(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

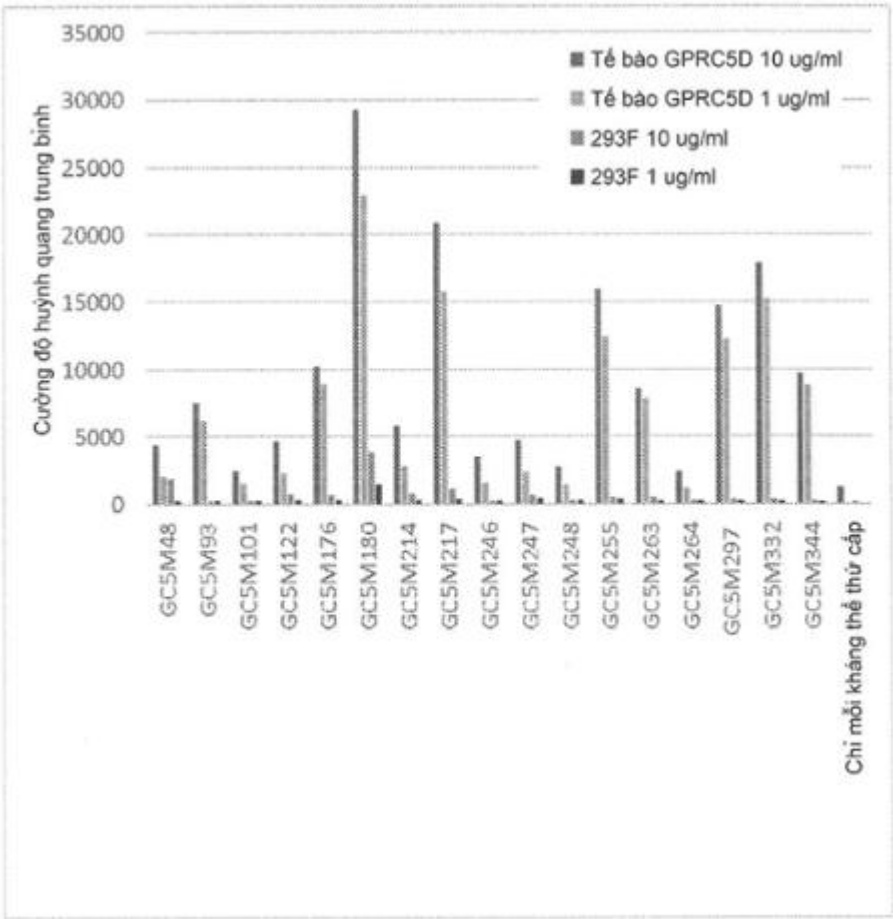
(11) **1-0040938**

(51)[2006.01] **A61K 39/395**; C07K 16/28; A61K 39/00 (13) **B**

(21) 1-2019-00839 (22) 20/07/2017
(86) PCT/US2017/042982 20/07/2017 (87) WO/2018/017786 25/01/2018
(30) 62/364,811 20/07/2016 US
(45) 26/08/2024 437 (43) 25/09/2019 378A
(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)
800/850 Ridgeview Drive Horsham, Pennsylvania 19044, United States of America
(72) ATTAR, Ricardo (US); CHIN, Diana (US); EDAVETTAL, Suzanne (US); GAUDET, Francois (CA); LI, Yingzhe (CN); LUISTRO, Leopoldo (US); MAJEWSKI, Nathan (US); MENDONCA, Mark (US); PILLARISETTI, Kondandaram (US); TEPLYAKOV, Alexey (US); TORNETTA, Mark (US).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP KHÁNG GPRC5D VÀ KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP GPRC5D X CD3

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập kháng GPRC5D và các polynucleotit liên quan có khả năng mã hóa các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc các mảnh gắn kháng nguyên, các tế bào biểu hiện các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên, các vectơ liên quan, các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên được gắn nhãn để có thể phát hiện được. Kháng thể theo sáng chế hữu ích trong chẩn đoán, điều trị, hoặc theo dõi tình trạng tiến triển, thoái lui hoặc ổn định của bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D; để xác định bệnh nhân có phải điều trị bệnh ung thư hay không; hoặc để xác định một đối tượng có bị mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D hay không và do đó có thể phải tuân thủ theo điều trị bằng thuốc kháng ung thư đặc hiệu GPRC5D, như các kháng thể đa hiệu kháng GPRC5D và CD3.


Tế bào GPRC5D 10 ug/ml
Tế bào GPRC5D 1 ug/ml
293F 10 ug/ml
293F 1 ug/ml
Cường độ huỳnh quang trung bình
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
GC5M48
GC5M93
GC5M101
GC5M122
GC5M176
GC5M180
GC5M214
GC5M217
GC5M246
GC5M247
GC5M248
GC5M255
GC5M263
GC5M264
GC5M297
GC5M332
GC5M344
Chỉ mối kháng thể thứ cấp

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế bộc lộ trong bản mô tả đề cập đến các kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với thành phần D nhóm 5 lớp C của thụ thể kết nối với protein G (GPRC5D), các kháng thể đa hiệu liên kết đặc hiệu với GPRC5D và cụm biệt hóa 3 (CD3), và các phương pháp sản xuất và sử dụng các kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đa u tủy (MM) là bệnh lý huyết học ác tính phổ biến thứ hai và là nguyên nhân của khoảng 2 % số ca tử vong do ung thư. MM là dạng bệnh không đồng nhất và có nguyên nhân chủ yếu là do sự chuyển đoạn nhiễm sắc thể, trong số các nguyên nhân khác, t(11; 14),t(4; 14),t(8;14),del(13),del(17) (Drach và cộng sự, (1998) Blood (Máu) 92(3):802-809; Gertz và cộng sự, (2005) Blood (Máu) 106(8):2837-2840; Facon và cộng sự, (2001) Blood (Máu) 97(6): 1566-1571). Các bệnh nhân bị MM có thể trải qua các triệu chứng liên quan đến bệnh do thâm nhiễm tủy xương, tổn thương xương, suy thận, suy giảm miễn dịch và gánh nặng tâm thần xã hội khi bị chẩn đoán ung thư. Từ năm 2006, tỷ lệ sống sót trong 5 năm của bệnh MM là vào khoảng 34 %, cho thấy MM là một căn bệnh khó chữa, do hiện nay không có các liệu pháp chữa khỏi hẳn.

