trình của nhà sản xuất đến tỉ trọng bằng 500 RU. Hu FcRn được phun lên tất cả các tế bào dòng ở tốc độ dòng chảy bằng 50 µl/phút trong một phút ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5,5 đến 12000 nM (pha loãng theo dãy 3 lần), sau đó là thời gian phân ly hai phút. Các bề mặt được tái tạo bằng cách phun 100 mM HCl trong hai giây sau đó là HBS-EP+, độ pH 7,4. Các mẫu được điều chế và được chạy trong hai hệ thống chất đệm chạy, MES-EP+ độ pH 6,0 và HBS-EP độ pH 7,4. Ba thí nghiệm với việc sử dụng ba chip CM5 khác nhau được chạy đối với mỗi mẫu (mỗi mẫu trong hai bản sao) để tính đến sai số do thiết bị, bề mặt và người điều khiển. Kết quả của ba thí nghiệm này được tính trung bình.

Tất cả dữ liệu FcγRIIIa V158 người tái tổ hợp và dữ liệu FcγRIIIa F158 được làm khớp đến mô hình khớp liên kết 1:1 với R lớn nhất được cố định cục bộ để tính đến tính biến động của mức độ bắt giữ. Dữ liệu liên kết FcγRIIb, FcγRIIa H131, và FcRn người tái tổ hợp được làm khớp đến mô hình ái lực trạng thái ổn định. Phần mềm đánh giá Biacore T200 phiên bản 2.0 được sử dụng để làm khớp tất cả dữ liệu.

Kết quả

TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 chứa Fc isotyp IgG1/κ người. Nó được mong đợi để liên kết với FcγRI, FcγIIa, FcγIIb, FcγIII, thống nhất với kháng thể IgG1/κ kiểu dại khác. Sự liên kết của TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 với FcγR được phân tích bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ELISA liên kết cạnh tranh FcγRI (kết quả không được thể hiện), và ELISA liên kết cạnh tranh FcγRIII (kết quả không được thể hiện), và sự liên kết của TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 với bổ thể được phân tích bằng thử nghiệm hoạt hóa bổ thể người và khỉ cynomolgus chức năng (kết quả không được thể hiện). Các thử nghiệm này được định chuẩn bằng kháng thể người thương mại và được tạo nội bộ. Nguyên liệu trastuzumab kháng-HER2 người loại lâm sàng, IgG1/κ, được sử dụng làm đối chứng dương cho thử nghiệm liên kết FcγR. Thụ thể Fc và bổ thể đã được biết đến là liên kết kháng thể IgG1 kiểu dại. (Ravetch; Roopenian; Burton *et al., Nature.* 1980;288:338-344; Hughes-Jones *et al., Mol Immunol.*, 1979;16:697-701; và Hezareh *et al., J Virol.* 2001;75:12161-12168). Kiểm tra TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 phát hiện ra

rằng nó liên kết FcγRI, FcγIIa H131, FcγRIII, và FcRn. mặc dù việc liên kết với FcγRIII (bằng SPR) được giảm nhẹ được quan sát thấy khi so với đối chứng dương, trastuzumab. TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 liên kết với FcγRIIb quá yếu để xác định bởi vì nó nằm dưới giới hạn phát hiện của thiết bị Biacore ở 1,0 e-05 KD. (xem Bảng 10A và Bảng 10B).

Bảng 10A: Sự liên kết của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 vào FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa bằng cộng hưởng plasmon bề mặt

	Kd(M)				
FcγR được bắt giữ	**Kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2**	**Kháng-CD71-TF02.13-2011 (IgG1/κ)**	**AB095-vcMMAE-E2**	**AB095 (IgG1/κ)**	**Trastuzumab**
huFcγRIIb	Liên kết quá yếu để xác định	Liên kết quá yếu để xác định	Liên kết quá yếu để xác định	7,2 ± 1,2 E-06	8,6 ± 1,4 E-06
huFcγRIIa H131	6,2 ± 2,3 E-06	4,7 ± 0,5 E-06	2,9 ± 0,3 E-06	2,1 ± 0,1 E-06	3,8 ± 0,2 E-06
huFcγRIIIa F158	2,1 ± 0,3 E-06	1,8 ± 0,1 E-06	8,9 ± 0,6 E-07	1,5 ± 0,1 E-06	7,5 ± 0,9 E-07
huFcγRIIIa V158	2,0 ± 0,4 E-07	1,8 ± 0,2 E-07	1,2 ± 0,2 E-07	1,6 ± 0,8 E-07	8,5 ± 1,3 E-08

Bảng 10B: Cộng hưởng plasmon bề mặt FcRn người

Vật phẩm thử nghiệm	KD (M)	
	FcRn ở độ pH 6,0	FcRn ở độ pH 7,4
Kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	5,3 ± 0,3 E-06	Không liên kết đáng kể
Kháng-CD71-TF02.13-2011 (IgG1/κ)	4,7 ± 0,3 E-06	Không liên kết đáng kể
AB095-vcMMAE-E2	5,7 ± 1,3 E-06	Không liên kết đáng kể
AB095 (IgG1/κ)	5,5 ± 1,2 E-06	Không liên kết đáng kể
Trastuzumab	4,5 ± 1,0 E-06	Không liên kết đáng kể

Sự gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) được đánh giá bằng cách đánh giá khả năng để kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 hoạt hóa bổ thể huyết thanh người và khỉ cynomolgus bằng cách bắt giữ iC3b (người) hoặc C3 (cyno) bằng ELISA, đối với CDC.

Như được thể hiện trong các kết quả ví dụ trên Fig.12, sự liên kết của vật phẩm thử nghiệm được chỉ ra ở nồng độ được chỉ ra với iC3b được thể hiện dưới dạng thử nghiệm đối với sự hoạt

hóa bổ thể người. Kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 liên kết iC3b trong thử nghiệm hoạt hóa bổ thể ở cả huyết thanh người và khỉ cynomolgus, nhưng đến mức độ nhỏ hơn so với mức độ liên kết của đối chứng dương, kháng thể 7C6, mà được sử dụng trong thử nghiệm CDC. Kháng thể 7C6.7 với các đột biến được chỉ ra được sử dụng làm đối chứng âm. Sự liên kết iC3b của kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 cũng nhỏ hơn so với đối ứng kháng thể có thể hoạt hóa không được liên hợp của nó (kháng-CD71-TF02.13-2011).

VÍ DỤ 18: Sự giải phóng xytokin ở PBMC người

Ví dụ này cho thấy rằng mặc dù kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 không liên kết tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) người hoặc khỉ cynomolgus, kháng thể IgG1 có khả năng liên kết chéo thụ thể Fcγ trên tế bào lympho máu ngoại vi, bằng cách đó điều biến nhiều chức năng bao gồm sự cảm ứng xytokin.

Khả năng của kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 hoặc kháng-CD71-TF02.13-2011 để gây ra sự giải phóng xytokin *in vitro* ở PBMC người được đánh giá trong định dạnh pha hòa tan hoặc pha rắn (liên kết đĩa) đối với các xytokin sau đây: interleukin (IL)-1β, IL 6, IL 2, interferon (IFN)γ, và yếu tố hoại tử khối u alpha (TNFα). Đối với thí nghiệm pha rắn, PBMC từ 8 người cho khỏe mạnh được bổ sung vào đĩa polypropylen được phủ trước với 0,96 μg vật phẩm thử nghiệm và được rửa trôi sau 1,5 giờ. Dịch nổi bề mặt được thu gom sau 48 giờ để phân tích. Trastuzumab và ADC đối chứng isotyp không liên kết, AB095-vcMMAE E2, được sử dụng làm đối chứng âm. Ba đối chứng dương được sử dụng: Kháng thể kích thích tế bào T, TGN1412 hoặc visilizumab và tế bào B, và lipopolysacarit (LPS) kích thích tế bào tủy. Ở 1 trong số 8 thể cho được thử nghiệm, sự giải phóng đáng kể của 3 trong số 5 xytokin được đo, IL-1β, IL-6, và TNFα, được quan sát thấy đáp ứng với cả kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 và AB095-vcMMAE-E2. Sự giải phóng IL-6 và TNFα được quan sát thấy ở 2 thể cho nữa trong số 8 thể cho đáp ứng với cả kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 và AB095-vcMMAE E2. Ba thể cho được thử nghiệm trong thử nghiệm trình diện hòa tan, mà là thử nghiệm trình diện mật độ tế bào cao, 24 giờ.

Trong nghiên cứu này, sự giải phóng xytokin từ PBMC người cho được đo sau khi kích thích bằng lớp phủ 0,96 μg/giếng với kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 và kháng-CD71-TF02.13-2011 (IgG1κ). Trastuzumab được sử dụng làm kháng thể IgG1κ đối chứng âm. AB095-vcMMAE-E2 và AB095 (IgG1κ) được sử dụng làm kháng thể đối chứng isotyp. TGN1412, visilizumab, và lipopolysacarit (LPS) được bổ sung làm đối chứng dương đối với sự giải phóng xytokin. Các giá trị trong vật phẩm thử nghiệm được làm nổi bật bằng in đậm và đóng khung mà gây ra sự giải phóng xytokin > 2 lần sự giải phóng bởi trastuzumab.

Như được thể hiện trong các kết quả ví dụ trong Bảng 11, kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 không gây ra sự giải phóng xytokin trên mức gây ra bởi đối chứng âm trastuzumab. Sự giải phóng xytokin cũng được đánh giá ở 3 con khỉ cynomolgus thể cho trong định dạng pha rắn đối với các xytokin sau đây: IL-1β, IL-6, IL-2, IFNγ, IL-8, và IL 10. Kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 gây ra sự sản xuất IL-8 cao hơn một chút trên mức nền, như được xác định bằng trastuzumab, ở 1 trong 3 thể cho được thử nghiệm. Trong các nghiên cứu gây độc không-GLP và GLP ở khỉ cynomolgus đối với kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, triệu chứng lâm sàng cấp tính đại diện cho sự giải phóng xytokin không được quan sát thấy ở mức độ liều lượng bất kỳ.

Bảng 11: Sự giải phóng xytokin của PBMC người đáp ứng với kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 pha rắn và vật phẩm thử nghiệm khác

pg/ml xytokin được liệt kê bởi thể cho số								
Thể cho số:	**32150**	**32151**	**32289**	**32165**	**32314**	**32147**	**32156**	**32169**
IL-1β								
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	735	89	39	77	4	96	**5594**	493
kháng-CD71-TF02.13-2011 (IgG1κ)	294	90	40	64	6	111	**4088**	299
AB095-vcMMAE-E2	49	24	7	68	0	51	**2704**	141
AB095 (IgG1κ)	121	44	10	8	1	72	70	50
Chất đệm	1	0	0	0	0	0	0	0
Trastuzumab	570	111	29	14	2	103	381	525
TGN1412	288	208	148	128	58	875	104	200
Visilizumab	439	231	616	465	270	172	61	35
LPS	3007	1570	1994	803	2272	0	0	0

pg/ml xytokin được liệt kê bởi thể cho số								
Thể cho số:	**32150**	**32151**	**32289**	**32165**	**32314**	**32147**	**32156**	**32169**
IL-6								
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	2022	176	110	**102**	8	**71**	**>10000**	1182
kháng-CD71-TF02.13-2011 (IgG1κ)	763	160	116	**111**	15	**83**	**>10000**	1213
AB095-vcMMAE-E2	278	59	37	**103**	5	**78**	**9781**	423
AB095 (IgG1κ)	195	63	42	19	2	37	305	132
Chất đệm	15	1	1	0	1	1	1	8
Trastuzumab	1262	119	60	23	3	33	2776	879
TGN1412	655	521	296	214	207	151	208	248
Visilizumab	292	103	253	76	291	397	234	202
LPS	9668	9244	>10000	5655	>10000	1	1	10
TNFα								
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	3741	497	583	**2110**	133	**2830**	**8581**	3854
kháng-CD71-TF02.13-2011 (IgG1κ)	3438	693	881	**1425**	114	**1554**	**5163**	2309
AB095-vcMMAE-E2	1660	568	296	**1458**	51	**1221**	**4815**	815
AB095 (IgG1κ)	3703	634	349	443	50	1906	664	658
Chất đệm	93	0	1	0	1	0	2	15
Trastuzumab	5276	931	506	553	70	1131	2180	3701
TGN1412	>10000	9651	8913	>10000	>10000	>10000	9126	>10000
Visilizumab	>10000	6593	>10000	>10000	>10000	>10000	3157	1642
LPS	470	308	293	322	257	2	0	12

pg/ml xytokin được liệt kê bởi thể cho số								
Thể cho số:	**32150**	**32151**	**32289**	**32165**	**32314**	**32147**	**32156**	**32169**
IFNγ								
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	1950	19	3	12	7	349	**354**	52
kháng-CD71-TF02.13-2011 (IgG1κ)	7099	44	8	10	2	129	**139**	245
AB095-vcMMAE-E2	6119	35	4	4	1	161	**53**	14
AB095 (IgG1κ)	>10000	125	13	14	3	433	30	33
Chất đệm	26	0	2	1	0	0	0	8
Trastuzumab	9173	59	6	7	1	300	58	4100
TGN1412	>10000	>10000	>10000	>10000	3488	>10000	8685	>10000
Visilizumab	>10000	6159	7957	>10000	7965	>10000	2048	873
LPS	376	607	30	7	29	0	0	14
IL-2								
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	145	4	3	3	3	2	3	3
kháng-CD71-TF02.13-2011 (IgG1κ)	217	2	3	5	1	1	3	13
AB095-vcMMAE-E2	126	2	3	2	1	1	8	2
AB095 (IgG1κ)	301	8	3	4	2	1	5	3
Chất đệm	447	6	8	30	7	2	24	33
Trastuzumab	262	5	4	8	1	2	3	12
TGN1412	>10000	8485	9018	8223	>10000	821	636	1318
Visilizumab	396	459	1863	609	4643	>10000	1517	1038
LPS	78	3	6	4	4	7	15	34

VÍ DỤ 19: Hiệu quả kháng khối u của AADC kháng-CD71 ở mô hình chuột nhắt mảnh ghép khác loài SW-48

Ví dụ này thể hiện hiệu quả của kháng thể được hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 theo sáng chế trong mô hình mảnh ghép khác loài khối u chuột nhắt, sử dụng tế bào SW-48 (bệnh ung thư kết trực tràng người).

Trong nghiên cứu ví dụ này, tiêm trong màng bụng đơn lẻ của kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) ở liều lượng được chỉ ra được dùng cho các nhóm gồm 8 con chuột, và thể tích khối u trung bình được quan sát theo thời gian. Như được thể hiện trong Fig.13 và Bảng 12, khoảng giá trị của sự ức chế phát triển tổng số (TGI) vào 23 ngày như so với đối chứng tá dược lỏng được quan sát thấy ở tất cả liều lượng, với sự thoái triển khối u hoàn toàn quan sát được ở liều lượng 6 và 12 mg/kg.

Bảng 12: Sự ức chế phát triển khối u ghép khác loài sau khi điều trị AADC kháng-CD71

Liều lượng AADC (mg/kg)	TGI (%)	TGD (%)	PR (%)	CR (%)	TR (%)
0,75	35	21	0	0	0
1,5	66	71	0	0	0
3	96	>521	12,5	50	62,5
6	100	>521	0	100	100
12	100	>521	0	100	100

CR = đáp ứng hoàn toàn; PR = đáp ứng một phần; TGI = sự ức chế phát triển khối u; TGD = trì hoãn phát triển khối u; TR = đáp ứng tổng số.

VÍ DỤ 20: Hiệu quả kháng khối u của AADC kháng-CD71 ở mô hình chuột nhắt DLBCL PDX

Ví dụ này thể hiện hiệu quả của kháng thể được hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 theo sáng chế trong năm (5) mô hình mảnh ghép khác loài có nguồn gốc từ bệnh nhân (PDX) khối u chuột nhắt, sử dụng u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL) có nguồn gốc từ bệnh nhân HuPrime ở các con chuột cái SCID hoặc NOG.

Trong nghiên cứu ví dụ này, các nhóm gồm 3 con chuột được thiết lập với khối u dưới da (100 – 200 mm^3) và được dùng với 6 mg/kg của kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) hoặc đối chứng tá dược lỏng vào ngày 0 và 7. Như được thể hiện trong các kết quả ví dụ của Fig.14, vật phẩm thử nghiệm AADC đạt đến > 100% TGI ở 4 trong số 5 mô hình và 72% TFI ở 1 mô hình so với nhóm đối chứng tá dược lỏng. Đáp ứng hoàn chỉnh (*tức là*, không có khối u có thể đo được khi kết thúc nghiên cứu) trong mô hình được dùng với AADC được quan sát ở 2 trong

số 3 con chuột đối với LY2345, 3 trong số 3 con chuột đối với mô hình LY6933, 2 trong 3 con chuột đối với mô hình LY6934, và 2 hoặc 3 con chuột đối với mô hình LY2318. Không có đáp ứng hoàn chỉnh được quan sát thấy đối với mô hình LY3604. Các kết quả ví dụ này chứng tỏ rằng AADC theo sáng chế chứng tỏ hiệu quả, lên đến đáp ứng hoàn toàn trong một số mô hình.

VÍ DỤ 21: Hiệu quả kháng khối u của AADC kháng-CD71 ở mô hình chuột nhắt TumorGraft PDX

Ví dụ này thể hiện hiệu quả của kháng thể được hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 theo sáng chế ở chín (9) mô hình mảnh ghép khác loài có nguồn gốc từ bệnh nhân (PDX) khối u chuột nhắt, sử dụng bệnh ung thư vú người (CTG-0437, CTG-0869, CTG-1059), bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC) (CTG-1082, CTG-0860, CTG-0160, CTG-1012), và ung thư biểu mô tế bào nhỏ đầu và cổ (HNSCC) (CTG-1140, CTG-1082) có nguồn gốc từ bệnh nhân TumorGraft ở chuột nhắt trụi lông.

Trong nghiên cứu ví dụ này, các nhóm gồm 3 con chuột đối với mỗi mô hình PDX được thiết lập với khối u dưới da (150 – 300 mm^3) và được dùng với 6 mg/kg của kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) hoặc đối chứng tá dược lỏng vào ngày 0 và 7. Như được thể hiện trong các kết quả ví dụ của Fig.15A, Fig.15B, và Fig.15C, vật phẩm thử nghiệm AADC đạt đến > 100% sự ức chế phát triển khối u (TGI) ở 6 trong số 9 mô hình ở ba chỉ định ung thư. Trong 6 mô hình mà >100% TGI được quan sát thấy, 6 trong số 18 con chuột tiếp nhận AADC đạt đến đáp ứng hoàn toàn (*tức là*, không có khối u có thể đo được khi kết thúc nghiên cứu). Trong 2 mô hình khác, 92% và 78% TGI được quan sát thấy lần lượt đối với HNSCC và NSCLC. Một mô hình NSCLC không đáp ứng với AADC. Như được thể hiện trong các kết quả ví dụ này, AADC theo sáng chế chứng tỏ hiệu quả, bao gồm đáp ứng hoàn chỉnh trong một số trường hợp, đối với mô hình PDX có nguồn gốc từ nhiều loại bệnh ung thư ở người.

VÍ DỤ 22: Hiệu quả kháng khối u của AADC kháng-CD71 ở mô hình chuột nhắt PDX tụy HuPrime

Ví dụ này thể hiện hiệu quả của kháng thể được hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 theo sáng chế ở mô hình chuột nhắt mảnh ghép khác loài có nguồn gốc từ bệnh nhân (PDX), sử dụng bệnh ung thư tụy người có nguồn gốc từ bệnh nhân HuPrime (PA6237) ở chuột nhắt SCID.

Trong nghiên cứu ví dụ này, nhóm gồm 3 con chuột được thiết lập với khối u dưới da (100 – 200 mm^3) và được dùng với 3 hoặc 6 mg/kg của kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (AADC) hoặc đối chứng tá dược lỏng vào ngày 0 và 7. Như được thể hiện trong các kết quả ví dụ của Fig.16, vật phẩm thử nghiệm AADC đạt đến > 100% sự ức chế phát triển khối u (TGI) ở 3 và 6 mg/kg. Trong nhóm 6 mg/kg, 3 trong số 3 đáp ứng hoàn chỉnh được quan sát thấy đến ngày 59, mặc dù nhóm 3 mg/kg duy trì đáp ứng hoàn toàn đến ngày 31, sau đó khối u phát triển trở lại.

VÍ DỤ 23: Nghiên cứu gây độc thí điểm không GLP của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71

Ví dụ này thể hiện sự gây độc tương đối của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 (AADC) kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 theo sáng chế ở các mức liều lượng nằm trong khoảng từ 6 đến 18 mg/kg với kháng thể được liên hợp kháng-CD71 (ADC) Ab21.12-vcMMAE E2 ở các mức liều lượng nằm trong khoảng từ 0,6 đến 6 mg/kg ở khỉ cynomolgus (1-2 con khỉ thuộc mỗi giới trong mỗi nhóm) sau khi tiêm bolus IV 3 tuần một lần (Q3W) hoặc 2 tuần một lần (Q2W). Mổ tử thi động vật giai đoạn cuối được tiến hành trên động vật thử nghiệm vào ngày 29 (7 ngày sau liều cuối cùng). Các đánh giá trong quá trình nghiên cứu bao gồm dấu hiệu lâm sàng, khối lượng cơ thể, sự tiêu thụ thức ăn, bệnh lý lâm sàng, bệnh học giải phẫu, TK, và khả năng gây miễn dịch. Tóm tắt của nghiên cứu gây độc thí điểm được thể hiện trong Bảng 13.

Bảng 13: Nghiên cứu gây độc thí điểm không-GLP ở khỉ cynomolgus

Vật phẩm thử nghiệm	Mức độ liều lượng (mg/kg)	Tỉ lệ thuốc với protein	Liều lượng ngày	Đực/cái
kháng-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE	6	2,7	1 (không có liều thứ 2)	1/1
kháng-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE	3	2,7	1, 22	1/1
TF01-3011-vcMMAE kháng-CD71	6	2,9	1, 22	1/1
TF02.13-2011-vcMMAE kháng-CD71	6	2,9	1, 22	1/1
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	2,0	1, 22	1/1

Vật phẩm thử nghiệm	Mức độ liều lượng (mg/kg)	Tỉ lệ thuốc với protein	Liều lượng / ngày mổ tử thi	Đực/cái

Đối chứng tá dược lỏng	0	N/A	1, 22 / 29	2/1
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	2,0	1, 22 / 29	2/1
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	2,0	1, 22 / 29	2/1
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	18	2,0	1 / 22 (không có liều thứ 2)	2/1
kháng-CD71-TF02.13-3011-vcMMAE E2	9	2,0	1, 22 / 29	1/1
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	8	2,0	1, 15 / 50	1/1
Ab21.12-vcMMAE E2	6	2,0	1 / 10 (không có liều thứ 2)	1/0
Ab21.12-vcMMAE E2	2	2,0	1 (không có liều thứ 2)	0/1
Ab21.12-vcMMAE E2	0,6	2,0	1, 22 / 29	1/1

Sự gây độc nghiêm trọng được quan sát thấy như được biểu lộ bởi dáng đứng khom lưng, hoạt tính được giảm đi, và sự tăng thân nhiệt ở các nhóm mà tiếp nhận liều lượng cao của CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (18 mg/kg), các liều lượng thường xuyên của CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 (dùng liều lượng vào ngày 1 và 15), hoặc thể liên hợp thuốc kháng thể kháng-CD71 bố mẹ không được che giấu (ADC) (Ab21.12-vcMMAE E2) ở 6 và 2 mg/kg. Khi nguyên nhân tử vong có thể được thiết lập, nó được xác định là sự nhiễm khuẩn thứ cấp đối với sự kìm hãm miễn dịch liên quan đến thuốc.