Thụ thể liên kết với protein G, lớp C, nhóm 5, thành phần D (GPRC5D) là GPCR lớp C, mồ côi, không điển hình thứ nhất được xác định vào năm 2001 (Bräuner-Osborne và cộng sự Biochim Biophys Acta. 1518(3):237-248, 2001). GPRC5D và nhóm gồm 5 GPCR khác có các miền đầu amino ngắn bất thường dành cho các thụ thể lớp C, do đó được dự đoán là tương tự về mặt cấu hình với các thụ thể lớp A. Về vấn đề này, chúng là đơn nhất, với tính tương đồng trình tự với các GPCR lớp C và được dự đoán là topo cấu trúc tương tự như các thụ thể lớp A. Hệ quả chức năng hoạt hóa GPRC5D chưa được mô tả và phối tử vẫn chưa xác định. Gen có 3 exon và được đặt trên nhiễm sắc thể 12p13.3 ở người. Thụ thể GPRC5D được bảo toàn cao trong các loài khác nhau và có chung sự đồng nhất là 92 % với khỉ đuôi dài GPRC5D.

ARN thông tin của GPRC5D được biểu hiện chủ yếu trong tất cả tương bào ác tính từ bệnh nhân MM (Atamaniuk JA và cộng sự Eur J Clin Invest (Tạp chí xét nghiệm lâm sàng) 42(9) 953-960; 2012; Frigyesi-blood and Cohen, và cộng sự Hematology 18(6): 348-35; 2013). Biểu hiện GPRC5D thay đổi ở các bệnh nhân và tương quan tốt với gánh nặng huyết tương và quang sai di truyền như sự làm mất Rb-1 (Atamaniuk JA và cộng sự Eur J Clin Invest 42(9) 953-960; 2012).

Biểu hiện loại trừ này của GPRC5D trên dòng tương bào chỉ định nó làm đích lý tưởng cho các kháng thể kháng u tủy.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể liên kết đặc hiệu với GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên của chúng. Bản mô tả này cũng đề cập đến các polynucleotit liên quan có khả năng mã hóa các kháng thể đặc hiệu GPRC5D được đề xuất và các mảnh gắn kháng nguyên, các tế bào biểu hiện các kháng thể được đề xuất và các mảnh gắn kháng nguyên, các vectơ liên quan, các kháng thể gắn nhãn có thể phát hiện được và các mảnh gắn kháng nguyên. Ngoài ra, các phương pháp sử dụng các kháng thể và mảnh gắn kháng nguyên được đề xuất cũng được mô tả. Ví dụ, kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên có thể được sử dụng để chẩn đoán hoặc theo dõi sự tiến triển, thoái lui hoặc ổn định của bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D; để xác định bệnh nhân có phải điều trị bệnh ung thư hay không; hoặc để xác định một đối tượng có bị mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D hay không và do đó có thể phải tuân thủ theo điều trị bằng thuốc kháng ung thư đặc hiệu GPRC5D, như các kháng thể đa hiệu kháng GPRC5D và CD3 được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể đa hiệu liên kết miễn dịch đặc hiệu với GPRC5D và CD3 và các mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của chúng. Bản mô tả này cũng đề cập đến các polynucleotit liên quan có khả năng mã hóa các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 được đề xuất, các tế bào biểu hiện các kháng thể được đề xuất, các vectơ liên quan, và các kháng thể đa hiệu gắn nhãn có thể phát hiện được. Ngoài ra, các phương pháp sử dụng các kháng thể đa hiệu được đề xuất cũng được mô tả. Ví dụ, kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 có thể được sử dụng để chẩn đoán hoặc theo dõi sự tiến triển, thoái lui hoặc ổn định của bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D; để

xác định bệnh nhân có phải điều trị bệnh ung thư hay không; hoặc để xác định một đối tượng có bị mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D hay không và do đó có thể phải tuân thủ theo điều trị bằng thuốc kháng ung thư đặc hiệu GPRC5D, như các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 được mô tả trong bản mô tả này.

Các kháng thể đặc hiệu GPRC5D

Bản mô tả này mô tả các kháng thể phân lập và các mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đối với GPRC5D. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên liên kết với GPRC5D người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên liên kết với GPRC5D người và GPRC5D khỉ đuôi dài. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và mảnh gắn kháng nguyên liên kết với một hoặc nhiều đơn phân của polypeptit có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 22. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể cảm ứng ADCC *trong ống nghiệm* với EC_{50} 28 nM hoặc nhỏ hơn.

Bảng 1 trình bày tổng hợp các ví dụ về một số kháng thể đặc hiệu GPRC5D như được mô tả trong bản mô tả này:

Bảng 1. Các trình tự CDR của các kháng thể đơn dòng được tạo kháng GPRC5D người

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B81	SYAIS (SỐ ID TRÌNH TỰ 1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 5)	ESRWRGYKLD (SỐ ID TRÌNH TỰ 9)	RASQSISSYLN (SỐ ID TRÌNH TỰ 13)	AASSLQS (SỐ ID TRÌNH TỰ 16)	QQSYSTPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 19)
GC5B465 GC5B597	NYWMS (SỐ ID TRÌNH TỰ 2)	GISYSGGSKYYASSVKG (SỐ ID TRÌNH TỰ 6)	AAFDFGRRAVRLD (SỐ ID TRÌNH TỰ 10)	RASQSISSYLN (SỐ ID TRÌNH TỰ 13)	AASSLQS (SỐ ID TRÌNH TỰ 16)	QQSYSTPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 19)
GC5B483 GC5B599	SYFIG (SỐ ID TRÌNH TỰ 3)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 7)	VYSFGGRHKALFDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 11)	RASQSVSSYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 14)	DASNRAT (SỐ ID TRÌNH TỰ 17)	QQRSNWPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 20)
GC5B596	GYTMN (SỐ ID TRÌNH TỰ 4)	LINPYNSDTNYAQKLQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 8)	VALRVALDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 12)	KASQNVATHVG (SỐ ID TRÌNH TỰ 15)	SASYRYS (SỐ ID TRÌNH TỰ 18)	QQYNRYPYT (SỐ ID TRÌNH TỰ 21)
GC5B382	DYGMH (SỐ ID TRÌNH TỰ 61)	AIKYSGGSTYYADSVKG (SỐ ID TRÌNH TỰ 67)	RAESGPGLDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 72)	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 98)	WASTRES (SỐ ID TRÌNH TỰ 78)	QQYYSTPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 80)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B379	NYWMS (SỐ ID TRÌNH TỰ 2)	GISYSGGSKYYADSVKG (SỐ ID TRÌNH TỰ 28)	AAWDFGRRAVRLDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 30)	RASQSISSYLN (SỐ ID TRÌNH TỰ 13)	AASSLQS (SỐ ID TRÌNH TỰ 16)	QQSYSTPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 19)
GC5B373	SYWIG (SỐ ID TRÌNH TỰ 27)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 29)	IGFYGRSFRIFDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 73)	RASQSVSSYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 14)	DASNRAT (SỐ ID TRÌNH TỰ 17)	QQRSNWPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 20)
GC5B376	SYWIG (SỐ ID TRÌNH TỰ 27)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 29)	VYSFGGRHKALFDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 11)	RASQSVSSYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 14)	DASNRAT (SỐ ID TRÌNH TỰ 17)	QQRSNWPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 20)
GC5B385	GYAMS (SỐ ID TRÌNH TỰ 62)	AISGSGGSTYYADSVKG (SỐ ID TRÌNH TỰ 68)	VDRSFGRSRYTLDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 74)	RASQSVSSYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 14)	DASNRAT (SỐ ID TRÌNH TỰ 17)	QQRSNWPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 20)
GC5B370 GC5B598	SYGIS (SỐ ID TRÌNH TỰ 63)	GIIPIFGNINYAQKFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 69)	VSRRFKRFAYYFDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 75)	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 98)	WASTRES (SỐ ID TRÌNH TỰ 78)	QQYYSTPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 80)
GC5B602	GYSFTGYTMN (SỐ ID TRÌNH TỰ 64)	LINPYNGDTN (SỐ ID TRÌNH TỰ 70)	VALRVALDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 12)	KASQNVATHVG (SỐ ID TRÌNH TỰ 15)	SASYRYS (SỐ ID TRÌNH TỰ 18)	QQYNRYPYT (SỐ ID TRÌNH TỰ 21)
GC5B603	SYAMS (SỐ ID TRÌNH TỰ 65)	AISGSGGSTYYADSVKG (SỐ ID TRÌNH TỰ 68)	SNFLPVVFDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 76)	RASQSVRKSLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 95)	TASNRAT (SỐ ID TRÌNH TỰ 79)	QQYFRAPIT (SỐ ID TRÌNH TỰ 81)
GC5B601	GFSLTSYNVH (SỐ ID TRÌNH TỰ 66)	VIWAGGSTNYNSALMS (SỐ ID TRÌNH TỰ 71)	DGIRLRFAY (SỐ ID TRÌNH TỰ 77)	KASQNVATHVG (SỐ ID TRÌNH TỰ 15)	SASYRYS (SỐ ID TRÌNH TỰ 18)	QQYNRYPYT (SỐ ID TRÌNH TỰ 21)

Một số phương án đề xuất kháng thể đặc hiệu GPRC5D, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, bao gồm chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2 và CDR3 của kháng thể bất kỳ trong các kháng thể được trình bày trong Bảng 1. Một số phương án đề xuất kháng thể đặc hiệu GPRC5D, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, bao gồm chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2 và CDR3 của kháng thể bất kỳ trong các kháng thể được trình bày trong Bảng 1, và chuỗi nhẹ chứa CDR1, CDR2 và CDR3 của kháng thể bất kỳ trong các kháng thể được trình bày trong Bảng 1. Trong một số phương án được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó cạnh tranh để liên kết với GPRC5D với một kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2 và CDR3 của kháng thể bất kỳ trong các kháng thể được trình

bày trong Bảng 1, và chuỗi nhẹ chứa CDR1, CDR2 và CDR3 của kháng thể bất kỳ trong các kháng thể được trình bày trong Bảng 1.

Lớp IgG được phân thành bốn lớp kháng thể: IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 ở người. Chúng tương đồng hơn 95 % ở các trình tự axit amin của vùng Fc nhưng lại khác biệt đáng kể trong thành phần axit amin và cấu trúc của vùng bản lề. Vùng Fc làm trung gian cho các chức năng của tế bào thực thi, như gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Trong cơ chế ADCC, vùng Fc của kháng thể liên kết với các thụ thể Fc (FcgR) trên bề mặt của các tế bào thực thi miễn dịch như tế bào sát thủ tự nhiên và đại thực bào, dẫn đến sự thực bào hoặc ly giải tế bào đích. Trong cơ chế CDC, các kháng thể tiêu diệt tế bào đích bằng cách hoạt hóa hệ bổ thể tại bề mặt tế bào. Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này bao gồm các kháng thể có các đặc điểm của các miền biến đổi kết hợp với lớp kháng thể IgG bất kỳ, bao gồm các phiên bản được điều hòa trong đó chuỗi Fc đã được điều hòa để tác dụng lên các chức năng khác nhau của tế bào thực thi.

Đối với nhiều ứng dụng của các kháng thể chữa bệnh, các chức năng của tế bào thực thi qua trung gian Fc không phải là một phần của cơ chế tác động. Các chức năng của tế bào thực thi qua trung gian Fc có thể có hại và có thể mang đến rủi ro về an toàn do gây ra tính độc từ cơ chế đóng. Có thể điều hòa các chức năng của tế bào thực thi bằng cách kiến tạo các vùng Fc để giảm liên kết của chúng đến các FcgR hoặc các yếu tố bổ thể. Sự liên kết của IgG với FcgR hoạt hóa (FcgRI, FcgRIIa, FcgRIIIa và FcgRIIIb) và ức chế (FcgRIIb) hoặc thành phần thứ nhất của bổ thể (C1q) phụ thuộc vào các gốc tại vùng bản lề và miền CH2. Các đột biến đã được đưa vào IgG1, IgG2 và IgG4 để làm giảm hoặc làm câm các chức năng của Fc. Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm các điều hòa này.

Trong một phương án, kháng thể bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều đặc tính sau: (a) các chức năng của tế bào thực thi đã bị giảm so với Fc mẹ; (b) ái lực với Fcg RI, Fcg RIIa, Fcg RIIb, Fcg RIIIb và/hoặc Fcg RIIIa giảm, (c) ái lực với FcgRI giảm (d) ái lực với FcgRIIa giảm (e) ái lực với FcgRIIb giảm, (f) ái lực với Fcg RIIIb giảm hoặc (g) ái lực với FcgRIIIa giảm.