Các phát hiện liên quan đến vật phẩm thử nghiệm là tương tự đối với CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 và Ab21.12-vcMMAE E2 và chủ yếu gồm có sự nhiễm độc huyết. Các phát hiện then chốt bao gồm (1) tỷ lệ tử vong quy cho sự nhiễm khuẩn thứ cấp được quan sát thấy ở các nhóm mà tiếp nhận liều đơn lẻ của CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 ở 18 mg/kg, CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 vào ngày 1 và 15 ở 8 mg/kg, hoặc liều đơn lẻ của ADC (Ab21.12-vcMMAE E2) ở ≥ 2 mg/kg, (2) khối lượng cơ thể giảm đi 2 tuần sau khi dùng liều lượng, với sự phục hồi vào 3 tuần sau khi dùng liều lượng ở ≥ 12 mg/kg của CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2,

(3) sự giảm đi phụ thuộc liều lượng ở khối lượng tế bào hồng cầu và tất cả các quần thể bạch cầu với sự phục hồi từ một phần đến hoàn toàn quan sát được 3 tuần sau khi dùng liều lượng, (4) sự tăng lên tạm thời ở hàm lượng tiểu cầu 2 tuần sau khi dùng liều lượng, (5) sự tăng lên từ nhẹ đến trung bình của fibrinogen, albumin giảm đi, và globulin tăng lên, (6) sự giảm đi từ nhẹ đến trung bình ở các loại tế bào tủy xương, lách, và tuyến ức, với sự giảm khối lượng tương ứng trong tuyến ức và lách. Các loại tế bào giảm đi cũng được quan sát thấy ở một vài mô bạch huyết.

Trong nghiên cứu ví dụ này, các liều lượng được dung chịu cao nhất của CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 và Ab21.12-vcMMAE E2 (ADC tương ứng) trong các nghiên cứu này lần lượt là 12 mg/kg và 0,6 mg/kg, được dùng 3 tuần một lần trong 2 liều lượng.

VÍ DU 24: Nghiên cứu gây độc GLP của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71

Ví dụ này thể hiện nghiên cứu gây độc liều lượng lặp lại GLP ở khỉ cynomolgus của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp kháng-CD71 (AADC) kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 theo sáng chế ở mức độ liều lượng bằng 0, 2, 6, hoặc 12 mg/kg vào ngày 1 và 22 thông qua tiêm bolus IV. Các nhóm liều lượng được thể hiện trong Bảng 14.

Bảng 14: Nghiên cứu gây độc GLP ở khỉ cynomolgus

Vật phẩm thử nghiệm	Mức độ liều lượng (mg/kg)	Tỉ lệ thuốc với protein	Liều lượng ngày	Đực/cái
Tá dược lỏng	0	N/A	1, 22	6/6
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	2	2,0	1, 22	6/6
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	2,0	1, 22	6/6
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	2,0	1 (không có liều thứ 2)	6/6

Trong nghiên cứu ví dụ này, mỗi nhóm gồm 6 con khỉ đực và 6 con khỉ cái được dùng liều lượng với kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 hoặc tá dược lỏng (liều bolus IV của liều lượng được chỉ ra vào ngày 1 và 22) như được thể hiện trong Bảng 14. Mổ tử thi động vật giai đoạn cuối được tiến hành vào ngày 29, và mổ tử thi hồi phục được tiến hành vào ngày 64. Các đánh giá độ độc bao gồm tỷ lệ tử vong, dấu hiệu lâm sàng, sự thay đổi khối lượng cơ thể, sự tiêu thụ thức ăn, bệnh lý lâm sàng, bệnh học giải phẫu, khám mắt, và đánh giá chức năng tim mạch, hô hấp, và

hệ thần kinh trung ương. Nghiên cứu này bao gồm phân tích TK và đánh giá sự tạo thành ADA. Các quan sát ví dụ sau đây được thực hiện. Tóm tắt về kết quả được chọn từ nghiên cứu gây độc GLP của kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2, có DAR bằng ~2, so với nghiên cứu không-GLP tương ứng của thể liên hợp thuốc kháng thể kháng-CD71 không được che giấu (ADC) Ab21.12-vcMMAE E2 (cũng có DAR bằng ~2), được tóm tắt trong Bảng 15.

Bảng 15: Kết quả nghiên cứu gây độc GLP ở khỉ cynomolgus

Vật phẩm thử nghiệm (q3wx2)	Mức độ liều lượng (mg/kg)	Sự giảm khối lượng cơ thể	Số đếm bạch cầu trung tính trung bình ± SD	Khả năng dung chịu
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	12	0 %	61 ± 44	Không dung chịu
kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2	6	0 %	277 ± 132	Được dung chịu
Ab21.12-vcMMAE E2	2	6 %	70	Không dung chịu
Ab21.12-vcMMAE E2	0,6	4 %	280 ± 42	Được dung chịu

Không có tác dụng liên quan đến AADC trên khối lượng cơ thể, sự tiêu thụ thức ăn, tốc độ hô hấp, điện tâm đồ, sự đông máu, và các thông số xét nghiệm nước tiểu, không có cái nào có tác dụng thần kinh, tác dụng mắt, hoặc phát hiện bệnh học tổng thể bất kỳ.

Tỷ lệ tử vong liên quan đến AADC được quan sát thấy ở liều lượng 12 mg/kg; 1 con cái được phát hiện thấy chết vào ngày 10 và 2 con cái bị giết chết êm ái vào ngày 11 trong điều kiện lâm sàng suy yếu. Bệnh lý lâm sàng liên quan đến AADC và các phát hiện bằng kính hiển vi ở các con vật này tương tự với những gì có ở động vật mà sống sót đến khi mổ tử thi theo kế hoạch (ngày 29), ngoại trừ bằng chứng dưới kính hiển vi của sự nhiễm vi khuẩn, mà được coi là hậu quả của sự kìm hãm miễn dịch liên quan đến AADC.

Như được thể hiện trong Bảng 15, kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 chứng tỏ khả năng dung chịu tốt hơn tương quan với Ab21.12-vcMMAE E2 không có sự giảm khối lượng cơ thể có thể phát hiện được. Như được thể hiện, Ab21.12-vcMMAE E2 thiếu khả năng dung chịu trong vòng 8 ngày của liều đơn lẻ ở 2 mpk, mặc dù kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2 tạo ra sự bảo vệ ≥ 10 lần so với Ab21.12-vcMMAE E2 không được che giấu.

Dấu hiệu lâm sàng liên quan đến AADC ở các con vật được dùng liều lượng 12 mg/kg sống sót đến khi mổ tử thi theo kế hoạch là tổn thương/vết thương da thống nhất với sự nhiễm khuẩn mà tương quan với các quần thể bạch cầu giảm đi và dấu hiệu của đáp ứng pha cấp tính (albumin và cholesterol giảm đi và globulin, bilirubin tổng số, và triglyxerit tăng lên).

Sự thay đổi ở các thông số huyết học ở ≥ 6 mg/kg sau liều thứ nhất gồm có sự giảm đi của khối lượng tế bào hồng cầu, tế bào lưới, và tất cả các tập hợp con bạch cầu, cùng với sự tăng lên của tiểu cầu. Sự thay đổi huyết học ở 2 mg/kg bị giới hạn ở tiểu cầu tăng nhẹ sau liều thứ nhất và thứ hai.

Sự thay đổi liên quan đến AADC ở các thông số hóa học lâm sàng sau liều thứ nhất đáng chú ý nhất ở 12 mg/kg và gồm có đáp ứng pha cấp tính (sự giảm đi của albumin và cholesterol, và sự tăng lên của globulin, triglyxerit [chỉ các con cái], bilirubin tổng số), và sự tăng lên của nitơ ure (chỉ các cá thể) và creatinin, và sự giảm đi của photpho. Sự thay đổi hóa học lâm sàng ở 6 mg/kg chỉ thấy được sau liều thứ nhất và bị giới hạn ở bilirubin tăng lên và globulin tăng lên tối thiểu ở các con cái riêng lẻ.

Các phát hiện huyết học và hóa học lâm sàng liên quan đến AADC phục hồi khi kết thúc pha phục hồi.

Các phát hiện bằng kính hiển vi liên quan đến AADC khi giết chết êm ái cuối cùng có ở tuyến ức, tuyến thượng thận, và tủy xương ở ≥ 6 mg/kg/liều lượng. Các phát hiện ở vị trí tiêm được quan sát ở tất cả các nhóm, và được hiểu là có liên quan đến quy trình sử dụng và không đặc hiệu đối với AADC. Khối lượng tuyến ức được giảm đi ở khỉ đực được dùng liều lượng với 12 mg/kg và khỉ cái được dùng liều lượng với 6 mg/kg, mà tương quan về mặt mô học với các loại tế bào giảm đi, cụ thể là của vỏ tuyến ức. Khối lượng tuyến thượng thận được tăng lên ở khỉ đực được dùng liều lượng với 12 mg/kg và khỉ cái được dùng liều lượng với 6 mg/kg và tương quan mô học là phì đại vỏ thượng thận. Các loại tế bào giảm đi có mặt trong tủy xương, cụ thể là trong xương đùi, ở khỉ đực được dùng liều lượng với ≥ 6 mg/kg. Sau khoảng thời gian không dùng liều lượng 6 tuần các loại tế bào giảm đi của tuyến ức và phì đại vỏ thượng thận không có mặt, thống nhất với sự hồi phục hoàn toàn của các thay đổi này. Các loại tế bào tăng lên của tủy xương vẫn dai dẳng nhưng ở độ nghiêm trọng giảm đi, thống nhất với sự hồi phục một phần.

VÍ DỤ 25: Sự liên hợp của MMAE với kháng thể có thể hoạt hóa CD71 và phương pháp hạ thấp DAR của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp CD71 thu được đến khoảng DAR 3

Ví dụ này phác họa phương pháp mà được sử dụng để liên hợp vc-MMAE với kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71, kháng-CD71-TF02.13-2011, để tạo ra TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-

CD71 chứa tải lượng thuốc bằng 2 phân tử MMAE đối với mỗi phân tử kháng-CD71-TF02.13-2011, ngoài phương pháp được sử dụng để làm giàu DAR đến khoảng 3.

Phương pháp liên hợp

TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 được làm giàu E2 – Bổ sung 0,5 M EDTA (0,39 ml) và TCEP (0,77 ml, 10 mM trong WFI, 7,7 nmol, 2,2 đương lượng) vào dung dịch của kháng-CD71-TF02.13-2011 (13,95 mg/ml), 39 g dung dịch, 544 mg, 3,5 nmol) ở 2-8 °C qua đêm. Sau đó pha loãng kháng thể đã khử với DMSO (2,29 ml) được xử lý bằng vcMMAE trong DMSO (1,89 ml của vcMMAE 9,49 mM trong DMSO, 17,9 nmol, 5,1 đương lượng) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 1 giờ. Xử lý kháng thể được liên hợp bằng N-axetyl xystein (0,29 ml của 100 mM trong WFI, 29 nmol, 8,2 đương lượng) để dập tắt vcMMAE dư. Phân tích dung dịch đã được dập tắt bằng HIC (sắc ký tương tác kỵ nước) đối với loại DAR > E4 (loại DAR cao hơn, 20,9% trong chế phẩm nêu trên).

Phương pháp làm giàu đến DAR thấp hơn

Tạo huyền phù phản ứng liên hợp với nhựa HIC, như nhựa HIC có sẵn trên thị trường từ Tosoh Biosciences (Toyopearl alkyl làm ví dụ) trong các phần ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 giờ để làm giảm loại DAR cao hơn đến mức được nhắm đích (thường là < 2%). Lọc dung dịch đã xử lý và rửa nhựa liên tiếp bằng PBSE (125 mM kali photphat, 150 mM NaCl, 6,3 mM EDTA, pH 7,2, 22 g) sau đó là PBS (5 mM kali photphat, 200 mM NaCl, độ pH 7, 35 g). Cô dịch lọc và dịch rửa đã được kết hợp và trao đổi chất đệm bằng cách sử dụng bộ lọc ly tâm ngưỡng ngắt khối lượng phân tử 30 kD sau đó pha loãng với các thành phần chế phẩm để lưu trữ.

Sản phẩm thu được chứa 228 mg (A280 6,5 mg/ml) và được thể hiện là có DAR bằng khoảng 2,9 như được đo từ cột HIC có sẵn trên thị trường và tạo thành các đặc điểm sau đây và các loại DAR: SEC 98,7% monome, 0,2% khối lượng phân tử cao hơn, 1,1% khối lượng phân tử thấp hơn, Nội độc tố < 0,06 Eu/mg, các loại DAR lớn hơn so với E4 là ít hơn 2 % diện tích; DAR E0 là khoảng 6,2 % diện tích, DAR E2 là khoảng 40,7 % diện tích, và DAR E4 là khoảng 46,8 % diện tích).

Trong các ví dụ được mô tả trong bản mô tả này, sản phẩm DAR được làm giàu này được đề cập đến dưới dạng "TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 (có DAR trung bình bằng ~3)"

VÍ DỤ 26: Sự liên hợp của MMAE với kháng thể có thể hoạt hóa CD71 và phương pháp làm giàu DAR của kháng thể có thể hoạt hóa được liên hợp CD71 thu được vào khoảng DAR 2 ("E2")

Ví dụ này phác họa phương pháp mà được sử dụng để liên hợp vc-MMAE với kháng thể có thể hoạt hóa kháng-CD71, kháng-CD71-TF02.13-2011, để tạo ra TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-

CD71 chứa tải lượng thuốc bằng 2 phân tử MMAE đối với mỗi phân tử kháng-CD71-TF02.13-2011, ngoài phương pháp được sử dụng để làm giàu DAR đến khoảng 2.

Phương pháp liên hợp

TF02.13-2011-vc-MMAE kháng-CD71 E2 – Pha loãng vào dung dịch của kháng-CD71-TF02.13-2011 (20,3 mg/ml) với 1457 g PBSE (125 mM kali photphat, 150 mM NaCl, 6,3 mM EDTA, độ pH 7,7) và làm lạnh xuống 4 °C. Bổ sung TCEP (10 mM trong WFI, 30,2 ml, 0,30 mmol, 1,5 đương lượng) vào dung dịch đã được làm lạnh và duy trì ở nhiệt độ 4 °C trong thời gian 15 giờ. Bổ sung dung dịch của vc-MMAE (1,056 g, 0,80 mmol, 4 đương lượng) trong DMSO (300 g) Vào kháng thể đã khử cùng với việc làm lạnh sau đó là rửa DMSO (65 g) sau đó để cho dung dịch ấm lên đến nhiệt độ trong phòng. Sau 3,5 giờ, bổ sung N-axetyl xystein (0,262 g, 1,60 mmol, 8 đương lượng) để dập tắt vc-MMAE dư và lưu trữ hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 2-8 °C đến khi tinh chế.

Phương pháp làm giàu đến DAR thấp hơn

Tinh chế sản phẩm trong các phần trên cột tinh chế HIC có sẵn trên thị trường như các cột có sẵn trên thị trường từ GE Life Sciences (alkyl Sepharose) sử dụng gradien của chất đệm amoni sulfat / photphat ở độ pH 7,1 với việc theo dõi bằng UV ở 280 nm. Tập hợp sản phẩm DAR 2 đã thu gom được (xấp xỉ 9,5 g, hiệu suất 30%) được trao đổi chất đệm với chất đệm ở độ pH 6,0 bằng TFF bằng cách sử dụng màng Pelliçon 3 Ultracel 30 kD sau đó pha loãng với các thành phần chế phẩm để lưu trữ.

Sản phẩm thu được (A280 6,4 mg/ml) được thể hiện là có DAR bằng khoảng 2 như được đo từ cột HIC có sẵn trên thị trường và tạo thành các đặc điểm sau đây.và các loại DAR: SEC 99,6% monome, 0,2% HMW, 0,2% LMW, Nội độc tố < 0,06 EU/mg, và DAR E2 là khoảng 99,0 % diện tích, với độ biến thiên từ lần chạy này đến lần chạy khác nằm trong khoảng từ 94 đến 99% DAR E2.

Trong các ví dụ được mô tả trong bản mô tả này, sản phẩm DAR 2 ("E2") được làm giàu này được đề cập đến dưới dạng "kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2".

VÍ DỤ 27: Đánh giá đặc điểm lý sinh của E2 so với các loại DAR cao hơn ở mô hình chuột nhất tiền lâm sàng

Sản phẩm được liên hợp, không được tinh chế HIC thu được từ phương pháp được mô tả trong Ví dụ 25 được chạy qua cột HIC bằng cách sử dụng chất đệm và quy trình tiêu chuẩn như được phác họa trong bản mô tả này. Như được thể hiện trong Fig.18A, số lượng của các loại có tải lượng thuốc từ 0 đến 8 được xác định.

Sản phẩm E2, được tinh chế thu được từ ví dụ 26 được đưa đi cùng sắc ký HIC. Như được thể hiện trong Fig.18B, chỉ loại đơn lẻ chứa tải lượng thuốc bằng 2 được quan sát thấy.

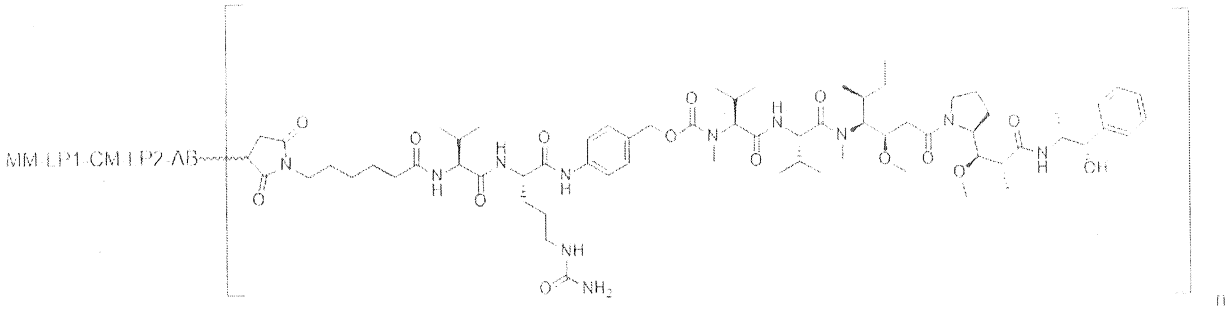
Sản phẩm không được tinh chế và E2 được gắn nhãn phóng xạ và được tiêm vào con chuột để đánh giá sự thanh thải và sự gây độc tổng thể của mỗi sản phẩm. Như được thể hiện trong Fig.18C, sản phẩm E2 được tinh chế được thể hiện là có độ thanh thải thấp hơn đáng kể tương quan với sản phẩm được tải thuốc cao, không được tinh chế.

CÁC PHƯƠNG ÁN KHÁC

Mặc dù sáng chế đã được mô tả kết hợp với phần mô tả chi tiết của chúng, phần mô tả trên đây được dự định để minh họa và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế, mà được xác định bởi phạm vi của các yêu cầu bảo hộ kèm theo. Các khía cạnh, ưu điểm, và cải biến khác nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể có hoạt tính được liên hợp bao gồm cấu trúc có Công thức (I) hoặc muối của nó:



Công thức (I)

(a) trong đó

(i) AB là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với CD71 người và bao gồm

i. vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự CDRH1 bao gồm SEQ ID NO: 9, trình tự CDRH2 bao gồm SEQ ID NO: 10, và trình tự CDRH3 bao gồm SEQ ID NO: 11; và

ii. vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự CDRL1 bao gồm SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO:13, trình tự CDRL2 bao gồm SEQ ID NO: 14, và trình tự CDRL3 bao gồm SEQ ID NO: 15;

(ii) MM là gốc che giấu bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 18, trong đó MM ức chế sự liên kết của AB với CD71 người khi kháng thể có hoạt tính được liên hợp ở trạng thái không được phân cắt;

(iii) LP1 là gốc liên kết thứ nhất có chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 207;

(iv) CM là gốc có thể phân cắt bao gồm trình tự SEQ ID NO: 156, trong đó CM là polypeptit mà đóng vai trò làm cơ chất cho proteaza; và

(v) LP2 là gốc liên kết thứ hai bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 38: và

(b) trong đó "n" là 2.

2. Kháng thể có hoạt tính được liên hợp theo điểm 1, trong đó AB bao gồm isotyp IgG1.

3. Kháng thể có hoạt tính được liên hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó AB là kháng thể có vùng không đổi chuỗi nặng, và trong đó gốc đầu cùng C của vùng không đổi chuỗi nặng không phải là lysin.

4. Kháng thể có hoạt tính được liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 7.

5. Kháng thể có hoạt tính được liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 19.

6. Kháng thể có hoạt tính được liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 201.

7. Kháng thể có hoạt tính được liên hợp theo điểm 6, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 202.

8. Kháng thể có hoạt tính được liên hợp theo điểm 6, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 202, trong đó axit amin đầu cùng N có SEQ ID NO: 202 được cải biến thành pyroglutamat.

9. Kháng thể có hoạt tính được liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 169.

10. Kháng thể có hoạt tính được liên hợp theo điểm 9, bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 170.

11. Kháng thể có hoạt tính được liên hợp theo điểm 9, bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO: 167 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO: 170, trong đó axit amin đầu cùng N có SEQ ID NO: 170 được cải biến thành pyroglutamat.

Fig. 1

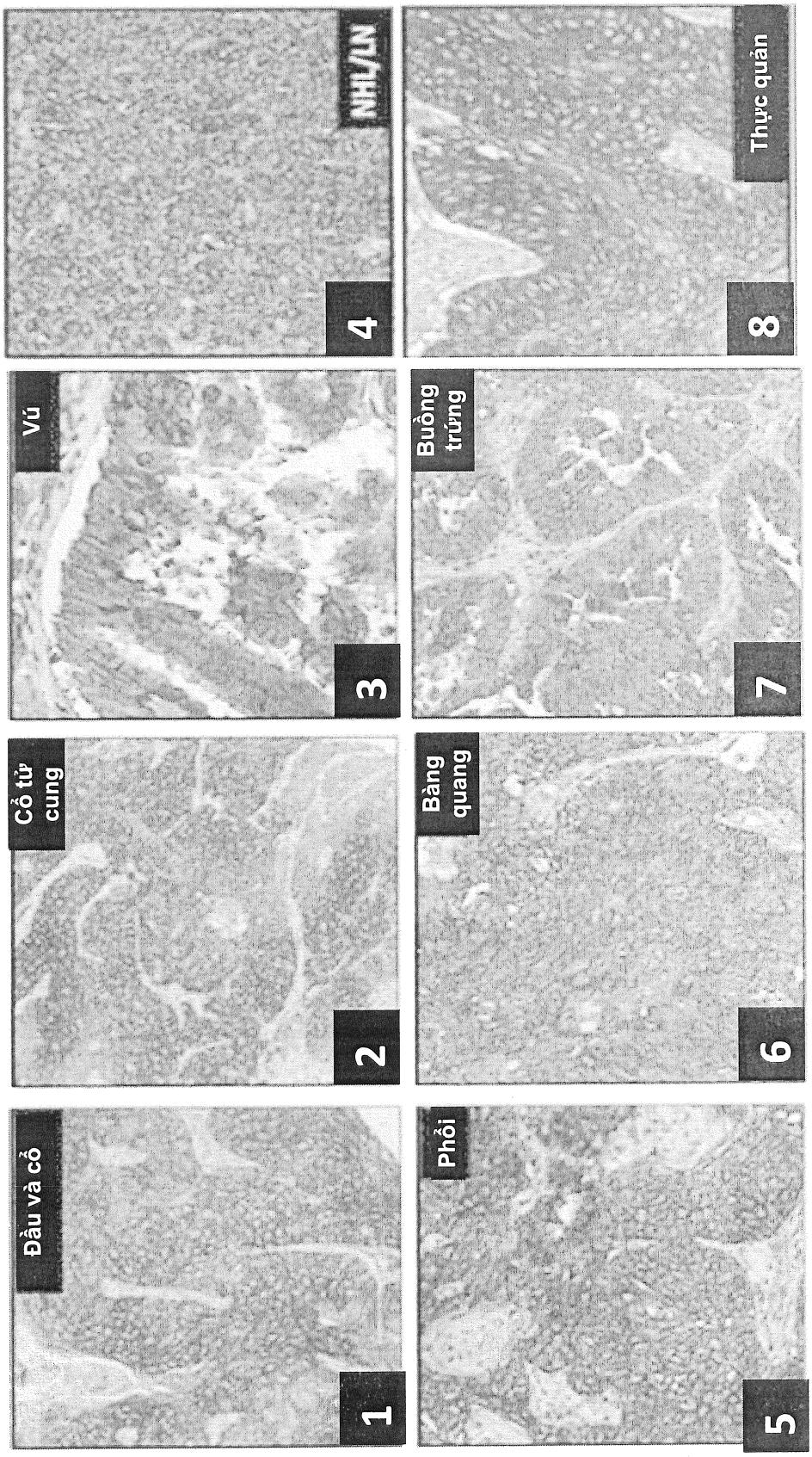

Đầu và cổ
1
Cổ tử cung
2
Vú
3
NHỊ/LN
4
Phổi
5
Bàng quang
6
Buồng trứng
7
Thực quản
8

Fig. 2

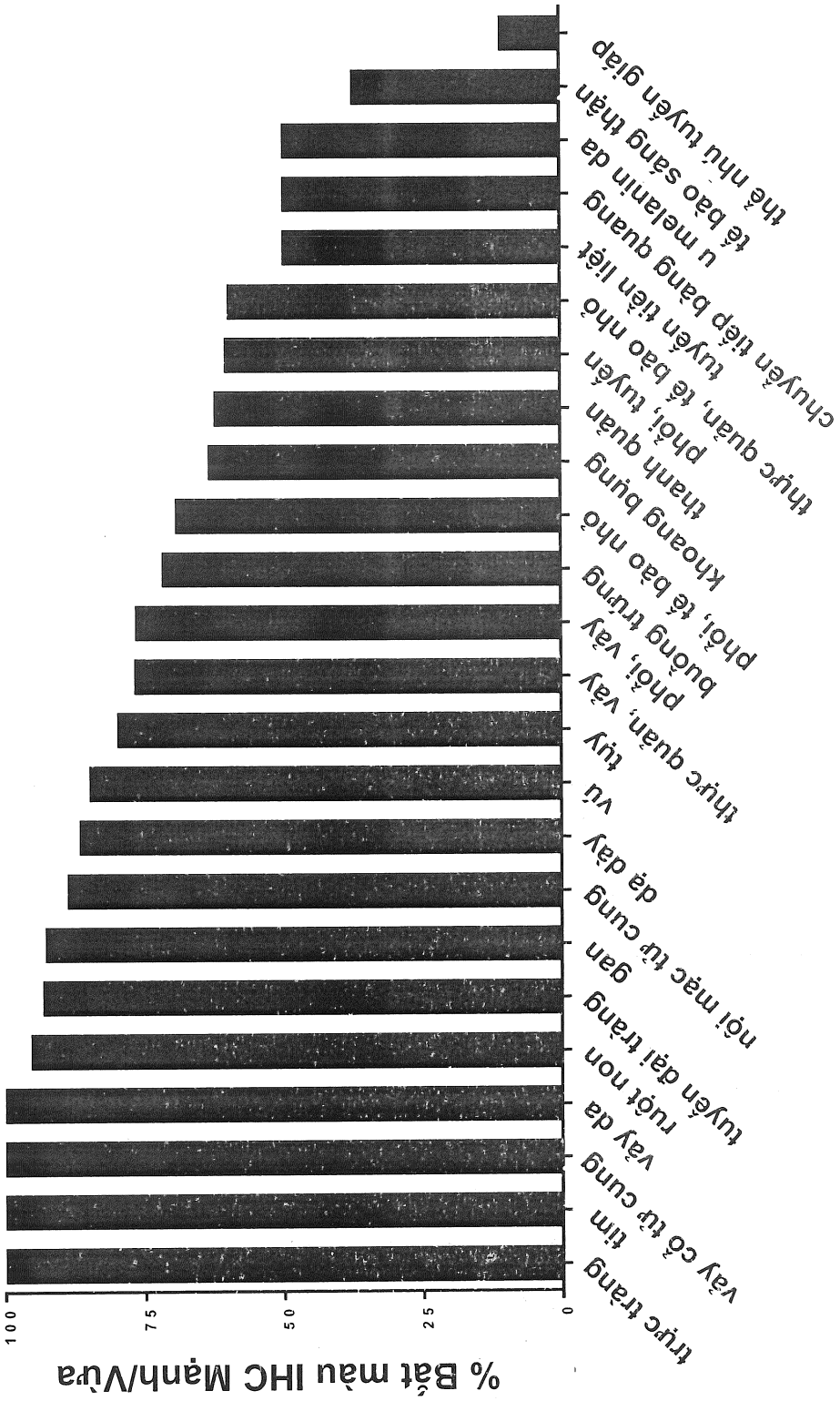
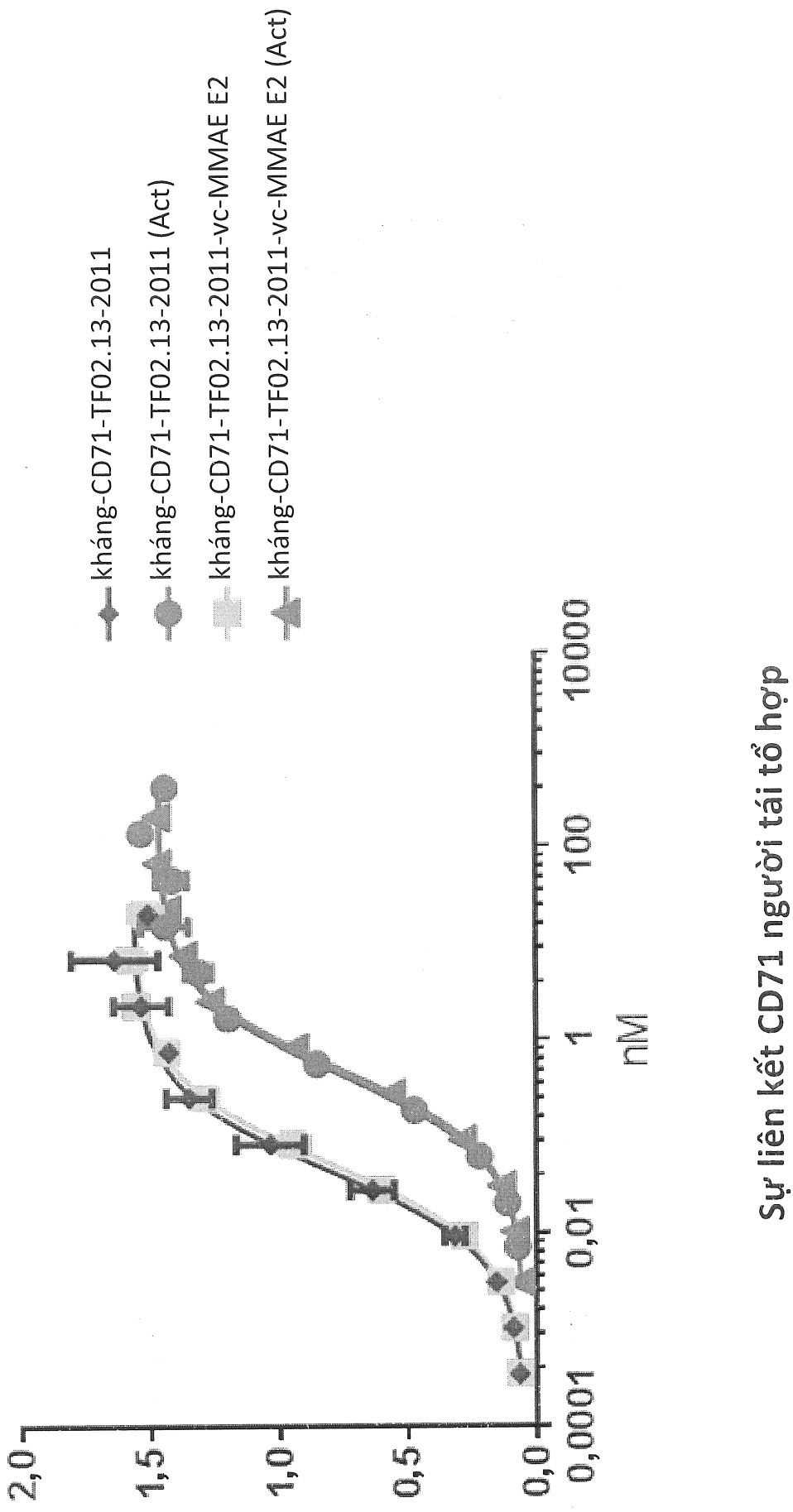
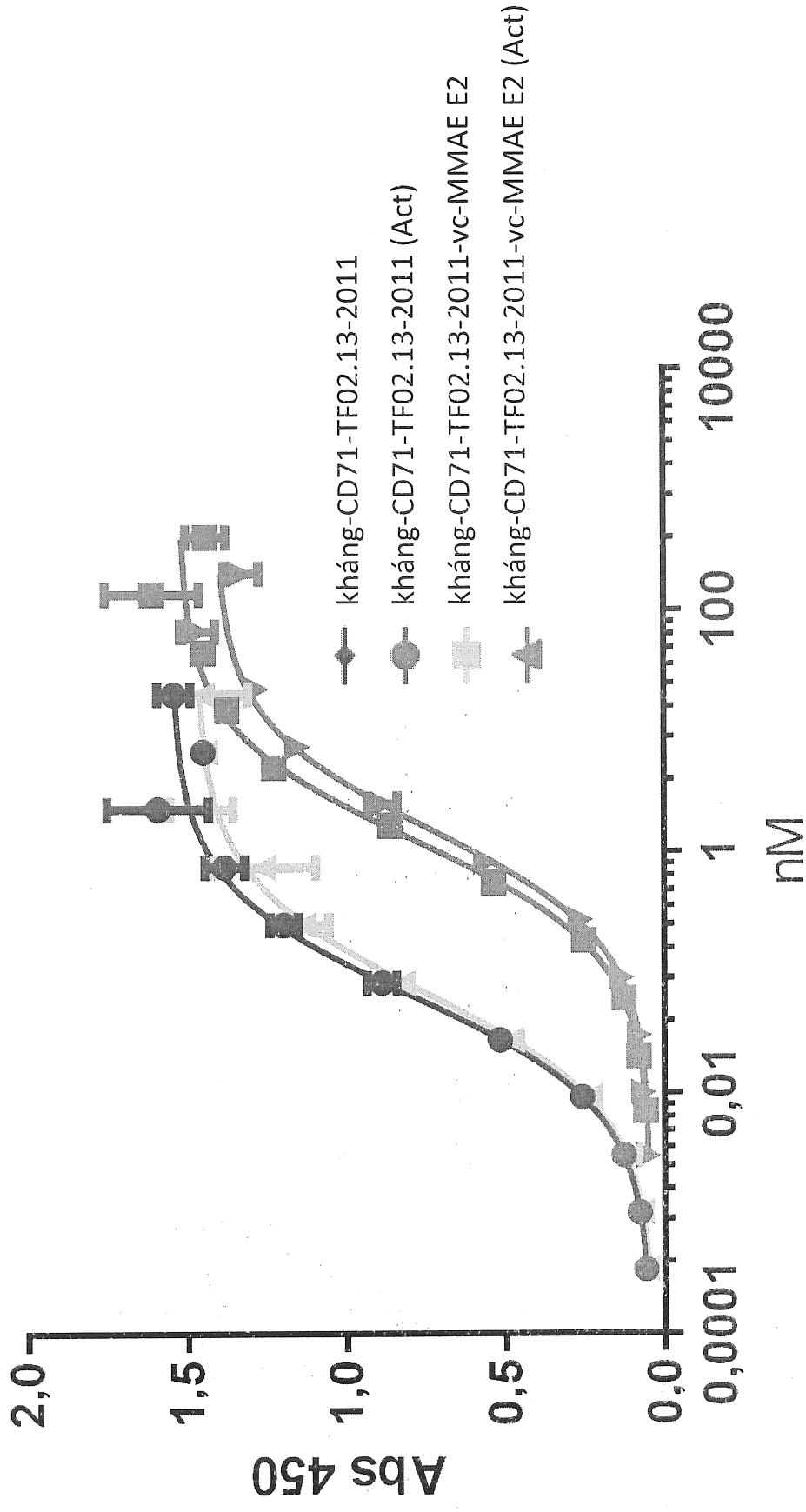

% Bắt mầu IHC Mạnh/Vừa
0
25
50
75
100
trực tràng
tim
vảy cổ tử cung
vảy da
ruột non
tuyến dại tràng
gan
nội mạc tử cung
dạ dày
vú
thực quản, vảy
phổi, vảy
buồng trứng
phổi, tế bào nhỏ
khoang bụng
thanh quản
phổi, tuyến
thực quản, tế bào nhỏ
tuyến tiền liệt
chuyển tiếp bàng quang
u melanin da
tế bào sáng thận
thể nhú tuyến giáp

Fig. 3A



Sự liên kết CD71 người tái tổ hợp

Fig. 3B



Sự liên kết CD71 khỉ cynomolgus tái tổ hợp

Fig. 3C

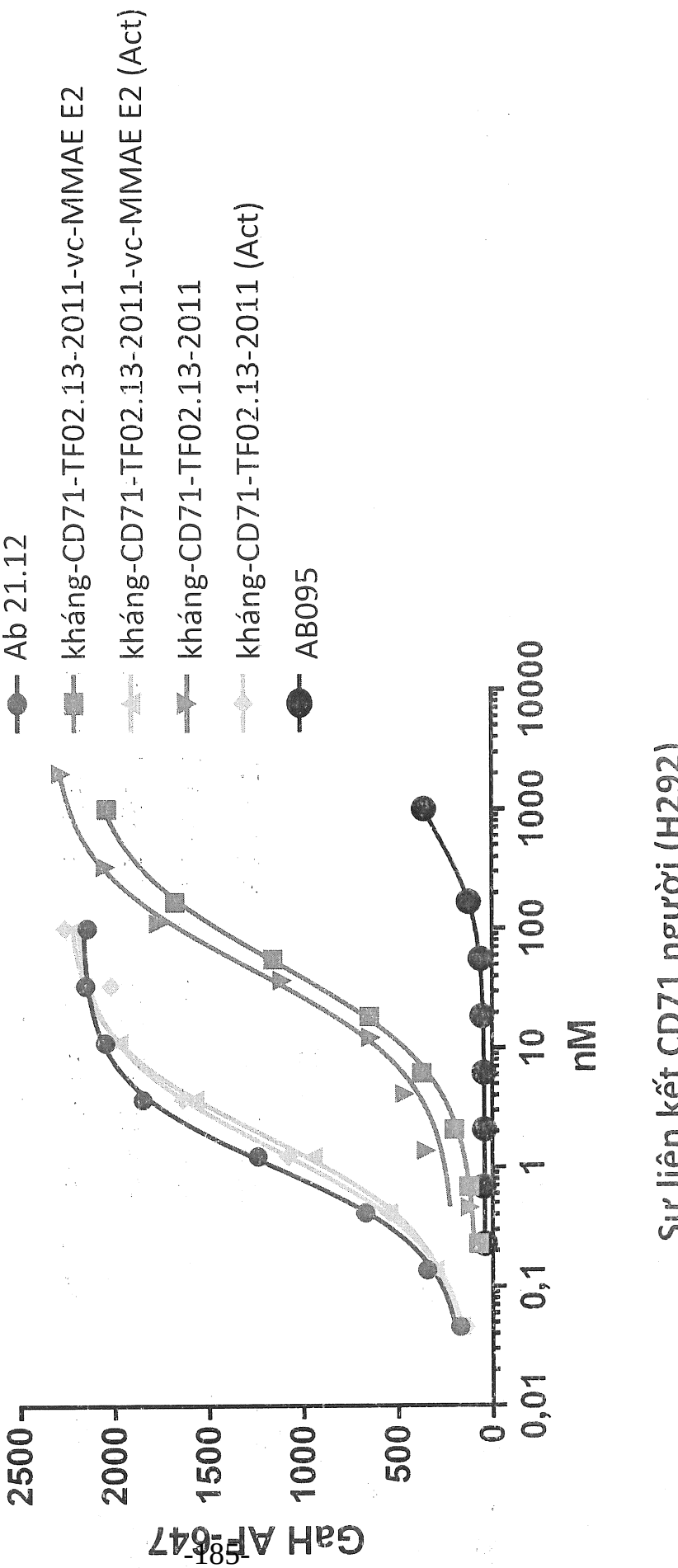
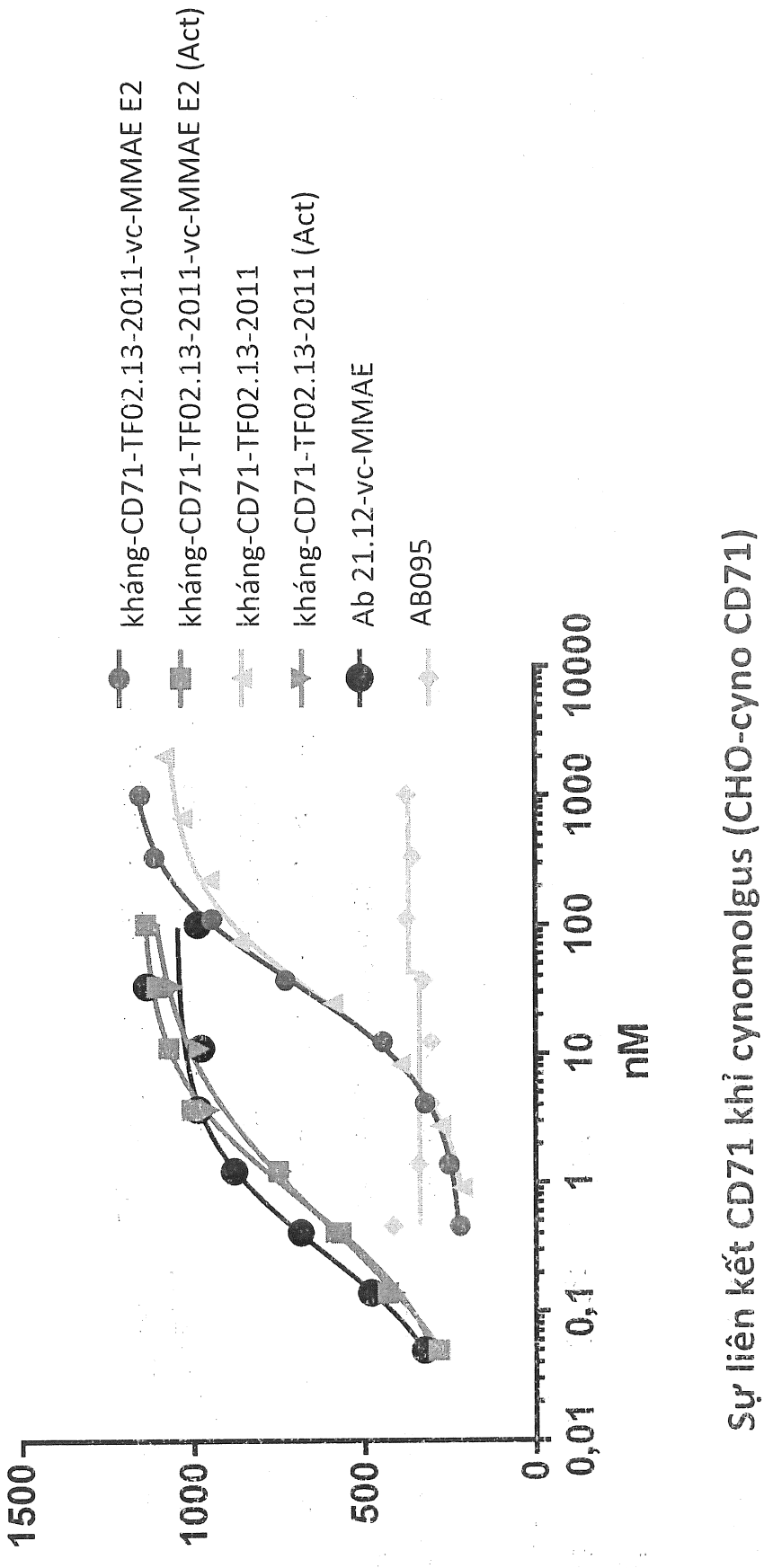