Trong một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là IgG, hoặc dẫn xuất của nó, ví dụ các lớp kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Trong một

số phương án trong đó kháng thể có lớp kháng thể IgG1, kháng thể bao gồm (các) thay thế L234A, L235A, và/hoặc K409R tại vùng Fc của nó. Trong một số phương án trong đó kháng thể có lớp kháng thể IgG4, kháng thể bao gồm các thay thế S228P, L234A, và L235A tại vùng Fc của nó. Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm các điều hòa này.

Ngoài các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên đã được mô tả, bản mô tả này cũng cung cấp các trình tự polynucleotit có khả năng mã hóa các kháng thể và mảnh gắn kháng nguyên này. Bản mô tả còn cung cấp các vectơ chứa các polynucleotit được mô tả, các tế bào biểu hiện các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc các mảnh gắn kháng nguyên đã nêu. Đồng thời bản mô tả cũng đề cập đến các tế bào có khả năng biểu hiện các vectơ được bộc lộ. Các tế bào này có thể là tế bào động vật có vú (như các tế bào 293F, các tế bào CHO), tế bào côn trùng (như tế bào Sf7), tế bào nấm men, tế bào thực vật, hoặc tế bào vi khuẩn (như E. coli). Các kháng thể được mô tả cũng có thể được sản xuất bằng các tế bào lai.

Các phương pháp sử dụng kháng thể đặc hiệu GPRC5D

Bản mô tả cũng bộc lộ các phương pháp sử dụng các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên đã nêu. Các kháng thể cụ thể để sử dụng trong các phương pháp được trình bày trong phần này bao gồm các kháng thể có nhóm CDR được mô tả cho các kháng thể trong Bảng 1. Ví dụ, các kháng thể này hoặc mảnh gắn kháng nguyên có thể hữu ích trong điều trị bệnh ung thư, bằng cách can thiệp bằng tương tác thụ thể GPRC5D hoặc bằng cách trong đó kháng thể được tiếp hợp với độc tố, từ đó hướng độc tố nhắm đích đến tế bào ung thư biểu hiện GPRC5D. Ngoài ra, các kháng thể này hoặc các đoạn gắn kháng nguyên có thể hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt của GPRC5D trong mẫu sinh học, như mẫu máu hoặc huyết thanh; trong việc định lượng GPRC5D trong mẫu sinh học, như mẫu máu hoặc huyết thanh; trong việc chẩn đoán bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D; xác định phương pháp điều trị đối tượng bị mắc bệnh ung thư; hoặc theo dõi sự tiến triển của bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D ở đối tượng. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D có thể là ung thư hạch bạch huyết, như bệnh đa u tủy (MM). Có thể thực hiện các phương pháp này trước khi đối tượng được điều trị ung thư biểu

hiện GPRC5D, như điều trị bằng kháng thể đa hiệu kháng GPRC5D và CD3. Ngoài ra, có thể thực hiện các phương pháp này sau khi đối tượng được điều trị ung thư biểu hiện GPRC5D, như điều trị bằng kháng thể đa hiệu kháng GPRC5D và CD3 được mô tả trong bản mô tả này.

Các phương pháp phát hiện GPRC5D trong mẫu sinh học này bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với một hoặc nhiều kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này.

Các phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D trong đối tượng cũng liên quan đến bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với một hoặc nhiều kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này; tuy nhiên, các phương pháp cũng bao gồm bước định lượng GPRC5D có mặt trong mẫu; bước so sánh lượng GPRC5D có trong mẫu với một tiêu chuẩn đã biết hoặc mẫu tham chiếu; và bước xác định liệu mức GPRC5D của đối tượng có rơi vào trong phạm vi các mức GPRC5D liên quan đến bệnh ung thư hay không.

Đồng thời bản mô tả này cũng trình bày các phương pháp theo dõi bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D ở đối tượng. Các phương pháp được mô tả bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với một hoặc nhiều kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này; bước định lượng GPRC5D có trong mẫu liên kết với kháng thể, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của kháng thể; bước so sánh lượng GPRC5D có trong mẫu với một tiêu chuẩn đã biết hoặc mẫu tham chiếu hoặc lượng GPRC5D trong mẫu tương tự lấy từ đối tượng từ trước; và bước xác định liệu mức GPRC5D của đối tượng có biểu thị sự tiến triển, thoái lui hoặc ổn định của bệnh ung thư dựa trên sự khác nhau trong lượng GPRC5D trong các mẫu so sánh.

Các mẫu thu được, hoặc có nguồn gốc từ, các đối tượng là các mẫu sinh học như nước tiểu, máu, huyết thanh, huyết tương, nước bọt, dịch cổ trướng, tế bào tuần hoàn, tế bào khối u tuần hoàn, tế bào không kết hợp với mô, các mô, các mô khối u cắt bỏ bằng phẫu thuật, mô sinh thiết, mẫu tế bào chọc hút bằng kim nhỏ, hay các tiêu bản mô.

Các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể được gắn nhãn để sử dụng với các phương pháp được trình bày trong bản mô tả,

hoặc các phương pháp khác mà các chuyên gia trong ngành đã biết. Ví dụ, các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của chúng, có thể được đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ, nhãn huỳnh quang, nhãn epitope, bioti, nhãn nhóm mang màu, nhãn ECL, enzym, ruteni, ^{111}In-DOTA, ^{111}In- axit diethylenetriaminepentaacetic (DTPA), peroxyđaza ở cây cải ngựa, phosphataza kiềm và beta-galactosiđaza, hoặc poly-histiđin hoặc các nhãn tương tự đã biết trong ngành.

Kit kháng thể đặc hiệu GPRC5D

Bản mô tả cũng mô tả các kit bao gồm các kháng thể đặc hiệu GPRC5D được bộc lộ hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của chúng. Có thể sử dụng các kit này để thực hiện các phương pháp sử dụng các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc các mảnh gắn kháng nguyên được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc các phương pháp khác mà các chuyên gia trong ngành đã biết. Trong một số phương án, các kit được mô tả có thể bao gồm các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này và các thuốc thử để sử dụng để phát hiện sự có mặt của GPRC5D trong mẫu sinh học. Theo đó, các kit được mô tả có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng thể hoặc (các) mảnh gắn kháng nguyên của chúng, được mô tả trong bản mô tả này, và một bình để chứa kháng thể hoặc mảnh kháng thể khi không dùng, hướng dẫn sử dụng kháng thể hoặc mảnh kháng thể, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được để trên một giá đỡ cứng, và/hoặc các dạng kháng thể hoặc mảnh kháng thể được gắn nhãn để có thể phát hiện, như được mô tả trong bản mô tả này.