Ab 21.12
kháng-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2
kháng-CD71-TF02.13-2011-vc-MMAE E2 (Act)
kháng-CD71-TF02.13-2011
kháng-CD71-TF02.13-2011 (Act)
AB095
GaH AF-647
2500
2000
1500
1000
500
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
nM
Sự liên kết CD71 người (H292)

Fig. 3D



Sự liên kết CD71 khỉ cynomolgus (CHO-cyno CD71)

Fig. 4A

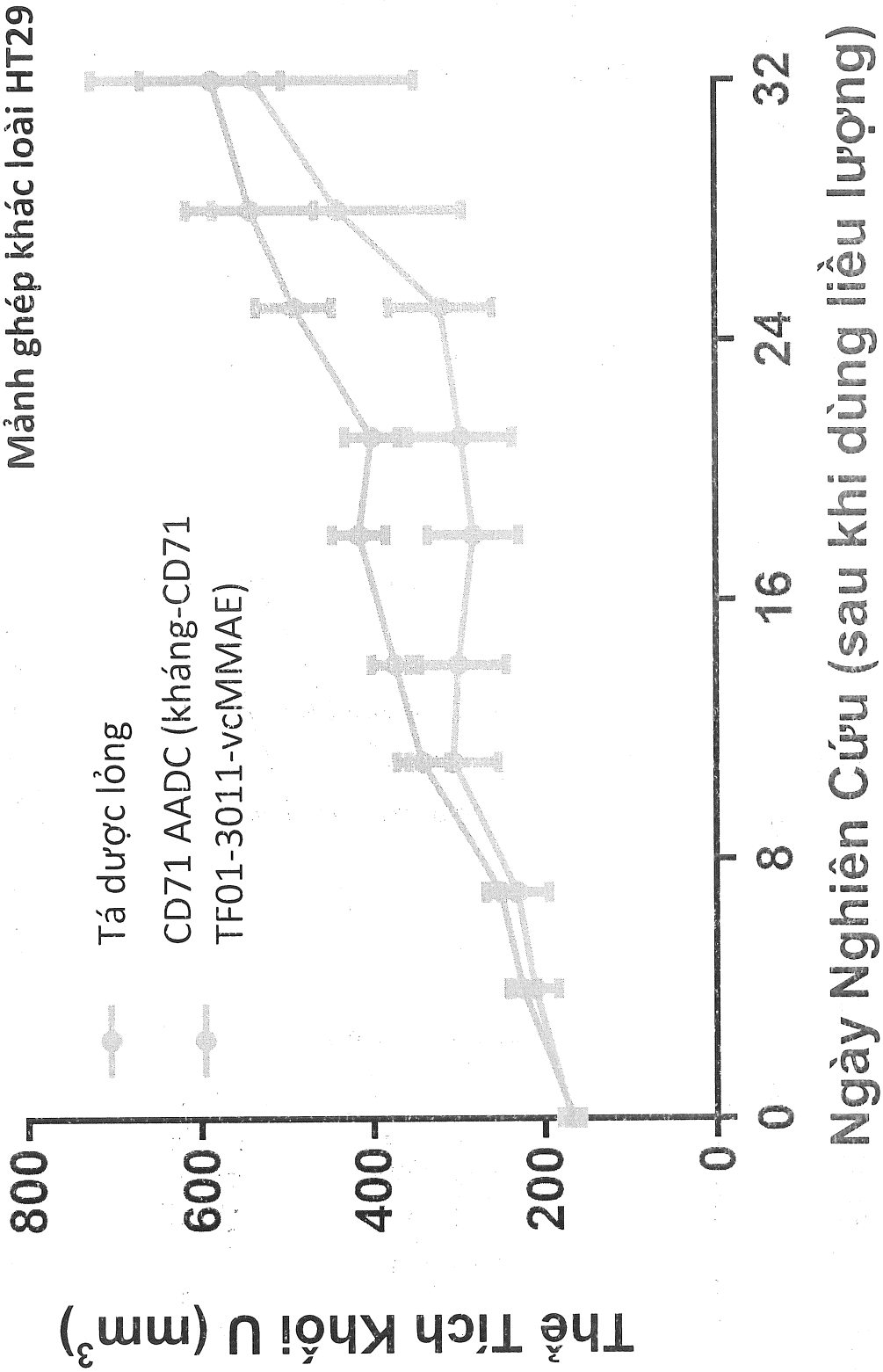

Mảnh ghép khác loài HT29
Tá dược lỏng
CD71 AADC (kháng-CD71 TF01-3011-vcMMAE)
Thể Tích Khối U (mm³)
800
600
400
200
0
0
8
16
24
32
Ngày Nghiên Cứu (sau khi dùng liều lượng)

Fig. 4B

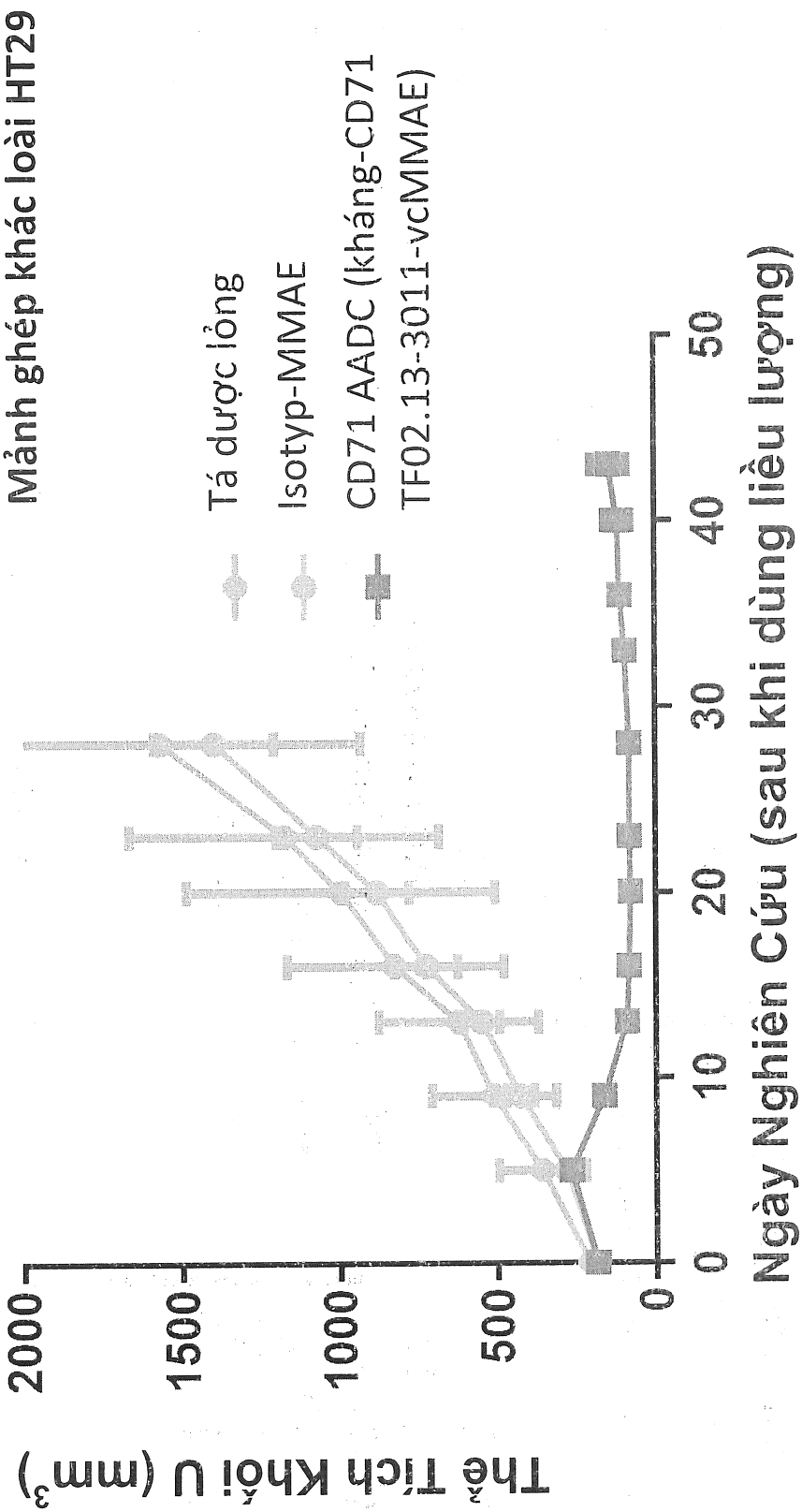

Mảnh ghép khác loài HT29
Tá dược lỏng
Isotyp-MMAE
CD71 AADC (kháng-CD71 TF02.13-3011-vcMMAE)
Thể Tích Khối U (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
Ngày Nghiên Cứu (sau khi dùng liều lượng)

Fig. 4C

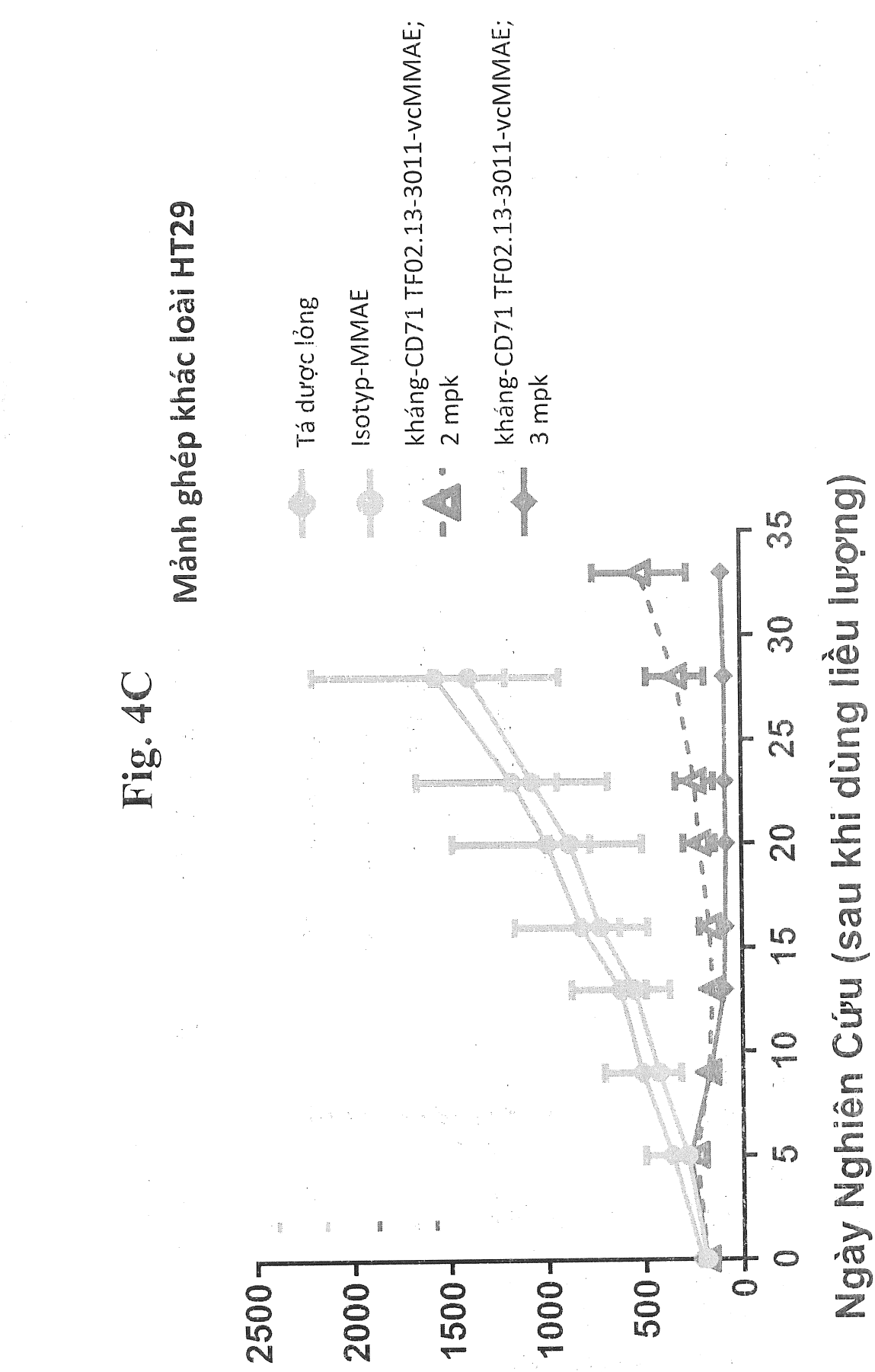

Mảnh ghép khác loài HT29
Tá dược lỏng
Isotyp-MMAE
kháng-CD71 TF02.13-3011-vcMMAE; 2 mpk
kháng-CD71 TF02.13-3011-vcMMAE; 3 mpk
Thể Tích Khối U (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Ngày Nghiên Cứu (sau khi dùng liều lượng)

Fig. 5

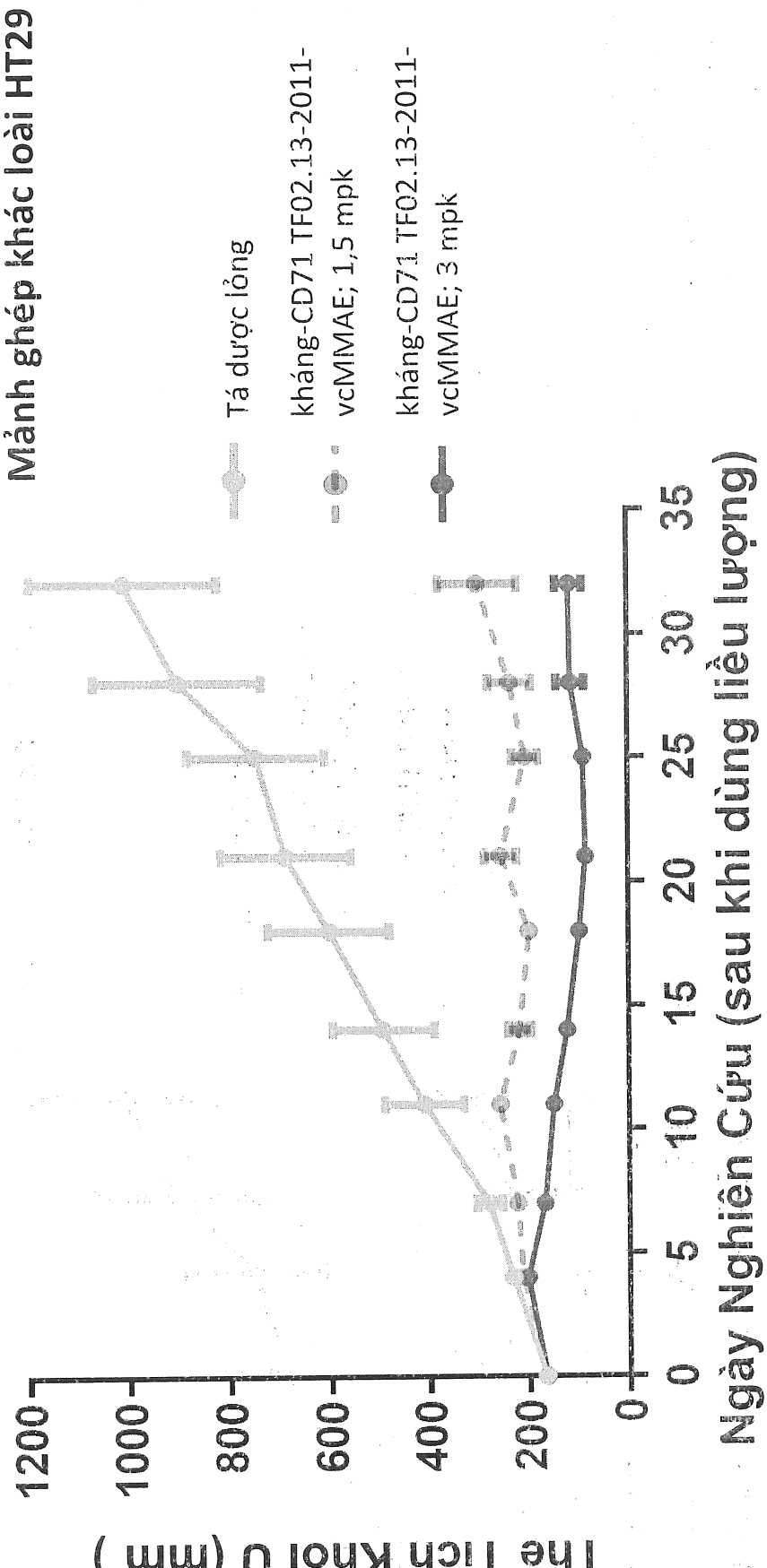

Mảnh ghép khác loài HT29
Tá dược lỏng
kháng-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE; 1,5 mpk
kháng-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE; 3 mpk
Thể Tích Khối U (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Ngày Nghiên Cứu (sau khi dùng liều lượng)

Fig. 6A

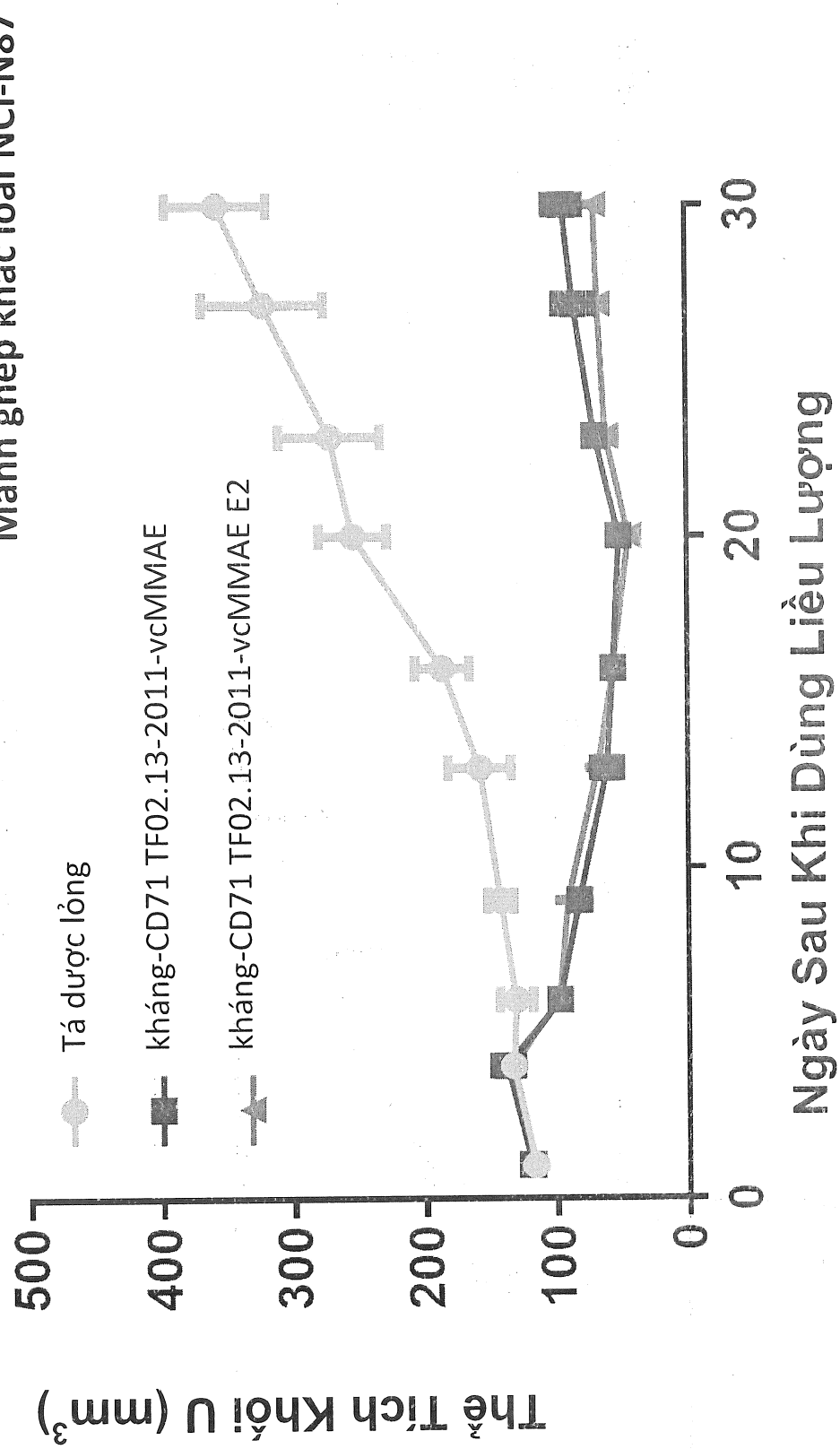

Mảnh ghép khác loài NCI-N87
Tá dược lỏng
kháng-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE
kháng-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2
Thể Tích Khối U (mm³)
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
Ngày Sau Khi Dùng Liều Lượng