Các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3

Việc chuyển hướng lympho bào T đến các tế bào MM biểu hiện GPRC5D qua phức TCR/CD3 là một phương pháp thuyết phục khác. Phức TCR/CD3 của lympho bào T bao gồm dị đime TCR alpha (α)/beta ((β) hoặc TCR gamma (γ)/delta (δ) được đồng biểu hiện tại bề mặt tế bào với các tiểu phần bất biến gamma (γ), delta (δ), epsilon (ε), zeta (ζ), và eta (η) được gắn nhãn CD3. CD3ε người được mô tả trong UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Kháng thể kháng CD3ε được mô tả trong ngành là SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (Tạp chí miễn dịch) (1986) 137; 1097-

1100). SP34 phản ứng với cả CD3 người và linh trưởng. SP34 đã có tại Pharmingen. Kháng thể kháng CD3 khác được mô tả trong ngành là UCHT-1 (xem WO2000041474). Kháng thể kháng CD3 khác nữa được mô tả trong ngành là BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute (Trung tâm nghiên cứu ung thư Fred Hutchinson); được sử dụng trong các thử nghiệm GvHD giai đoạn I/II, Anasetti và cộng sự, Transplantation (Cấy ghép) 54: 844 (1992)). SP34 khác với UCHT-1 và BC-3 ở chỗ SP-34 nhận diện epitope có mặt chỉ duy nhất tại chuỗi ε của CD3 (xem Salmeron và cộng sự, (1991) J. Immunol. (Tạp chí miễn dịch) 147: 3047) trong khi UCHT-1 và BC-3 nhận diện epitope được cung cấp từ cả chuỗi ε và γ. Trình tự của kháng thể có trình tự tương tự như trình tự kháng thể SP34 được đề cập trong WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837 và WO2010037838. Trình tự đồng nhất 96 % với VH của kháng thể SP34 được đề cập trong US8236308 (WO2007042261).

Bản mô tả này còn trình bày các kháng thể đa hiệu phân lập liên kết với GPRC5D và CD3 ("các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3") và các mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của chúng. Trong một số phương án, kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, liên kết miễn dịch đặc hiệu với GPRC5D được cung cấp.

Trong một số phương án, nhánh đặc hiệu GPRC5D của kháng thể đa hiệu liên kết với GPRC5D người và/hoặc GPRC5D khỉ đuôi dài (khỉ). Trong một số phương án, nhánh đặc hiệu GPRC5D của các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 hoặc các mảnh gắn kháng nguyên liên kết với miền ngoại bào của GPRC5D người. Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn kháng nguyên là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi. Trong một số phương án, kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 phân lập được cung cấp bao gồm: a) chuỗi nặng thứ nhất (HC1); b) chuỗi nặng thứ hai (HC2); c) chuỗi nhẹ thứ nhất (LC1); và d) chuỗi nhẹ thứ hai (LC2), trong đó HC1 và LC1 bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết miễn dịch đặc hiệu với GPRC5D, và HC2 và LC2 bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ hai liên kết miễn dịch đặc hiệu với CD3, hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 của nó. Trong phương án khác, một tế bào phân lập biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi được đề xuất. Trong một

số phương án, nhánh liên kết GPRC5D (hay "nhánh đặc hiệu GPRC5D") của kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 được dẫn xuất từ kháng thể GPRC5D được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, từ kháng thể có các trình tự CDR được liệt kê trong Bảng 1).

Trong một số phương án, nhánh đặc hiệu GPRC5D của các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 hoặc các mảnh gắn kháng nguyên là IgG, hoặc các dẫn xuất của nó. Trong một số phương án, nhánh liên kết CD3 (hay "nhánh đặc hiệu CD3") của kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 được dẫn xuất từ kháng thể đơn dòng SP34 của chuột, lớp kháng thể IgG3/lambda của chuột. (K.R. Abhinandan và A. C. Martin, 2008. Mol. Immunol. (Miễn dịch học phân tử) 45, 3832-3839). Trong một số phương án, nhánh liên kết CD3 của kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 bao gồm một miền VH và một miền VL được chọn từ Bảng 2.

Bảng 2. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đặc hiệu CD3 và mảnh gắn kháng nguyên.

VH	VL
CD3B219 (SỐ ID TRÌNH TỰ: 99): EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKG RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	**CD3B219 (SỐ ID TRÌNH TỰ: 100):** QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS

Lớp IgG được phân thành bốn lớp kháng thể: IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 ở người. Chúng tương đồng hơn 95 % ở các trình tự axit amin của vùng Fc nhưng lại khác biệt đáng kể trong thành phần axit amin và cấu trúc của vùng bản lề. Vùng Fc làm trung gian cho các chức năng của tế bào thực thi, như gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Trong cơ chế ADCC, vùng Fc của kháng thể liên kết với các thụ thể Fc (FcgR) trên bề mặt của các tế bào thực thi miễn dịch như tế bào sát thủ tự nhiên và đại thực bào, dẫn đến sự thực bào

hoặc ly giải tế bào đích. Trong cơ chế CDC, các kháng thể tiêu diệt tế bào đích bằng cách hoạt hóa hệ bổ thể tại bề mặt tế bào.

Đối với nhiều ứng dụng của các kháng thể chữa bệnh, các chức năng của tế bào thực thi qua trung gian Fc không phải là một phần của cơ chế tác động. Các chức năng của tế bào thực thi qua trung gian Fc có thể có hại và có thể mang đến rủi ro về an toàn do gây ra tính độc từ cơ chế đóng. Có thể điều hòa các chức năng của tế bào thực thi bằng cách kiến tạo các vùng Fc để giảm liên kết của chúng đến các FcgR hoặc các yếu tố bổ thể. Sự liên kết của IgG với FcgR hoạt hóa (FcgRI, FcgRIIa, FcgRIIIa và FcgRIIIb) và ức chế (FcgRIIb) hoặc thành phần thứ nhất của bổ thể (C1q) phụ thuộc vào các gốc tại vùng bản lề và miền CH2. Các đột biến đã được đưa vào IgG1, IgG2 và IgG4 để làm giảm hoặc làm câm các chức năng của Fc.