Fig. 6B

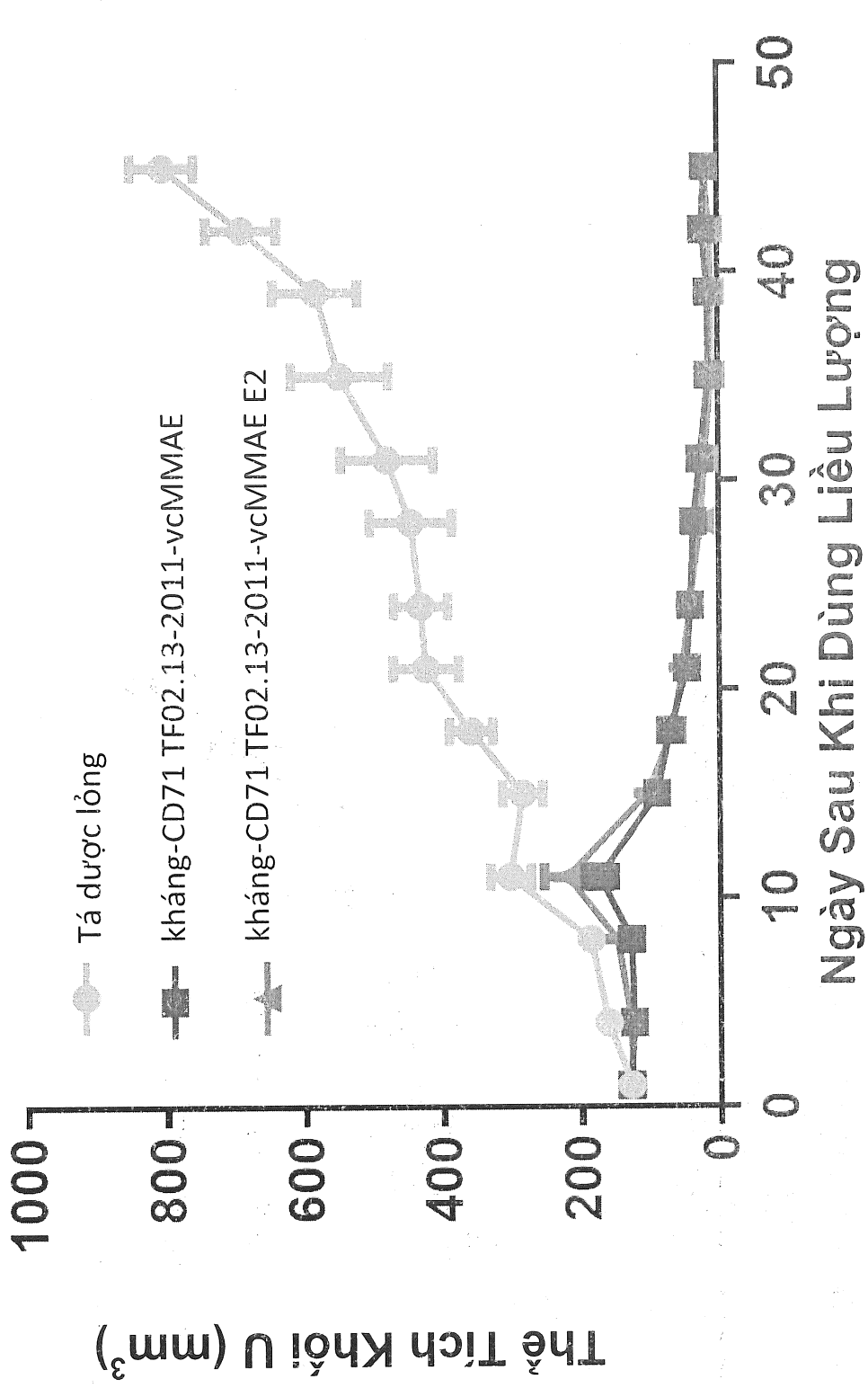

Mảnh ghép khác loài OV-90
Tá dược lỏng
kháng-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE
kháng-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2
Thể Tích Khối U (mm³)
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
Ngày Sau Khi Dùng Liều Lượng

Fig. 6C

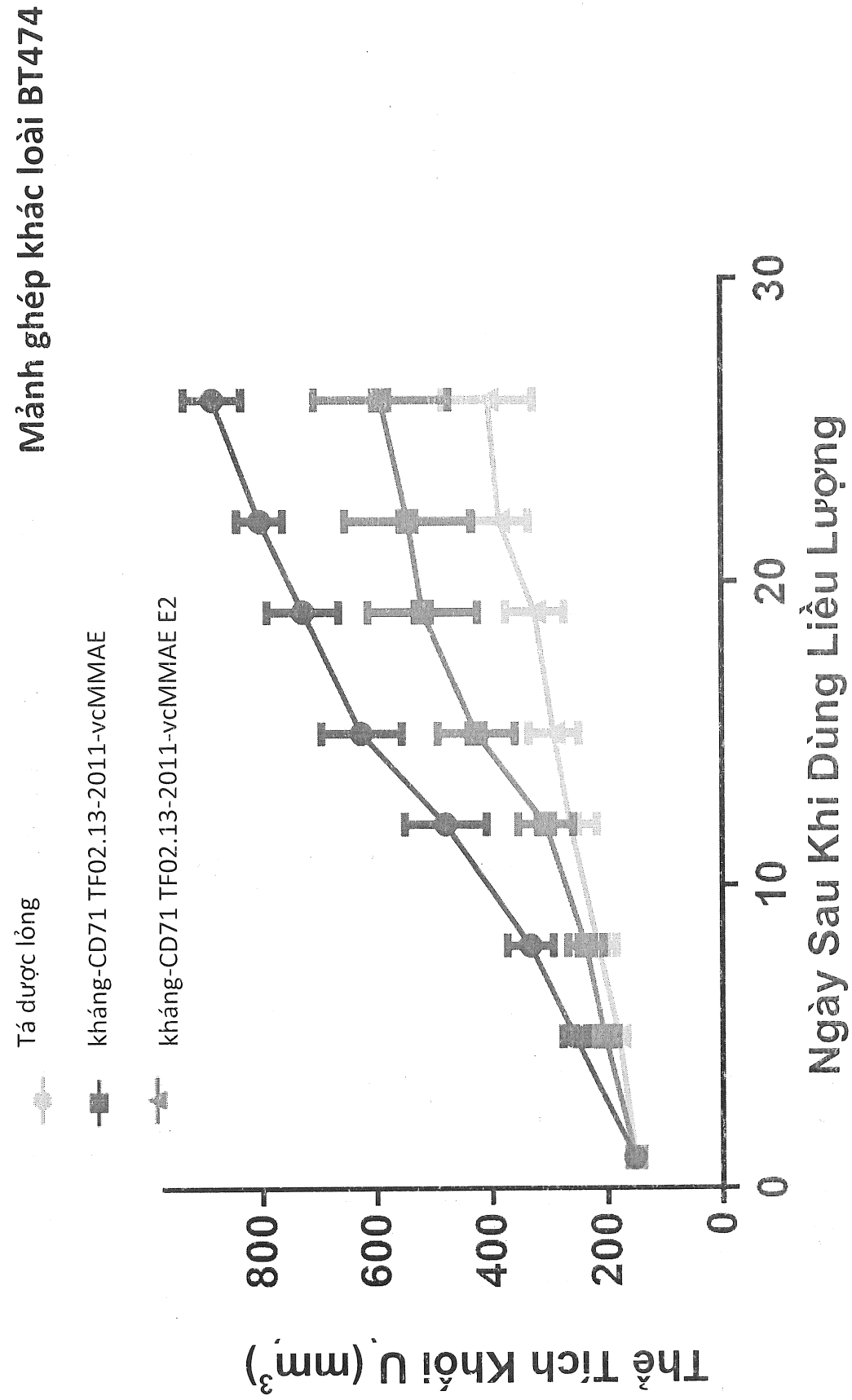

Mảnh ghép khác loài BT474
Tá dược lỏng
kháng-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE
kháng-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2
Thể Tích Khối U (mm³)
800
600
400
200
0
0
10
20
30
Ngày Sau Khi Dùng Liều Lượng

Fig. 6D

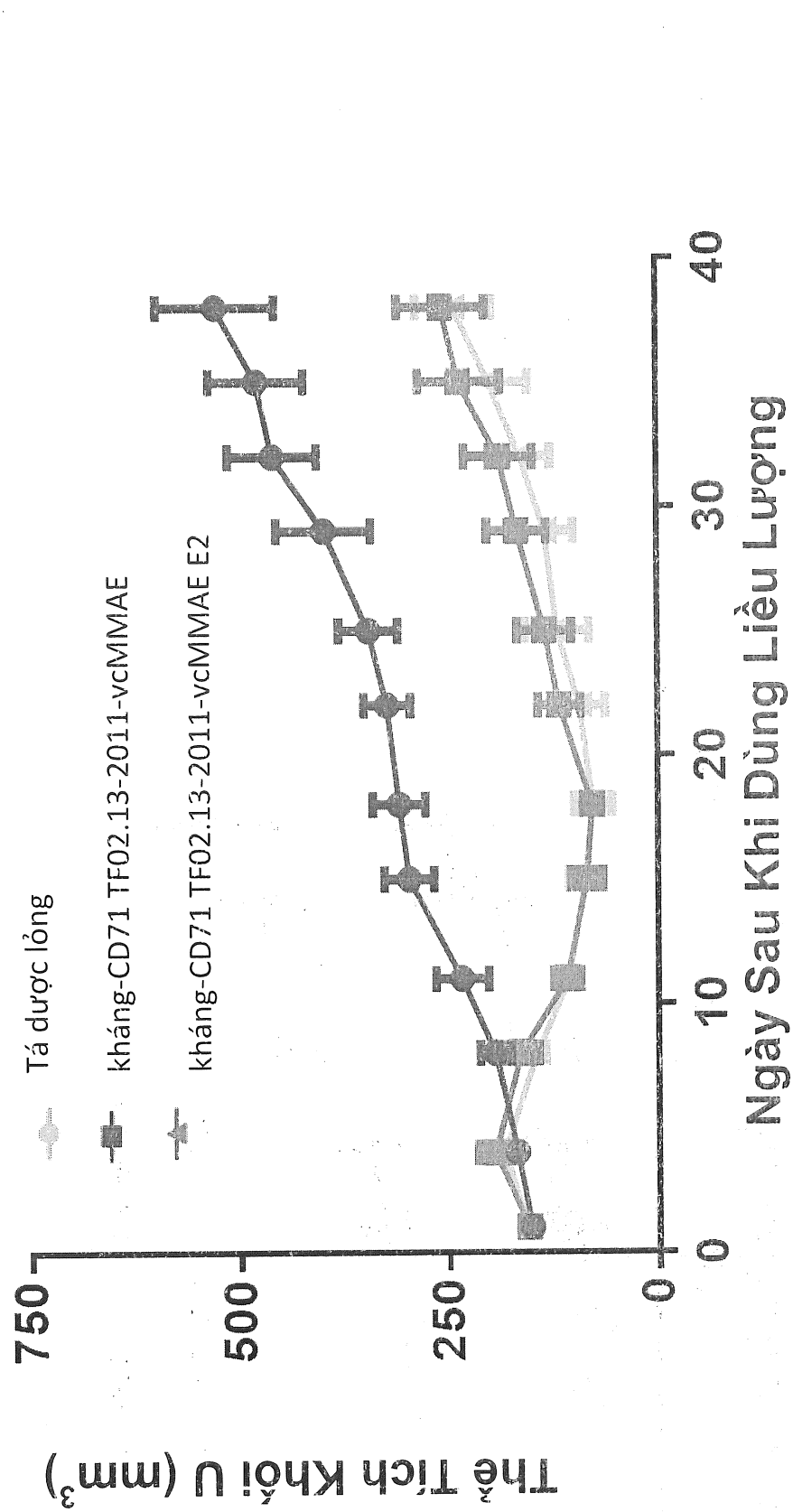

Mảnh ghép khác loài HCC-70
Tá dược lỏng
kháng-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE
kháng-CD71 TF02.13-2011-vcMMAE E2
Thể Tích Khối U (mm³)
750
500
250
0
0
10
20
30
40
Ngày Sau Khi Dừng Liều Lượng

Fig. 7A

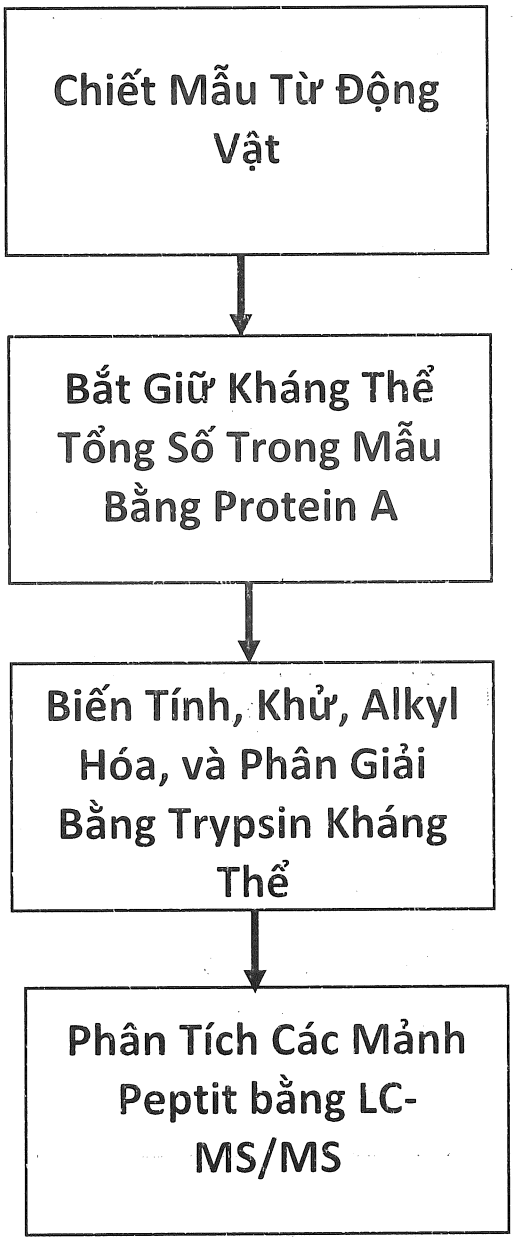

Chiết Mẫu Từ Động Vật
Bắt Giữ Kháng Thể Tổng Số Trong Mẫu Bằng Protein A
Biến Tính, Khử, Alkyl Hóa, và Phân Giải Bằng Trypsin Kháng Thể
Phân Tích Các Mảnh Peptit bằng LC-MS/MS

Fig. 7B

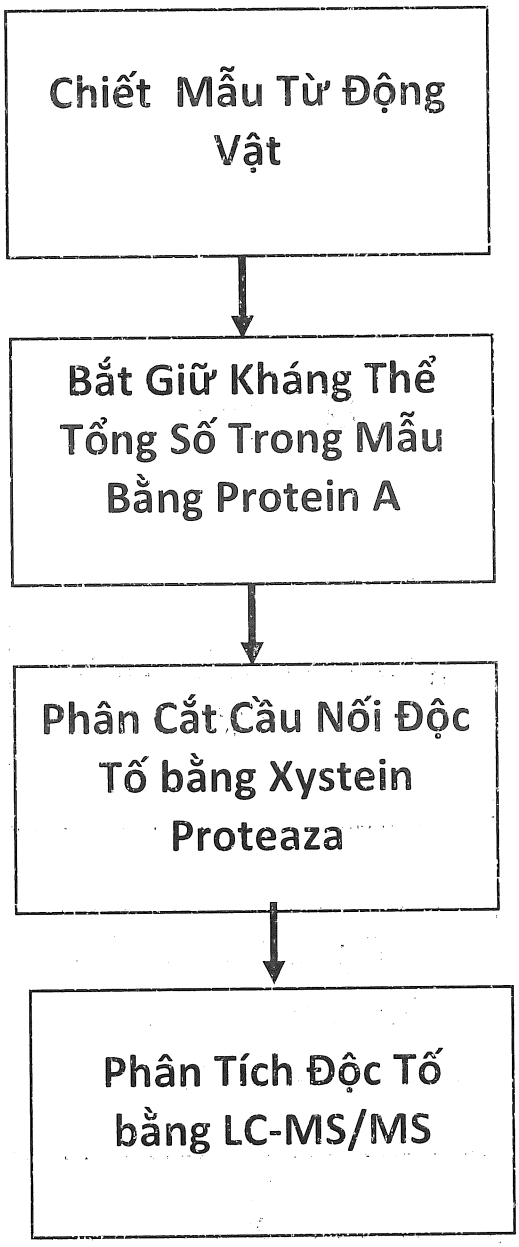

Chiết Mẫu Từ Động Vật
Bắt Giữ Kháng Thể Tổng Số Trong Mẫu Bằng Protein A
Phân Cắt Cầu Nối Độc Tố bằng Xystein Proteaza
Phân Tích Độc Tố bằng LC-MS/MS

Fig. 7C

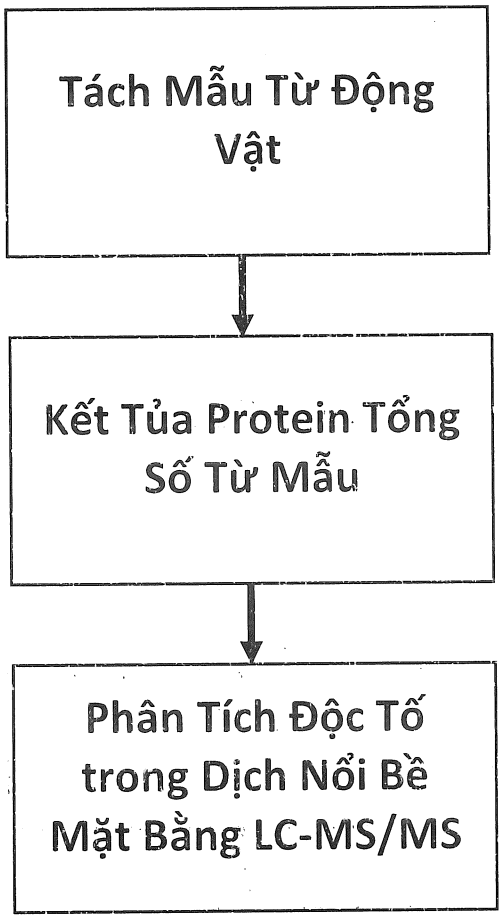

Tách Mẫu Từ Động Vật
Kết Tủa Protein Tổng Số Từ Mẫu
Phân Tích Độc Tố trong Dịch Nổi Bề Mặt Bằng LC-MS/MS

Fig. 8A

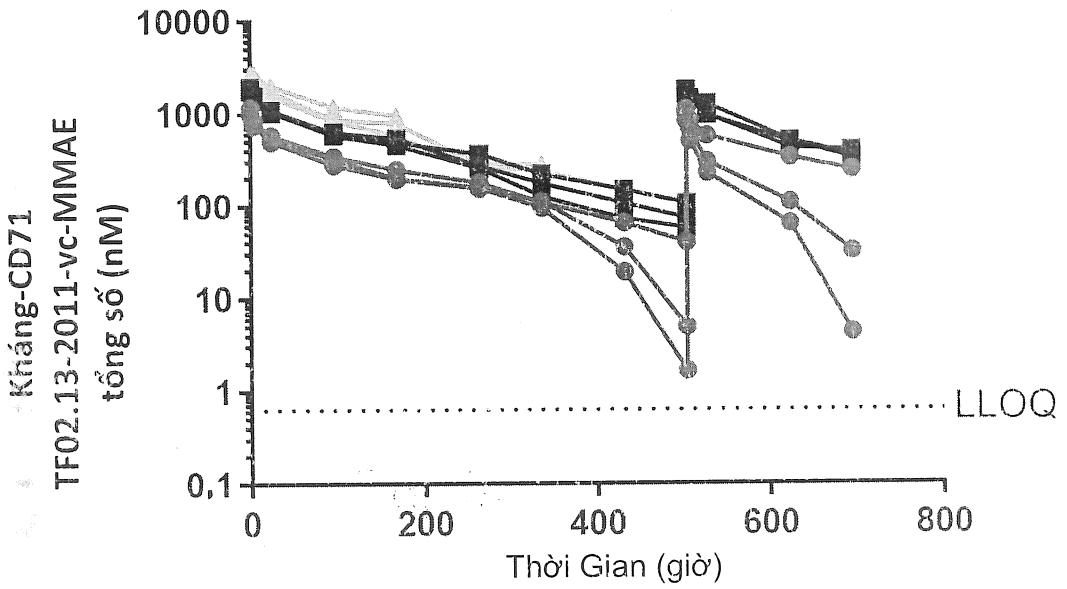

Kháng-CD71
TF02.13-2011-vc-MMAE
tổng số (nM)
10000
1000
100
10
1
0,1
LLOQ
0
200
400
600
800
Thời Gian (giờ)

Fig. 8B

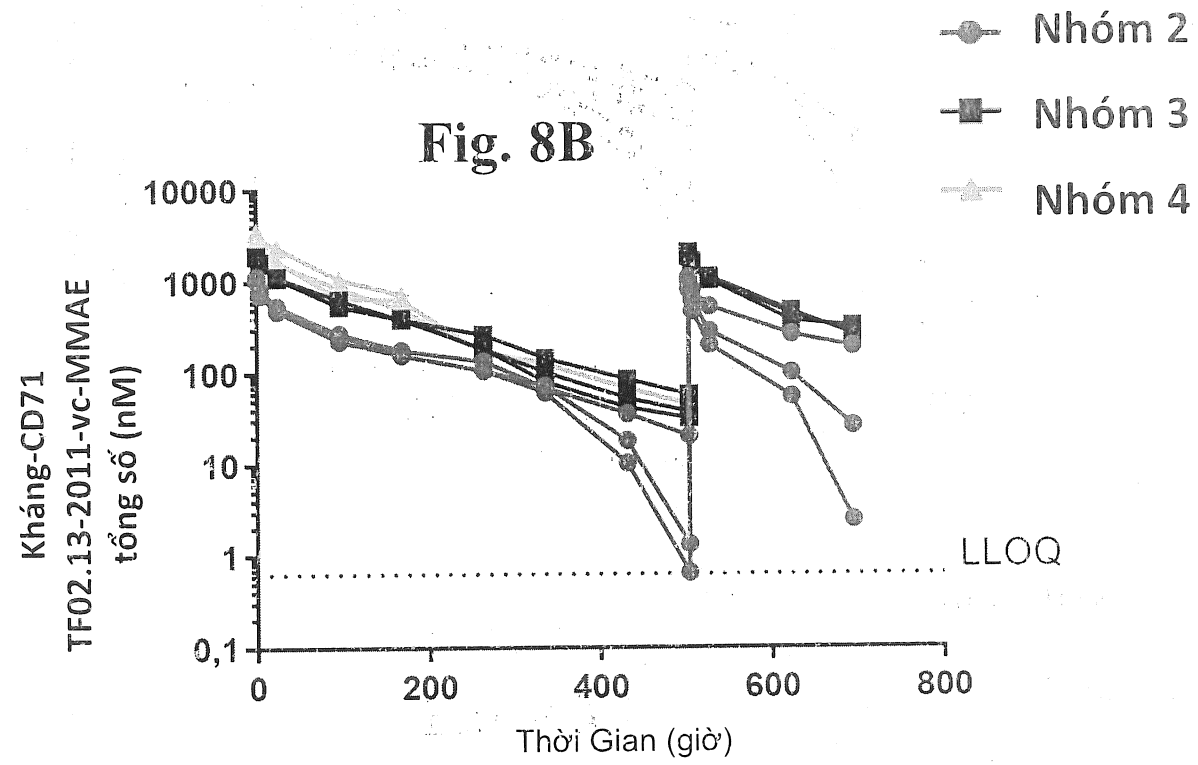

Nhóm 2
Nhóm 3
Nhóm 4
Kháng-CD71
TF02.13-2011-vc-MMAE
tổng số (nM)
10000
1000
100
10
1
0,1
LLOQ
0
200
400
600
800
Thời Gian (giờ)

Fig. 9A

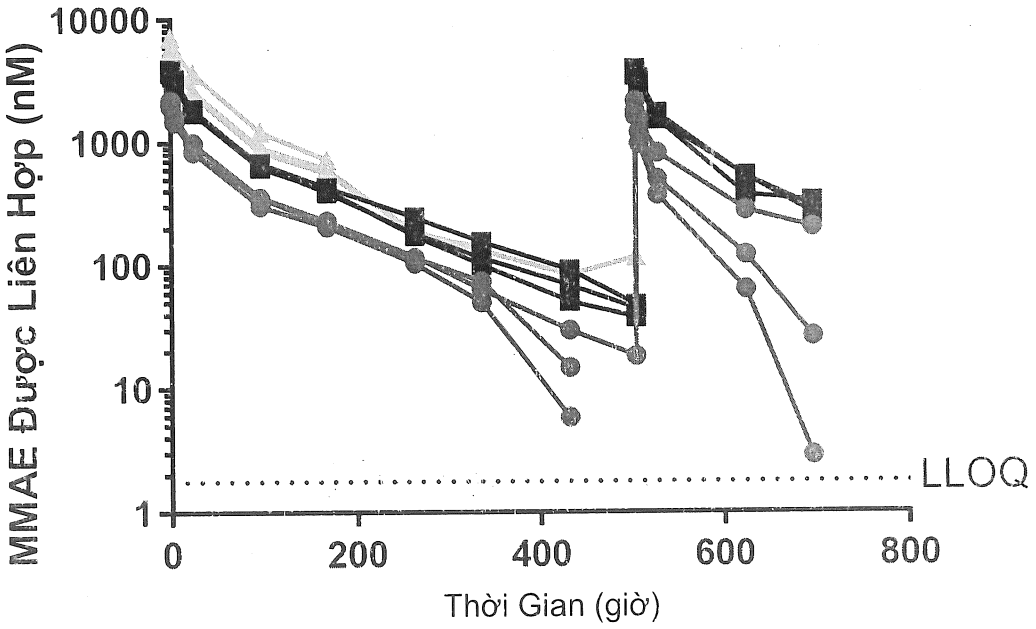

MMAE Được Liên Hợp (nM)
10000
1000
100
10
1
LLOQ
0
200
400
600
800
Thời Gian (giờ)

Fig. 9B

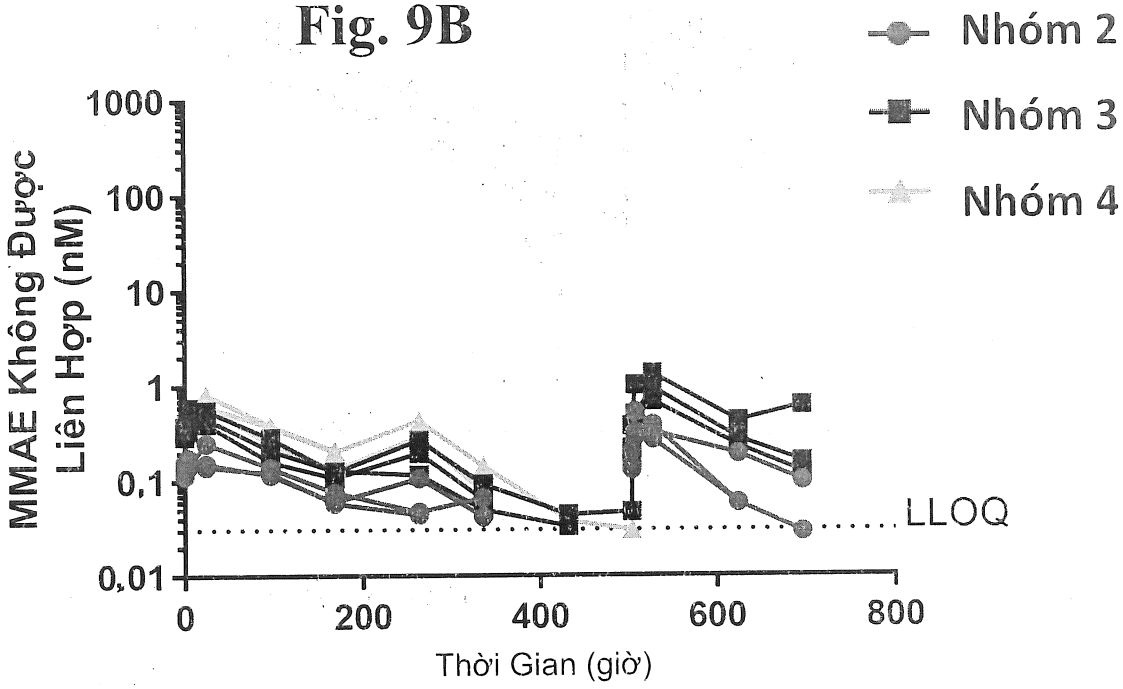

Nhóm 2
Nhóm 3
Nhóm 4
MMAE Không Được Liên Hợp (nM)
1000
100
10
1
0,1
0,01
LLOQ
0
200
400
600
800
Thời Gian (giờ)

Fig. 10

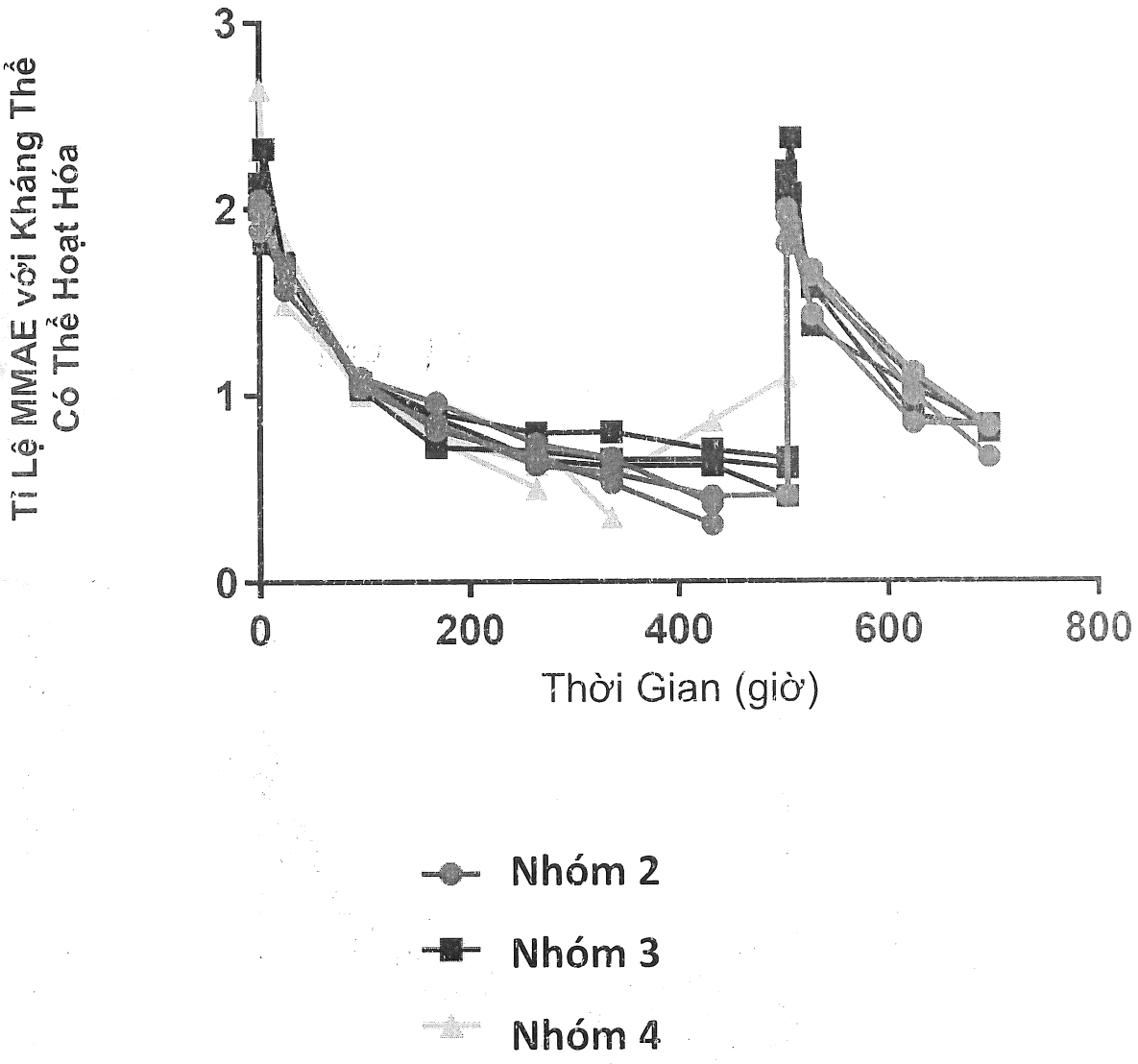

Tỉ Lệ MMAE với Kháng Thể Có Thể Hoạt Hóa
3
2
1
0
0
200
400
600
800
Thời Gian (giờ)
Nhóm 2
Nhóm 3
Nhóm 4

Fig. 11

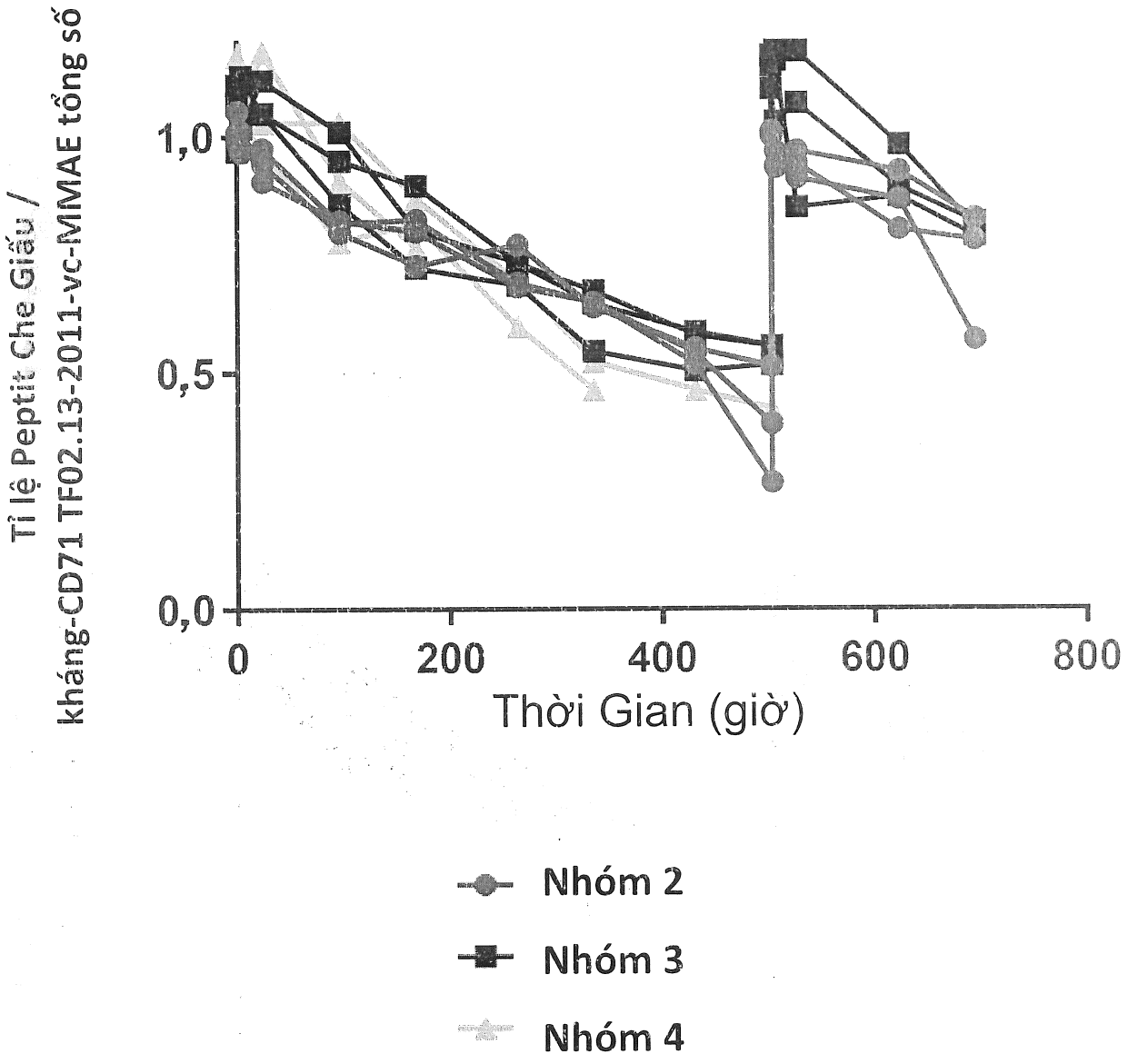

Tỉ lệ Peptit Che Giấu / kháng-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE tổng số
1,0
0,5
0,0
0
200
400
600
800
Thời Gian (giờ)
Nhóm 2
Nhóm 3
Nhóm 4

Fig. 12

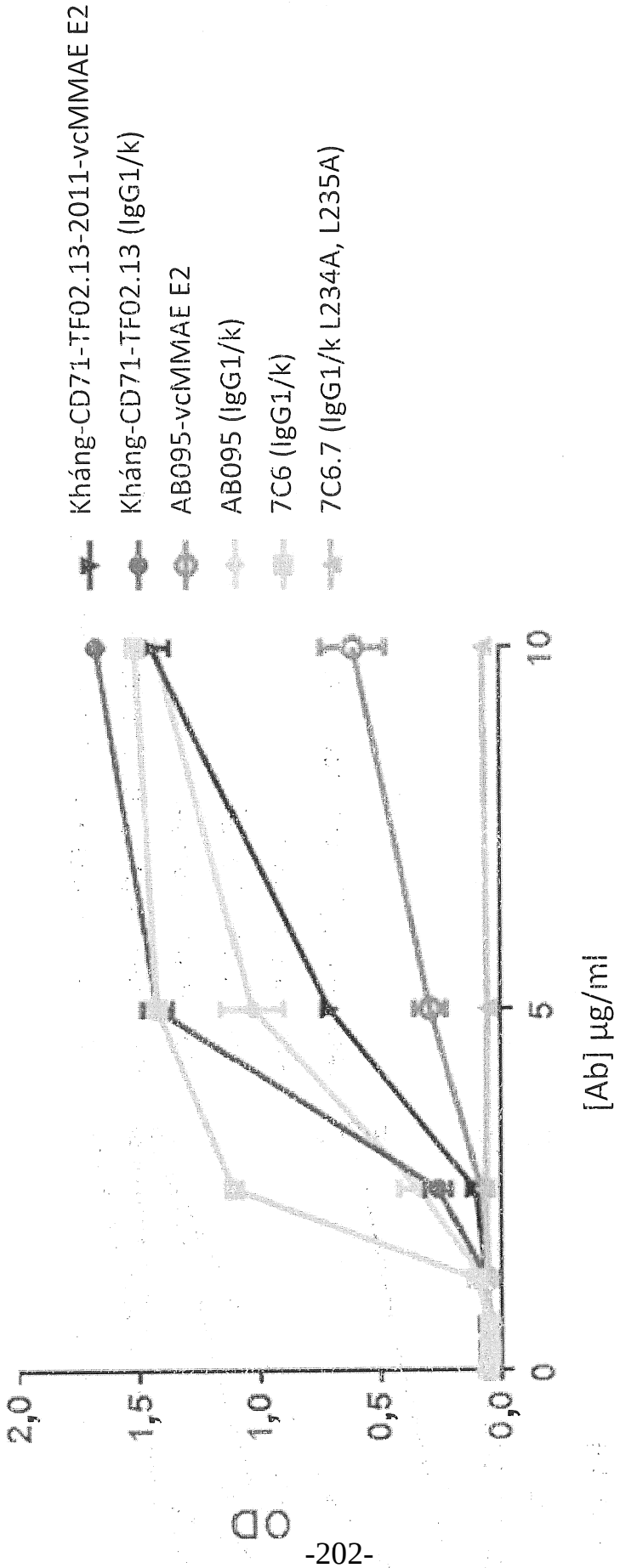

Kháng-CD71-TF02.13-2011-vcMMAE E2
Kháng-CD71-TF02.13 (IgG1/k)
AB095-vcMMAE E2
AB095 (IgG1/k)
7C6 (IgG1/k)
7C6.7 (IgG1/k L234A, L235A)
OD
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
5
10
[Ab] µg/ml