Trong một phương án, kháng thể bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều đặc tính sau: (a) các chức năng của tế bào thực thi đã bị giảm so với Fc mẹ; (b) ái lực với Fcg RI, Fcg RIIa, Fcg RIIb, Fcg RIIIb và/hoặc Fcg RIIIa giảm, (c) ái lực với FcgRI giảm (d) ái lực với FcgRIIa giảm (e) ái lực với FcgRIIb giảm, (f) ái lực với Fcg RIIIb giảm hoặc (g) ái lực với FcgRIIIa giảm.

Trong một số phương án, kháng thể đặc hiệu CD3 hoặc mảnh gắn kháng nguyên mà từ đó nhánh đặc hiệu CD3 của kháng thể đa hiệu được dẫn xuất là IgG, hoặc dẫn xuất của nó. Trong một số phương án, kháng thể đặc hiệu CD3 hoặc mảnh gắn kháng nguyên mà từ đó nhánh đặc hiệu CD3 của kháng thể đa hiệu được dẫn xuất là IgG1, hoặc dẫn xuất của nó. Trong một số phương án, ví dụ, vùng Fc của kháng thể IgG1 đặc hiệu CD3 mà từ đó nhánh liên kết với CD3 được dẫn xuất bao gồm các thay thế L234A, L235A, và F405L trong vùng Fc của nó. Trong một số phương án, kháng thể đặc hiệu CD3 hoặc mảnh gắn kháng nguyên mà từ đó nhánh đặc hiệu CD3 của kháng thể đa hiệu được dẫn xuất là IgG4, hoặc dẫn xuất của nó. Trong một số phương án, ví dụ, vùng Fc của kháng thể IgG4 đặc hiệu CD3 mà từ đó nhánh liên kết với CD3 được dẫn xuất bao gồm các thay thế S228P, L234A, L235A, F405L, và R409K trong vùng Fc của nó. Trong một số phương án, kháng thể đặc hiệu CD3 hoặc mảnh gắn kháng nguyên mà từ đó nhánh đặc hiệu CD3 của kháng thể đa hiệu được dẫn xuất liên kết với Cd3ε tại các tế bào T sơ cấp của người và/hoặc tế bào T sơ cấp của khỉ. Trong một số phương án, kháng thể đặc hiệu CD3

hoặc mảnh gắn kháng nguyên mà từ đó nhánh đặc hiệu CD3 của kháng thể đa hiệu được dẫn xuất hoạt hóa tế bào T CD4+ sơ cấp của người và/hoặc tế bào T CD4+ sơ cấp của khỉ.

Ngoài các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 được mô tả, sáng chế cũng đề xuất các trình tự polynucleotit có khả năng mã hóa các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 này. Trong một số phương án, polynucleotit tổng hợp được phân lập mã hóa HC1, HC2, LC1 hoặc LC2 của kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi được cung cấp. Bản mô tả còn cung cấp các vectơ chứa các polynucleotit được mô tả, các tế bào biểu hiện các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 được mô tả tại đây. Đồng thời bản mô tả cũng đề cập đến các tế bào có khả năng biểu hiện các vectơ được bộc lộ. Các tế bào này có thể là tế bào động vật có vú (như các tế bào 293F, các tế bào CHO), tế bào côn trùng (như tế bào Sf7), tế bào nấm men, tế bào thực vật, hoặc tế bào vi khuẩn (như E. coli). Các kháng thể được mô tả cũng có thể được sản xuất bằng các tế bào lai. Một số phương án đề xuất các phương pháp tạo kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi bằng cách nuôi cấy tế bào.

Ngoài ra sáng chế cũng đề xuất các chế phẩm dược chứa các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn kháng nguyên và chất mang dược dụng.

Các phương pháp sử dụng các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3

Bản mô tả cũng bộc lộ các phương pháp sử dụng các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 đã nêu và các mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của chúng. Ví dụ, các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 và các mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của chúng có thể hữu ích trong điều trị bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D ở đối tượng cần điều trị. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D là ung thư hạch bạch huyết, như bệnh đa u tủy.

Các phương pháp điều trị bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D ở đối tượng cần điều trị bao gồm bước cho đối tượng sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 đã nêu hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó. Trong một số phương án, đối tượng là động vật có vú, tốt nhất đối tượng là con người. Các phương án ưu tiên đề xuất các phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư bằng cách cho bệnh nhân sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đặc hiệu

đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi trong một thời gian đủ để điều trị bệnh ung thư.

Ngoài ra, bản mô tả này còn cung cấp các phương pháp ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh các tế bào ung thư bằng cách cho sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi để ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh các tế bào ung thư.

Bản mô tả này còn cung cấp các phương pháp chuyển hướng tế bào T đến tế bào ung thư biểu hiện GPRC5D bằng cách cho sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi để chuyển hướng tế bào T đến tế bào ung thư.

Kit kháng thể đặc hiệu GPRC5D x CD3

Bản mô tả này trình bày các kit bao gồm các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 đã được bộc lộ. Có thể sử dụng các kit này để thực hiện các phương pháp sử dụng các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc các phương pháp khác mà các chuyên gia trong ngành đã biết. Trong một số phương án, các kit được mô tả có thể bao gồm các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này và các thuốc thử để sử dụng để điều trị bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Theo đó, các kit được mô tả có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng thể đa hiệu hoặc (các) mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của chúng, được mô tả trong bản mô tả này, và một bình để chứa kháng thể hoặc mảnh kháng thể khi không dùng, và/hoặc hướng dẫn sử dụng kháng thể hoặc mảnh kháng thể, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được để trên một giá đỡ cứng, và/hoặc các dạng kháng thể hoặc mảnh kháng thể được gắn nhãn để có thể phát hiện, như được mô tả trong bản mô tả này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Mức liên kết phụ thuộc nồng độ giữa kháng thể đơn dòng kháng GPRC5D được chọn kháng GPRC5D người và các tế bào HEK 293 không chuyển nhiễm. Cũng quan sát được ba kháng thể đơn dòng, GC5B36, GC5B168, và GC5B205 liên kết với các tế bào HEK293 không chuyển nhiễm (GPRC5D bất hoạt).

Hình 2 Liên kết phụ thuộc liều giữa các kháng thể đặc hiệu đôi kháng GPCR5D x CD3 với các tế bào HEK293F GPRC5D.