Fig. 13
CDX Chuột Nhắt SW-48

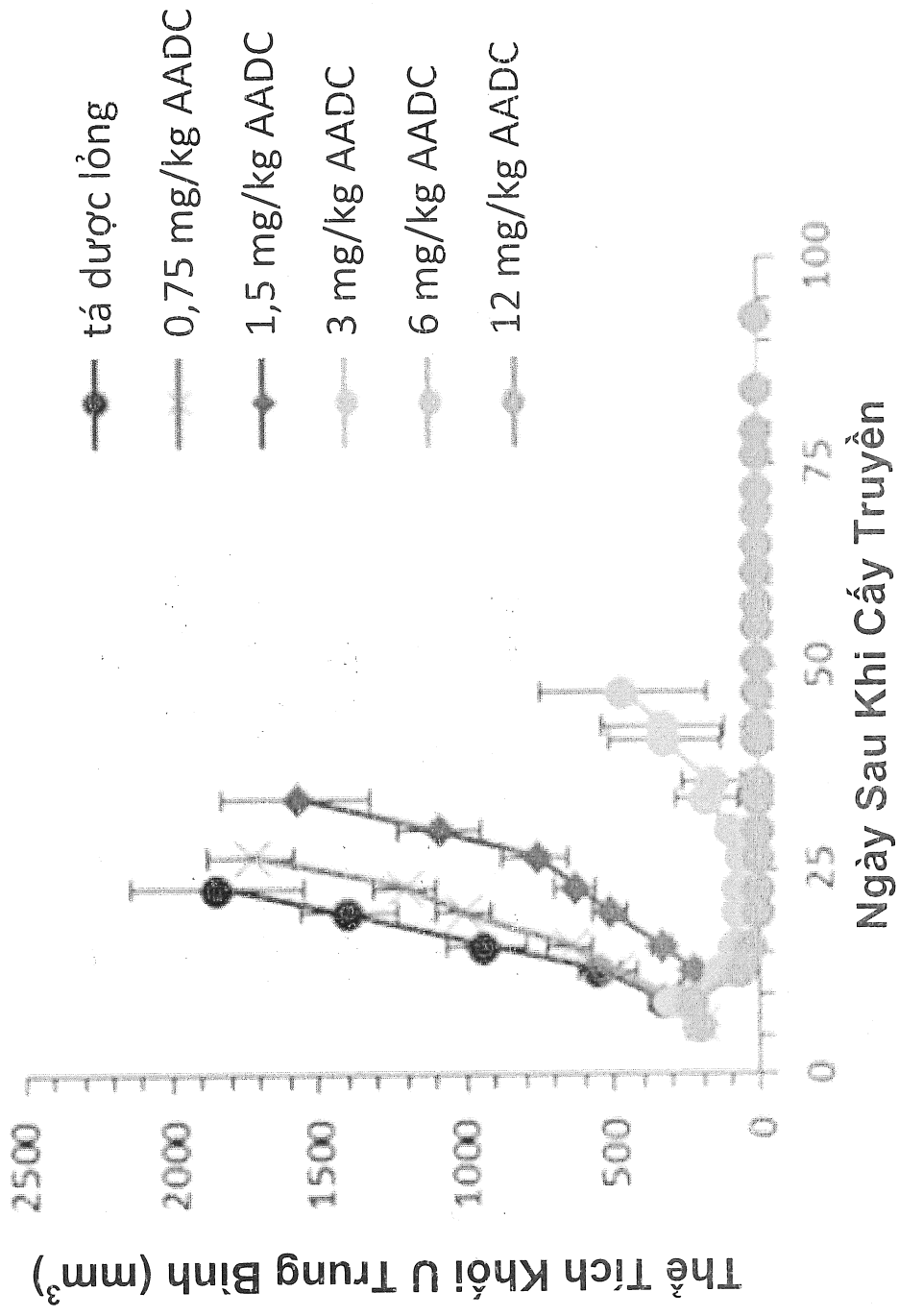


Fig. 14
PDX Chuột Nhắt DLBCL

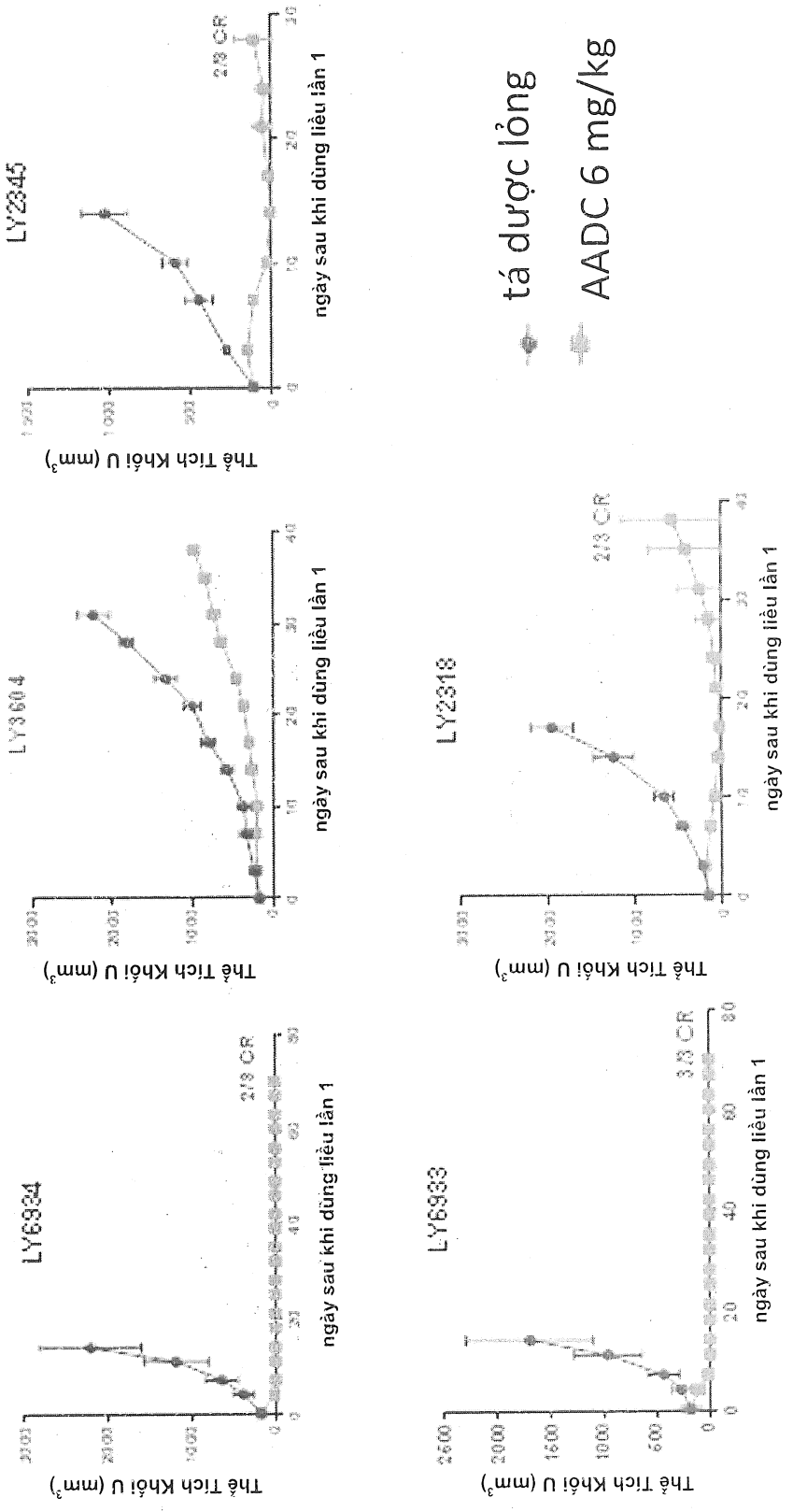
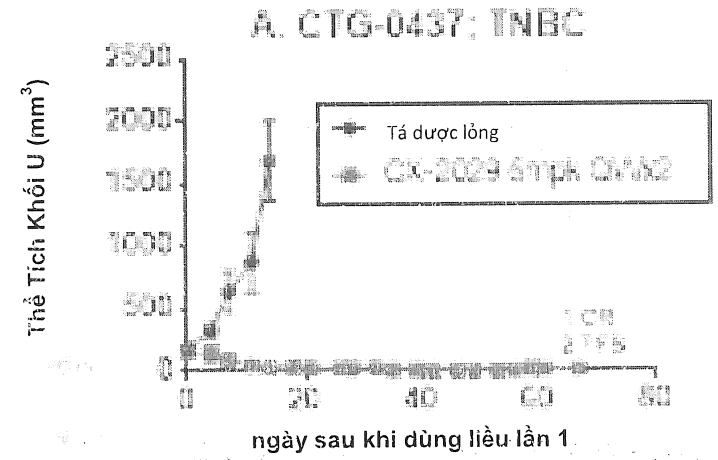
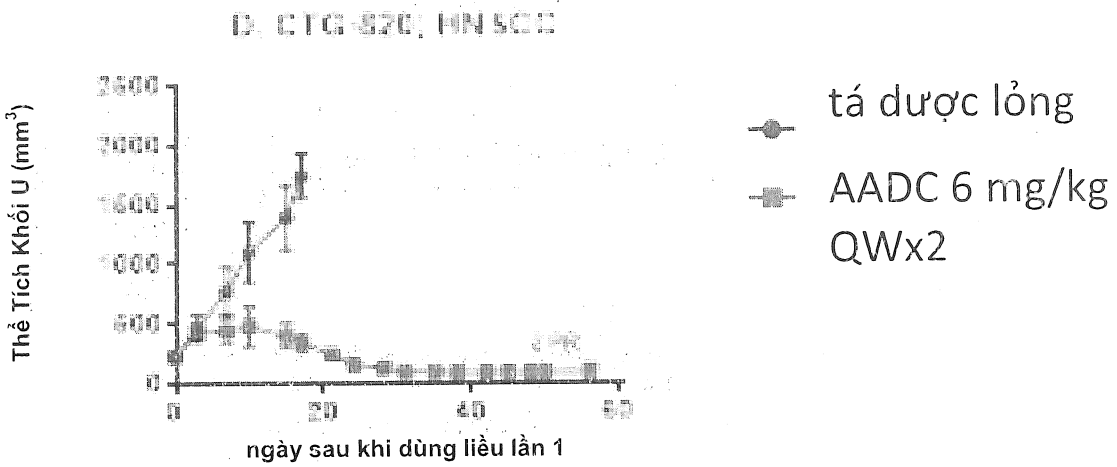


Fig. 15A: PDX Chuột Nhắt





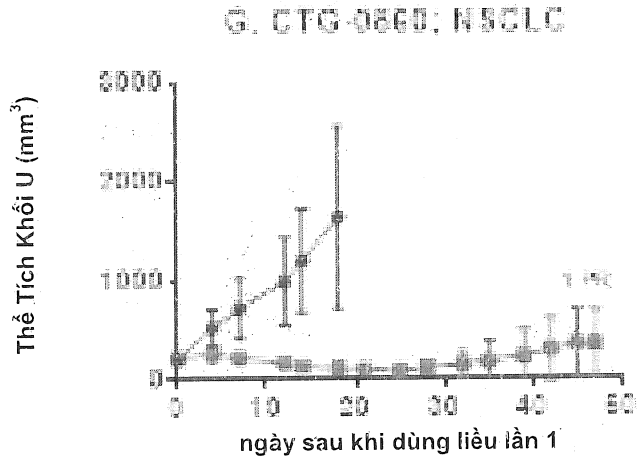


Fig. 15B: PDX Chuột Nhắt

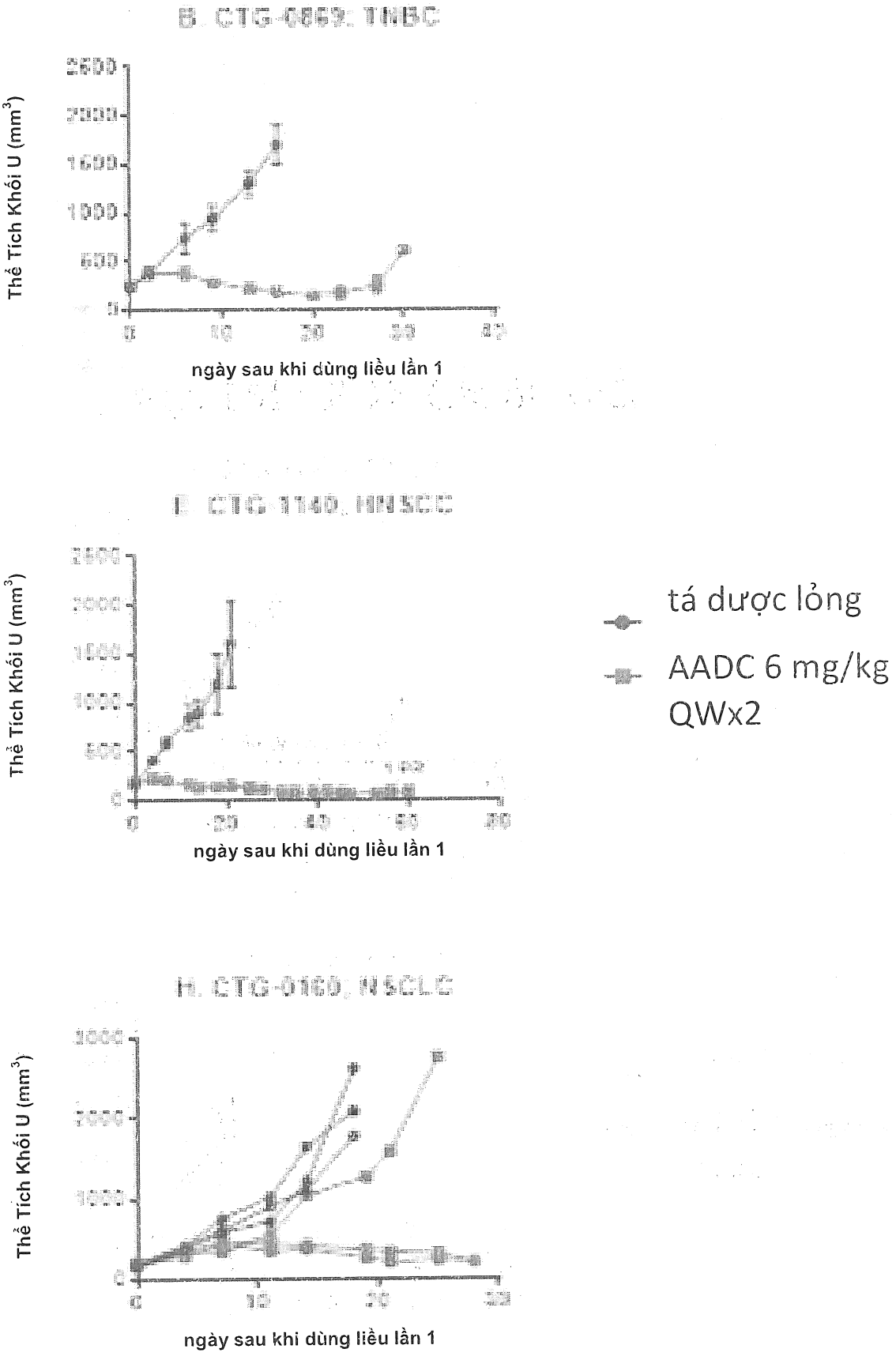
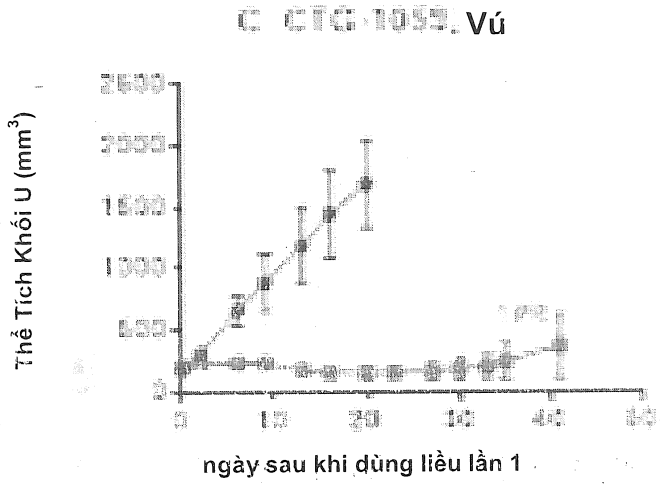
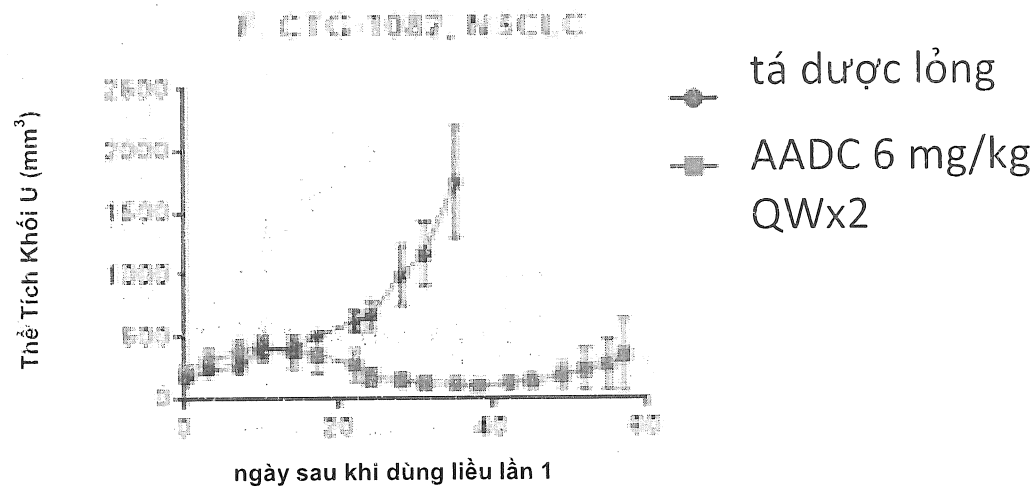


Fig. 15C: PDX Chuột Nhắt





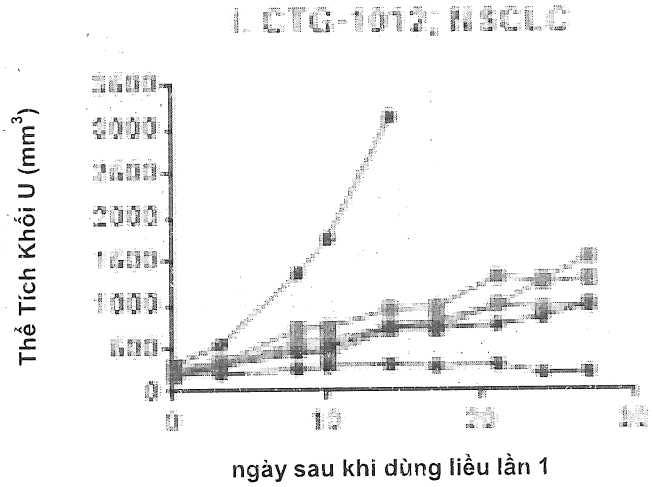


Fig. 16
PDX Tụy

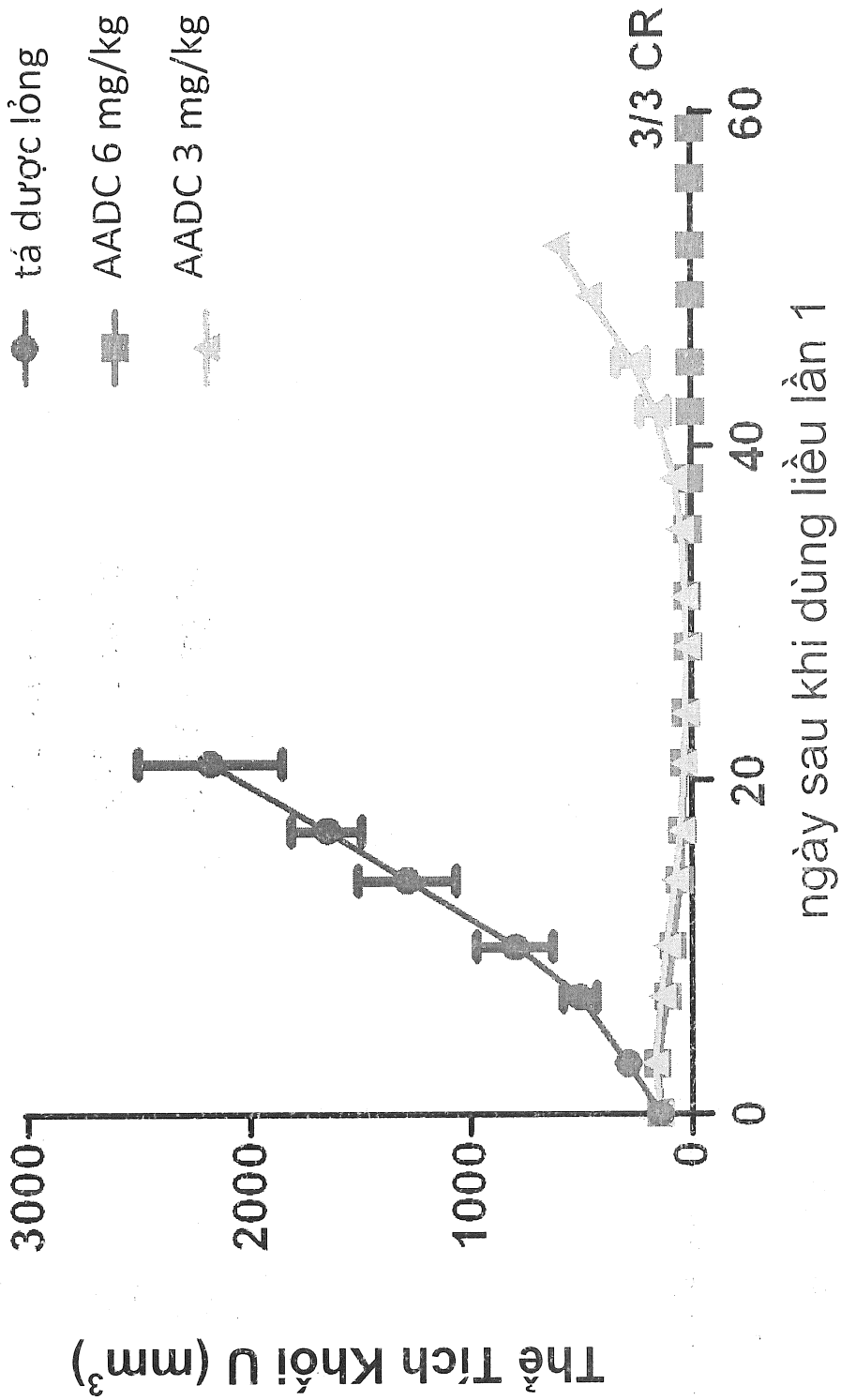


Fig. 17

Tóm Tắt Khả Năng Dung Chịu và Độ Ổn Định AADC và ADC Kháng-CD71 ở Khỉ Cynomolgous

Vật Phẩm Thử Nghiệm (Tỉ Lệ Thuốc-Protein (DAR))	Liều Lượng (mg/kg)	Giảm Khối Lượng Cơ Thể	Số Đếm Bạch Cầu Trung Tính Trung Bình ± SD (trên mỗi µl)	Độ Ổn Định Tương Đối của Kháng Thể Có Thể Hoạt Hóa Tuần Hoàn	Dấu Hiệu Lâm Sàng / Khả Năng Dung Chịu
Kháng-CD71 TF02.13-3011-vc-MMAE (~3)	6	~10%	98 ± 60	Thấp Hơn	Giảm bạch cầu trung tính nghiêm trọng, ngủ lịm, ăn mất ngon. Không dung chịu
Kháng-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE (~3)	6	~8%	290 ± 290	Cao Hơn	Không có. Được dung chịu
Kháng-CD71 TF02.13-2011-vc-MMAE E2 (~2)	12	0%	180 ± 210	Cao Hơn	Không có. Được dung chịu
Kháng-CD71-vc-MMAE E2 (~2)	2	~8%	70	N/A	Chết lúc ~ 1 tuần sau khi dùng liều lần 1

Fig. 18A

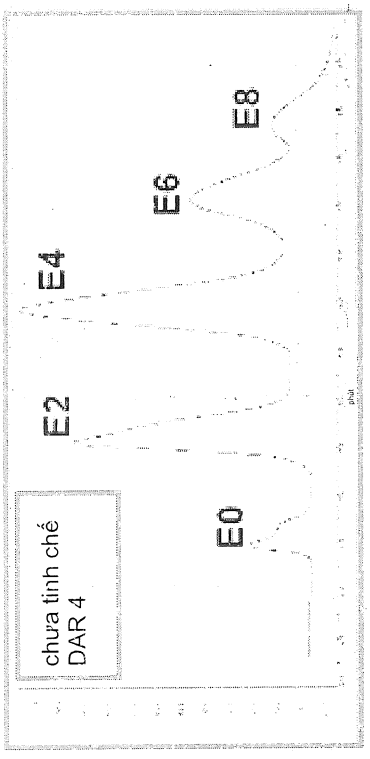


Fig. 18B

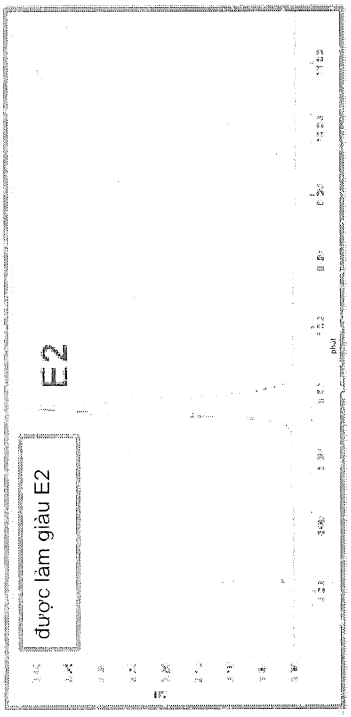
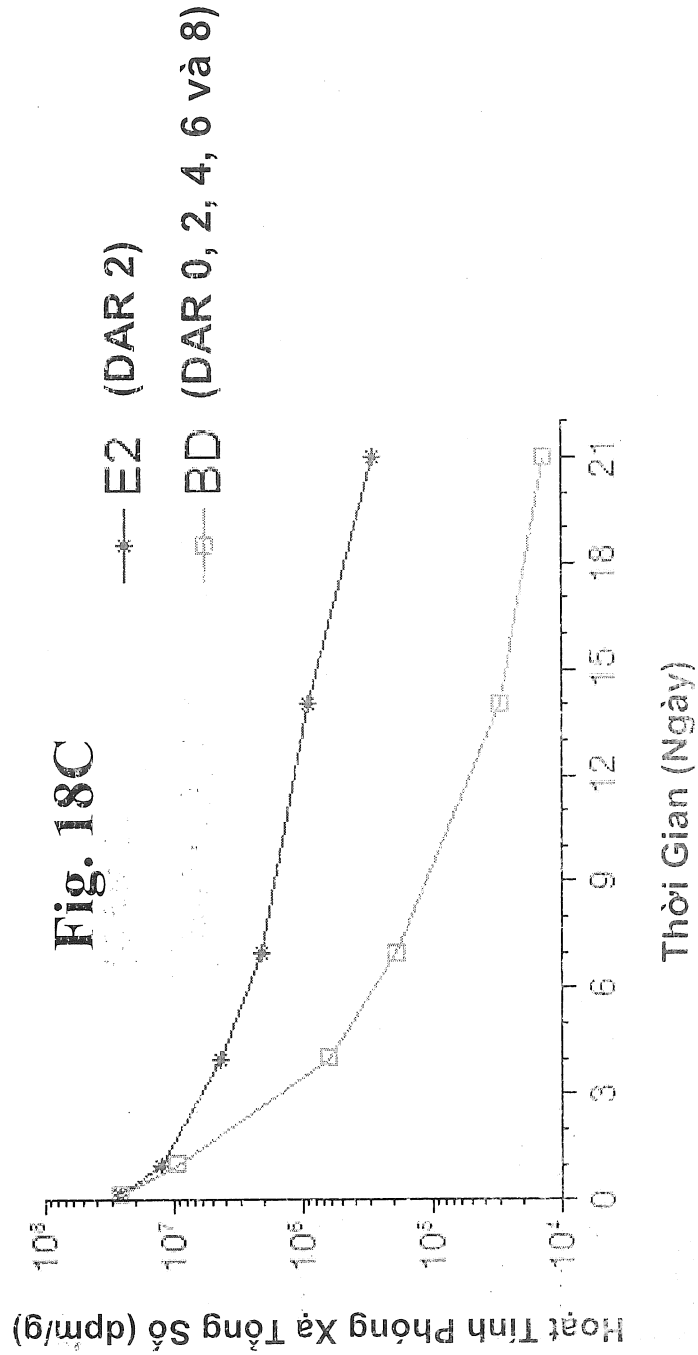


Fig. 18C



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AbbVie, Inc.
Singh, Shweta
Richardson, Jennifer Hope
Serwer, Laura Patterson
Terrett, Jonathan Alexander
Morgan-Lappe, Susan E.
Henriques, Tracy
Ralston, Sherry L.
Leanna, Marvin Robert
Badagnani, Ilaria
Bose, Sahana

<120> Kháng thể có hoạt tính được liên hợp

<130> CYTM-056/001US 322001-2522

<150> US 62/572,467
<151> 14/10/2017

<160> 208

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 1

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

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

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

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

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

Thr Arg Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Ile Thr Val Ser Ala
115

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 2

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 3

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 4

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

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

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

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

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr 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

Thr Arg Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 5

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

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

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

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

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr 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

Thr Arg Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Ile Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 6

1 5 10 15

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

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 7

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 7

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

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

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

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 9

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 10

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Glu Thr Gly
1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 11

Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe
1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 12

Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 13

<211> 11

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 13

Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 14

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 15

Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 16

Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu Ile Gly Asp Cys Asp Ile
1 5 10 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 17

Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Phe Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr
1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 18

Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr
1 5 10 15

<210> 19

<211> 213

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 19

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

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

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

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 20
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 20

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

20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr 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

Thr Arg Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

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

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

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

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

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

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

<211> 1344

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 21

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaagatg 60

tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatcggcgcc atctaccccg gcaactccga gacaggctac 180

gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgccgaca cctccacctc caccgcctac 240

atggaactgt ccagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcac cagagagaac 300

tgggaccccg gcttcgcctt ctggggccag ggcaccctga tcaccgtgtc ctccgccagc 360

accaagggcc cctccgtgtt ccctctggcc ccttccagca agtccacctc tggcggcaca 420

gctgccctgg gctgcctggt gaaagactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480

tctggcgccc tgaccagcgg agtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg 540

tgcaacgtga accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaggtgga acccaagtcc 660

tgcgacaaga cccacacctg tcctccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccttcc 720

gtgtttctgt tccccccaaa gcccaaggac accctgatga tctcccggac ccccgaagtg 780

acctgcgtgg tggtggacgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg 840

gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagta caactccacc 900

taccgggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagagtac 960

aagtgcaagg tgtccaacaa ggccctgcct gcccccatcg aaaagaccat ctccaaggcc 1020

aagggccagc cccgcgagcc ccaggtgtac acactgccac ctagccggga agagatgacc 1080

aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aaaggcttct acccctccga tatcgccgtg 1140

gaatgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccacc tgtgctggac 1200

tccgacggct cattcttcct gtactccaag ctgaccgtgg acaagtcccg gtggcagcag 1260

ggcaacgtgt tctcctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1320

tccctgtccc tgagcccccgg caag 1344

<210> 22

<211> 260

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 22

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu
1 5 10 15

Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp
35 40 45

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
50 55 60

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr
65 70 75 80

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser
85 90 95

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
100 105 110

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp
115 120 125

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe
130 135 140

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
145 150 155 160

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
165 170 175

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
180 185 190

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
195 200 205

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
210 215 220

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
225 230 235 240

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
245 250 255

Arg Gly Glu Cys
260

<210> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 23

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala
1 5 10 15

Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp
35 40 45

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
50 55 60

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr
65 70 75 80

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser
85 90 95

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
100 105 110

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp
115 120 125

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe
130 135 140

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
145 150 155 160

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
165 170 175

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
195 200 205

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
210 215 220

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
225 230 235 240

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
245 250 255

Arg Gly Glu Cys
260

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 24

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 25

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 26

<211> 4

<212> PRT

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 26

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 27

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 28

<211> 5

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 28

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 29

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 30

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 31

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 32

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

1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 33

Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 34

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

1 5 10

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 35

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

1 5 10 15

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 36

Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 37

Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser

<210> 38

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 38

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 39

1 5

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 40

Gly Ser Ser Gly

1

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 41

Thr Gly Arg Gly Pro Ser Trp Val

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 42

Ser Ala Arg Gly Pro Ser Arg Trp

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

Thr Ala Arg Gly Pro Ser Phe Lys
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 44

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His
1 5

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 45

Gly Gly Trp His Thr Gly Arg Asn
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 46

His Thr Gly Arg Ser Gly Ala Leu
1 5

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<400> 47

Pro Leu Thr Gly Arg Ser Gly Gly
1 5

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 48

Ala Ala Arg Gly Pro Ala Ile His
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<223> Tổng hợp

<400> 49

Arg Gly Pro Ala Phe Asn Pro Met
1 5

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 50

Ser Ser Arg Gly Pro Ala Tyr Leu
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 51

Arg Gly Pro Ala Thr Pro Ile Met
1 5

<210> 52

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 52

Arg Gly Pro Ala
1

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 53

Gly Gly Gln Pro Ser Gly Met Trp Gly Trp
1 5 10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 54

Phe Pro Arg Pro Leu Gly Ile Thr Gly Leu
1 5 10

<210> 55

<211> 10

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 55

Val His Met Pro Leu Gly Phe Leu Gly Pro

1 5 10

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 56

Ser Pro Leu Thr Gly Arg Ser Gly

1 5

<210> 57

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 57

Ser Ala Gly Phe Ser Leu Pro Ala

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 58

Leu Ala Pro Leu Gly Leu Gln Arg Arg

1 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 59

Ser Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg
1 5

<210> 60

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 60

Pro Leu Gly Leu
1

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 61

Ile Ser Ser Gly Leu Ser Ser

1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 62

Gln Asn Gln Ala Leu Arg Met Ala

1 5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 63

Ala Gln Asn Leu Leu Gly Met Val

1 5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 64

Ser Thr Phe Pro Phe Gly Met Phe

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 65

Pro Val Gly Tyr Thr Ser Ser Leu
1 5

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 66

1 5

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 67

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Ser

1 5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 68

Leu Lys Ala Ala Pro Arg Trp Ala

1 5

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 69

Gly Pro Ser His Leu Val Leu Thr

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

Leu Pro Gly Gly Leu Ser Pro Trp
1 5

<210> 71
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 71

Met Gly Leu Phe Ser Glu Ala Gly
1 5

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 72

Ser Pro Leu Pro Leu Arg Val Pro
1 5

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 73

Arg Met His Leu Arg Ser Leu Gly
1 5

<210> 74
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<400> 74

Leu Ala Ala Pro Leu Gly Leu Leu
1 5

<210> 75
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 75

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro
1 5

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<223> Tổng hợp

<400> 76

Leu Leu Ala Pro Ser His Arg Ala
1 5

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 77

Pro Ala Gly Leu Trp Leu Asp Pro
1 5

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 78

Gly Pro Arg Ser Phe Gly Leu
1 5

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 79

Gly Pro Arg Ser Phe Gly
1 5

<210> 80

<211> 12

<212> PRT

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 80

Asn Thr Leu Ser Gly Arg Ser Glu Asn His Ser Gly
1 5 10

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 81

Asn Thr Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn His Gly Ser
1 5 10

<210> 82

<211> 12

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 82

Thr Ser Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly
1 5 10

<210> 83

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 83

Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro
1 5

<210> 84

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 84

Val Ala Gly Arg Ser Met Arg Pro
1 5

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 85

Val Val Pro Glu Gly Arg Arg Ser
1 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 86

Ile Leu Pro Arg Ser Pro Ala Phe
1 5

<210> 87

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 87

Met Val Leu Gly Arg Ser Leu Leu
1 5

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 88

Gln Gly Arg Ala Ile Thr Phe Ile
1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 89

Ser Pro Arg Ser Ile Met Leu Ala
1 5

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 90

Ser Met Leu Arg Ser Met Pro Leu
1 5

<210> 91

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 91

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His

<210> 92

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 92

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Arg Ser Asp Asn His
20

<210> 93

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<400> 93

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

Ser Ala Asn Pro Arg Gly
20

<210> 94
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 94

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

Gly Leu Leu Ala Pro Pro

<210> 95

<211> 24

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 95

Val His Met Pro Leu Gly Phe Leu Gly Pro Gly Gly Thr Ser Thr Ser
1 5 10 15

Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly
20

<210> 96

<211> 24

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<400> 96

Thr Ser Thr Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly Gly Gly Val His
1 5 10 15

Met Pro Leu Gly Phe Leu Gly Pro
20

<210> 97
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 97

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp
1 5 10 15

Asn His

<210> 98

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 98

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Ala Val Gly Leu Leu Ala
1 5 10 15

Pro Pro

<210> 99

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<400> 99

Val His Met Pro Leu Gly Phe Leu Gly Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg
1 5 10 15

Ser Asp Asn His
20

<210> 100
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 100

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Val His Met Pro Leu Gly
1 5 10 15

Phe Leu Gly Pro

<210> 101

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 101

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ile Ser
1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Ser Ser
20

<210> 102

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<400> 102

Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn His Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ile Ser
1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Ser Ser
20

<210> 103
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 103

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Arg Ser Gly Asn His

<210> 104

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 104

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Asn
1 5 10 15

Gln Ala Leu Arg Met Ala
20

<210> 105

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<400> 105

Gln Asn Gln Ala Leu Arg Met Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Arg Ser Asp Asn His
20

<210> 106
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 106

Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn His Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Asn
1 5 10 15

Gln Ala Leu Arg Met Ala

<210> 107

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 107

Gln Asn Gln Ala Leu Arg Met Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Arg Ser Gly Asn His
20

<210> 108

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<400> 108

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn His
1 5 10

<210> 109
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 109

Gln Gly Gln Ser Gly Gln
1 5

<210> 110
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<223> Tổng hợp

<400> 110

Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly
1 5

<210> 111
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 111

Pro Arg Phe Arg Ile Ile Gly Gly
1 5

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 112

Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp
1 5

<210> 113

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 113

Arg Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu
1 5 10

<210> 114

<211> 15

<212> PRT

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 114

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Ala
1 5 10 15

<210> 115

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 115

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Arg Gly Asp Asp Ala
1 5 10 15

<210> 116

<211> 4

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 116

Ile Glu Gly Arg

1

<210> 117

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 117

Ile Asp Gly Arg

1

<210> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 118

Gly Gly Ser Ile Asp Gly Arg

1 5

<210> 119

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 119

Pro Leu Gly Leu Trp Ala

1 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 120

Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln
1 5

<210> 121

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 121

Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala
1 5

<210> 122

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 122

Gly Ile Ala Gly Gln

1 5

<210> 123

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 123

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile

1 5

<210> 124

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 124

Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly

1 5

<210> 125

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 125

Tyr Gly Ala Gly Leu Gly Val Val

<210> 126

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 126

Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Arg

1 5

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 127

1 5

<210> 128

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 128

Glu Pro Gln Ala Leu Ala Met Ser

1 5

<210> 129

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 129

Gln Ala Leu Ala Met Ser Ala Ile

1 5

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 130

Ala Ala Tyr His Leu Val Ser Gln

1 5

<210> 131

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

Met Asp Ala Phe Leu Glu Ser Ser
1 5

<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 132

Glu Ser Leu Pro Val Val Ala Val
1 5

<210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 133

Ser Ala Pro Ala Val Glu Ser Glu
1 5

<210> 134
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 134

Asp Val Ala Gln Phe Val Leu Thr
1 5

<210> 135
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<400> 135

Val Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu
1 5

<210> 136
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 136

Ala Gln Phe Val Leu Thr Glu Gly
1 5

<210> 137
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<223> Tổng hợp

<400> 137

Pro Val Gln Pro Ile Gly Pro Gln
1 5

<210> 138
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 138

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly
1 5

<210> 139
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 139

Gln Gly Gln Ser Gly
1 5

<210> 140

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 140

Gln Gly Gln Ser
1

<210> 141

<211> 253

<212> PRT

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 141

Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg
20 25 30

Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
35 40 45

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser
50 55 60

Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

85 90 95

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
100 105 110

Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
115 120 125

Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
130 135 140

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
145 150 155 160

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

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
180 185 190

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
195 200 205

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
210 215 220

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
225 230 235 240

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
245 250

<210> 142
<211> 253
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 142

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg
20 25 30

Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
35 40 45

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser
50 55 60

Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
85 90 95

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
100 105 110

Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
115 120 125

Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
130 135 140

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
145 150 155 160

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

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
180 185 190

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
195 200 205

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
210 215 220

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
225 230 235 240

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
245 250

<210> 143
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 143

Gly Gln Ser Gly Gln Gly
1 5

<210> 144
<211> 5
<212> PRT

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 144

Gln Ser Gly Gln Gly
1 5

<210> 145

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 145

Ser Gly Gln Gly
1

<210> 146

<211> 257

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 146

Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly
20 25 30

Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
35 40 45

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

Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln
65 70 75 80

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn
85 90 95

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
115 120 125

Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
130 135 140

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
145 150 155 160

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
165 170 175

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
180 185 190

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
195 200 205

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
210 215 220

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
225 230 235 240

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
245 250 255

Cys

<210> 147
<211> 264
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<223> Tổng hợp

<400> 147

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala
1 5 10 15

Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val
20 25 30

Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro
35 40 45

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
50 55 60

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

Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
85 90 95

Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
100 105 110

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met
115 120 125

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr
130 135 140

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
145 150 155 160

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
165 170 175

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
180 185 190

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
210 215 220

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
225 230 235 240

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
245 250 255

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
260

<210> 148
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly
1 5 10 15

<210> 149
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 149

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

Arg Gly

<210> 150
<211> 17
<212> PRT

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 150

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 151

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 151

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asp His
1 5 10

<210> 152

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 152

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Ile His
1 5 10

<210> 153

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 153

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Gln His

<210> 154

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 154

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Thr His
1 5 10

<210> 155

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 155

1 5 10

<210> 156

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 156

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro

1 5 10

<210> 157

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 157

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro
1 5 10

<210> 158
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 158

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Ile
1 5 10

<210> 159
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp
1 5 10 15

Asp His

<210> 160
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 160

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp
1 5 10 15

Ile His

<210> 161

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 161

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp
1 5 10 15

Gln His

<210> 162

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp
1 5 10 15

Thr His

<210> 163
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 163

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp
1 5 10 15

Tyr His

<210> 164

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 164

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp
1 5 10 15

Asn Pro

<210> 165

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Ala
1 5 10 15

Asn Pro

<210> 166
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 166

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Ala
1 5 10 15

Asn Ile

<210> 167

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 167

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

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

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

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

65 70 75 80

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

Thr Arg Glu Asn Trp Asp Pro Gly Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

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

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

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

<210> 168
<211> 1341
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 168
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaagatg 60

tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatcggcgcc atctaccccg gcaactccga gacaggctac 180

gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgccgaca cctccacctc caccgcctac 240

atggaactgt ccagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcac cagagagaac 300

tgggaccccg gcttcgcctt ctggggccag ggcaccctga tcaccgtgtc ctccgccagc 360

accaagggcc cctccgtgtt ccctctggcc ccttccagca agtccacctc tggcggcaca 420

gctgccctgg gctgcctggt gaaagactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480

tctggcgccc tgaccagcgg agtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc ctccggcctg 540

tactccctgt cctccgtggt gacagtgccc tcctccagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc ctccaacacc aaggtggaca agaaggtgga acccaagtcc 660

tgcgacaaga cccacacctg tcctccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccttcc 720

gtgtttctgt tccccccaaa gcccaaggac accctgatga tctcccggac ccccgaagtg 780

acctgcgtgg tggtggacgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg 840

gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagta caactccacc 900

aagtgcaagg tgtccaacaa ggccctgcct gccccccatcg aaaagaccat ctccaaggcc 1020

aagggccagc cccgcgagcc ccaggtgtac acactgccac ctagccggga agagatgacc 1080

aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aaaggcttct accccteega tatcgccgtg 1140

gaatgggaga gcaacggcca gccegagaac aactacaaga ccacccccacc tgtgctggac 1200

tccgacggct cattcttcct gtactccaag ctgaccgtgg acaagtcccg gtggcagcag 1260

ggcaacgtgt tctcctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1320

tccctgtccc tgagcccccgg c 1341

<210> 169

<211> 253

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 169

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg
20 25 30

Ser Asp Asn Pro Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
35 40 45

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser
50 55 60

Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
85 90 95

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
100 105 110

Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
115 120 125

Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
130 135 140

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
145 150 155 160

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

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
180 185 190

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
195 200 205

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
210 215 220

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
225 230 235 240

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
245 250

<210> 170
<211> 260
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 170

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala
1 5 10 15

Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro Gly Gly Gly Ser Asp
35 40 45

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
50 55 60

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr
65 70 75 80

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser
85 90 95

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
100 105 110

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp
115 120 125

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe
130 135 140

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
145 150 155 160

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
165 170 175

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
180 185 190

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
195 200 205

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
210 215 220

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
225 230 235 240

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn

Arg Gly Glu Cys
260

<210> 171
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 171

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Ile
1 5 10

<210> 172
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<400> 172

Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp
1 5 10 15

Asn Ile

<210> 173
<211> 257
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 173

Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly

Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
35 40 45

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

Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln
65 70 75 80

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn
85 90 95

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
115 120 125

130 135 140

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
145 150 155 160

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
165 170 175

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Giu Ala Lys Val Gln Trp Lys
180 185 190

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
195 200 205

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
210 215 220

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
225 230 235 240

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
245 250 255

Cys

<210> 174
<211> 264
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 174

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu
1 5 10 15

Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val
20 25 30

35 40 45

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
50 55 60

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

Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
85 90 95

Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
100 105 110

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met
115 120 125

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr
130 135 140

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
145 150 155 160

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
165 170 175

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
180 185 190

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
195 200 205

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
210 215 220

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
225 230 235 240

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
245 250 255

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
260

<210> 175
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 175

Leu Ser Gly Arg Ser Gly Asn His
1 5

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 176

Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro Arg Gly
1 5

<210> 177
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 177

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asp His
1 5

<210> 178
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<400> 178

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Ile His
1 5

<210> 179
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 179

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Gln His
1 5

<210> 180
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<223> Tổng hợp

<400> 180

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Thr His
1 5

<210> 181
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 181

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Tyr His
1 5

<210> 182
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 182

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro
1 5

<210> 183

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 183

Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Pro
1 5

<210> 184

<211> 8

<212> PRT

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 184

Leu Ser Gly Arg Ser Ala Asn Ile
1 5

<210> 185

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 185

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Ile
1 5

<210> 186

<211> 8

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 186

Met Ile Ala Pro Val Ala Tyr Arg
1 5

<210> 187

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 187

Arg Pro Ser Pro Met Trp Ala Tyr
1 5

<210> 188

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 188

Trp Ala Thr Pro Arg Pro Met Arg

1 5

<210> 189

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 189

Phe Arg Leu Leu Asp Trp Gln Trp

1 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 190

Ile Ser Ser Gly Leu
1 5

<210> 191

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 191

Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser
1 5

<210> 192

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 192

Ile Ser Ser Gly Leu Leu

1 5

<210> 193

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 193

Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Ala Val Gly Leu Leu

1 5 10 15

Ala Pro Pro

<210> 194

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 194

Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Val His Met Pro Leu
1 5 10 15

Gly Phe Leu Gly Pro
20

<210> 195

<211> 146

<212> PRT

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 195

Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg
20 25 30

Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
35 40 45

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser
50 55 60

Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

85 90 95

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
100 105 110

Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
115 120 125

Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
130 135 140

Ile Lys
145

<210> 196
<211> 153
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 196

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu
1 5 10 15

Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp
35 40 45

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
50 55 60

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr
65 70 75 80

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser
85 90 95

100 105 110

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp
115 120 125

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe
130 135 140

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
145 150

<210> 197
<211> 146
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 197

Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg
20 25 30

Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
35 40 45

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser
50 55 60

Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly
65 70 75 80

Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
85 90 95

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
100 105 110

115 120 125

Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
130 135 140

Ile Lys
145

<210> 198
<211> 153
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 198

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala
1 5 10 15

Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser

Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn His Gly Gly Gly Ser Asp
35 40 45

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
50 55 60

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr
65 70 75 80

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser
85 90 95

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
100 105 110

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp
115 120 125

130 135 140

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Iie Lys
145 150

<210> 199
<211> 150
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 199

Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly
20 25 30

Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met

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

Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln
65 70 75 80

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn
85 90 95

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
115 120 125

Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
130 135 140

145 150

<210> 200

<211> 157

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 200

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala
1 5 10 15

Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val
20 25 30

Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro
35 40 45

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

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

Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
85 90 95

Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
100 105 110

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met
115 120 125

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr
130 135 140

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
145 150 155

<211> 146

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 201

Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg
20 25 30

Ser Asp Asn Pro Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
35 40 45

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser
50 55 60

Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly

Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
85 90 95

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
100 105 110

Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
115 120 125

Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
130 135 140

Ile Lys
145

<210> 202
<211> 153
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 202

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Asn Leu Cys Thr Glu His Ser Ala Ala
1 5 10 15

Leu Asp Cys Arg Ser Tyr Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Leu Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro Gly Gly Gly Ser Asp
35 40 45

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
50 55 60

Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr
65 70 75 80

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser

Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
100 105 110

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp
115 120 125

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe
130 135 140

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
145 150

<210> 203
<211> 150
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly
20 25 30

Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
35 40 45

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

Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln
65 70 75 80

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn
85 90 95

Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
115 120 125

Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
130 135 140

Thr Lys Leu Glu Ile Lys
145 150

<210> 204
<211> 157
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 204

Gln Gly Gln Ser Gly Gln Gly Gln Phe Cys Pro Trp Ser Tyr Tyr Leu
1 5 10 15

Ile Gly Asp Cys Asp Ile Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala Val
20 25 30

Gly Leu Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Pro
35 40 45

Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
50 55 60

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

Tyr Tyr Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
85 90 95

Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
100 105 110

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr
130 135 140

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
145 150 155

<210> 205
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 205

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 206
<211> 354

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 206

caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaagatg 60

tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gcgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatcggcgcc atctaccccg gcaactccga gacaggctac 180

gcccagaagt tccagggcag agccaccctg accgccgaca cctccacctc caccgcctac 240

atggaactgt ccagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcac cagagagaac 300

tgggaccccg gcttcgcctt ctggggccag ggcaccctga tcaccgtgtc ctcc 354

<210> 207

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 207

Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 208
<211> 639
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 208
gacatccaga tgacccagtc cccatccagc ctgtccgcct ccgtgggcga cagagtgaca 60

atcacctgtt ccgccagctc ctccgtgtac tacatgtact ggttccagca gaagccccggc 120

aaggccccca agctgtggat ctactccacc tccaacctgg cctccggcgt gccctccaga 180

ttctccggct ctggctccgg caccgactac accctgacca tctccagcat gcagccccgag 240

gacttcgcca cctactactg ccagcagcgg cggaactacc cctacacctt cggccagggc 300

accaagctgg aaatcaagcg gaccgtggcc gctcccagcg tgttcatctt cccaccctcc 360

gacgagcagc tgaagtccgg caccgccagc gtcgtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420

cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccggcaa ctcccaggaa 480

tccgtcaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgtcctccac cctgaccctg 540

tccaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg 600

tccagccccg tgaccaagtc cttcaaccgc ggcgagtgc 639