Hình 3 Mức liên kết của các kháng thể đặc hiệu đôi trên các tế bào MM1R và H929 được so sánh với các tế bào HEK293F GPRC5D người được biểu hiện quá mức và các tế bào HEK293 không chuyển nhiễm bằng cách sử dụng FACS.

Hình 4A và 4B Sự hoạt hóa tế bào T và cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T của các kháng thể kháng GPCR5D x CD3 kháng các tế bào biểu hiện GPRC5D người.

Hình 5A và 5B Sự hoạt hóa tế bào T và cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T của các kháng thể kháng GPCR5D x CD3 kháng các tế bào biểu hiện GPRC5D khỉ.

Hình 6A và 6B Các kháng thể GPRC5DxCD3 tiêu diệt hiệu quả các tế bào H929 ở mẫu chuột NSG phòng ngừa. GCDB32 (6A) và GCDB35 (6B) dẫn đến sự ức chế tăng trưởng khối u hoàn toàn với liều 10 ug, với GCDB32 còn có thể ức chế tăng trưởng khối u 100 % với liều 1 ug.

Hình 7A và 7B. So sánh hiệu lực khi không có (7A) và có (7B) chất ức chế Fc.

Hình 8A-8D. Liên kết GCDB32 GCDB35, GCDB40 và GCDB43 với các thụ thể Fcγ.

Hình 9A và 9B. Đánh giá liên kết FACS của các kháng thể đơn dòng được dẫn xuất từ tế bào lai.

Hình 10A và 10B. Cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T của các kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 kháng các tế bào H929.

Hình 11A-11E. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 liên kết với các dòng tế bào dương tính (H929, MM1R, LP1, OPM2) và âm tính với GPRC5D (NALM6).

Hình 12A-12D. Các kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5DxCD3 là các chất ức chế khối u hiệu lực trong cơ thể sống. Tất cả kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 (GCDB32 được minh họa trong 12A, GCDB53 được minh họa trong 12B, GCDB61 được minh họa trong 12C, và GCDB72 được minh họa trong 12D) hoàn toàn ức chế sự tăng trưởng khối u của tế bào đa u tủy (H929) với liều 10 ug và 1 ug. Quan sát được sự khác biệt với liều 0,1 ug GCDB72 là ức chế 80 % sự tăng trưởng khối u.

Hình 13: Các dòng tế bào MM1.R GPRC5D$^+$ được nhuộm trong 60 phút với các nồng độ khác nhau của các kháng thể dẫn đầu để đo các mức liên kết bề mặt (n=3). IgG4Fc người được gắn nhãn phycoerythrin được sử dụng làm kháng thể thứ cấp để thu tín hiệu (Southern Biotech, dòng HP6025). Liên kết được biểu hiện như cường độ huỳnh quang trung bình hình học được chuẩn hóa như được xác định bằng FACS. Việc vẽ đồ thị và làm khớp dữ liệu được thực hiện trong GraphPad Prism 6 bằng cách sử dụng hồi quy phi tuyến tính với dốc biến thiên (bốn tham số) và phương pháp làm khớp bình phương tối thiểu.

Hình 14A và 14B. Các dòng tế bào GPRC5D$^+$ được nhuộm trong 60 phút với các nồng độ khác nhau của các kháng thể FAB6300 và GC5M481 để đo các mức liên kết bề mặt. IgG4Fc người được gắn nhãn phycoerythrin được sử dụng làm kháng thể thứ cấp để thu tín hiệu (Southern Biotech, dòng HP6025). Liên kết được thể hiện dưới dạng biểu đồ (đường màu đen biểu thị cho lớp kháng thể và đường màu đỏ biểu thị cho kháng thể đặc hiệu GPRC5D (Hình 14A). Hình 14B minh họa mẫu liên kết của các phân tử dẫn đầu trên dòng tế bào đa u tủy GPRC5D+. Đường đứt nét được tô đậm biểu thị đối chứng lớp kháng thể và đường liền nét biểu thị liên kết phân tử dẫn đầu.

Hình 15A và 15B. Các tế bào tủy xương đơn nhân đông lạnh từ hai bệnh nhân MM khác nhau được sử dụng để đánh giá liên kết kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3, so với

đối chứng lớp kháng thể IgG4, cơ chế gây độc tương bào và hoạt hóa tế bào T. Đối với xét nghiệm gây độc tế bào, các tế bào T từ đối tượng cho khỏe mạnh bình thường được bổ sung ngoại sinh cho các mẫu BM MNC của bệnh nhân và được ủ với bốn phân tử dẫn đầu trong 48 giờ. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 liên kết với các tương bào theo cơ chế phụ thuộc liều đối với tất cả mẫu của đối tượng cho và cường độ huỳnh quang trung bình được ghi lại trên trục Y. Lưu ý việc mất các tương bào sống ($CD138^+$) và đồng thời tăng biểu hiện CD25 trên các tế bào T để đáp ứng với việc điều trị bằng kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3.

Hình 16 Chuột NSG được cấy dưới da các tế bào đa u tủy người MM.1S vào ngày 0. PBMC người được tiêm qua đường tĩnh mạch vào ngày 7 của cuộc nghiên cứu. PBS, GCDB72 (0,1 µg, 1 µg, 10 µg và 50 µg/con vật (lần lượt tương đương với 0,005, 0,05, 0,5 và 2,5)) và các kháng thể đối chứng bất hoạt được cho liều qua đường tĩnh mạch vào ngày 15, 18, 22, 24, 29, 32 và 36. Các khối u dưới da được đo hai lần mỗi tuần và các kết quả được trình bày theo thể tích khối u trung bình, được diễn giải theo mm^3 ± (SEM) của từng nhóm. Điều trị bằng kháng thể GCDB72 khi được cho liều 1 µg (0,05 mg/kg) đã ức chế đáng kể sự tăng trưởng khối u dưới da so với PBS (TGI=64 %, $p \leq 0,0001$). Các liều GCDB72 10 µg/con vật (0,5 mg/kg) và 50 µg/con vật (2,5 mg/kg) đã hoàn toàn làm cho sự tăng trưởng khối u thoái lui ($p \leq 0,0001$). Các kháng thể đối chứng bất hoạt không có hoặc có tác dụng không đáng kể. Ý nghĩa thống kê được đánh giá bằng cách sử dụng phân tích ANOVA hai yếu tố với nhiều so sánh sử dụng kiểm định so sánh nhiều cặp Tukey bằng phần mềm GraphPad Prism (phiên bản 6). Sự khác biệt giữa các nhóm được xem là đáng kể khi giá trị xác suất (p) $\leq 0,05$.

Hình 17. NSG được cấy dưới da các tế bào đa u tủy người MM.1S vào ngày 0. PBMC người được tiêm qua đường tĩnh mạch vào ngày 7 của cuộc nghiên cứu. PBS, GCDB72 (0,1 µg, 1 µg, 10 µg và 50 µg/con vật (lần lượt tương đương với 0,005, 0,05, 0,5 và 2,5)) và các kháng thể đối chứng bất hoạt được cho liều qua đường tĩnh mạch vào ngày 15, 18, 22, 24, 29, 32 và 36. Cân nặng cơ thể được trình bày dưới dạng cân nặng cơ thể tuyệt đối từ khi bắt đầu điều trị đến khi kết thúc nghiên cứu.

Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Các định nghĩa

Các thuật ngữ khác nhau liên quan đến các phương diện khác nhau được sử dụng trong toàn bộ bản mô tả và các điểm yêu cầu bảo hộ. Các thuật ngữ này được hiểu theo nghĩa thông thường trong ngành trừ khi được quy định khác. Các thuật ngữ được định nghĩa cụ thể khác được hiểu theo ngữ cảnh nhất quán với các định nghĩa được đưa ra trong bản mô tả này.

Trong bản mô tả này và các yêu cầu bảo hộ đính kèm, dạng số ít "một" đề cập đến cả các số nhiều trừ khi có sự mô tả nội dung khác một cách rõ ràng. Do đó, ví dụ, "một tế bào" có thể hiểu là bao gồm cả sự kết hợp của hai hoặc nhiều tế bào, v.v.

Thuật ngữ "khoảng" sử dụng trong bản mô tả này để chỉ một giá trị có thể đo được như một số lượng, một khoảng thời gian v.v., có nghĩa bao hàm các giá trị biến đổi lên đến ±10 % so với giá trị xác định, sao cho các giá trị biến đổi này phù hợp để thực hiện các phương pháp được bộc lộ. Trừ khi được quy định khác, tất cả các chữ số chỉ số lượng của các thành phần, đặc tính như khối lượng phân tử, điều kiện phản ứng, v.v sử dụng trong bản mô tả này và các yêu cầu bảo hộ được hiểu là sẽ được điều chỉnh trong tất cả các trường hợp theo thuật ngữ "khoảng". Theo đó, trừ khi quy định khác đi, các thông số bằng số đưa ra trong mô tả và các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây là các con số xấp xỉ và có thể khác nhau tùy theo đặc tính mà bằng sáng chế này mong muốn đạt được. Cuối cùng, và không có ý giới hạn ứng dụng của học thuyết tương đương trong phạm vi các yêu cầu bảo hộ, mỗi thông số bằng số ít nhất phải được hiểu theo chữ số được tạo thành từ các số có nghĩa được công bố và áp dụng nguyên tắc làm tròn thông thường.

Bất kể các khoảng số và thông số bằng số đưa ra trong phạm vi rộng của sáng chế là các số xấp xỉ, các giá trị bằng số đưa ra trong các ví dụ cụ thể được đưa ra một cách chính xác nhất có thể. Tuy nhiên, giá trị bằng số bất kỳ thực ra cũng chứa một số lỗi nhất định có nguyên nhân tất yếu từ độ lệch chuẩn trong các phép đo thử nghiệm tương ứng của chúng.

Được "phân lập" có nghĩa là một thành phần sinh học (như axit nucleic, peptit hay protein) về cơ bản đã được tách ra, được tạo thành riêng ra từ, hoặc tinh lọc ra khỏi

các thành phần sinh học khác của sinh vật mà tại đó thành phần xuất hiện một cách tự nhiên, tức là các ARN và ADN thuộc nhiễm sắc thể và nằm ngoài nhiễm sắc thể, và các protein khác. Do đó, axit nucleic, peptit hay protein đã được "phân lập" bao gồm cả các axit nucleic và protein được tinh chế bằng các phương pháp tinh chế tiêu chuẩn. Axit nucleic, peptit hay protein đã được "phân lập" có thể là một phần trong thành phần và tiếp tục được phân lập nếu thành phần đó không phải là một phần của môi trường tự nhiên của axit nucleic, peptit hay protein đó. Thuật ngữ bao hàm cả các axit nucleic, peptit và protein được điều chế bằng cách biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào chủ và các axit nucleic được tổng hợp hóa học. Trong bản mô tả này, một kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được "phân lập" nhằm chỉ một kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên về cơ bản được tách ra khỏi các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên khác có các tính đặc hiệu kháng nguyên khác (ví dụ, kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với GPRC5D về căn bản được tách khỏi các kháng thể liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác ngoài GPRC5D). Tuy nhiên, kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với một epitope, thể đồng dạng hoặc biến thể của GPRC5D có thể có phản ứng chéo với các kháng nguyên liên quan khác, ví dụ từ các loài khác (như đồng đẳng loài của GPRC5D).

"Polynucleotit", đồng nghĩa với "phân tử axit nucleic" "nucleotit" hay "axit nucleic", chỉ polyribonucleotit hay polydeoxyribonucleotit bất kỳ, có thể là ARN hay ADN chưa điều hòa hoặc ARN hay ADN đã điều hòa. "Polynucleotit" bao gồm, không giới hạn, ADN sợi đơn và sợi kép, ADN là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép, các ARN sợi đơn và sợi kép, và ARN là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép, các phân tử lai chứa ADN và ARN có thể là sợi đơn hoặc, điển hình hơn, là sợi kép hoặc là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép. Ngoài ra, "polynucleotit" chỉ các vùng có cấu trúc ba mạch bao gồm ARN hoặc ADN hoặc cả ARN và ADN. Thuật ngữ polynucleotit còn bao gồm các ADN hoặc ARN chứa một hoặc nhiều base (gốc) đã điều hòa và ADN hoặc ARN với các khung được điều hòa cho mục đích ổn định hoặc cho các lý do khác. Các base "điều hòa" bao gồm, ví dụ, các base đã bổ sung nhóm bảo vệ trityl và các base không thông thường khác như inosin. Có thể thực hiện nhiều kiểu điều hòa khác nhau đối với ADN và ARN; do đó, "polynucleotit" bao gồm các dạng được điều hòa hóa học, điều hòa bằng enzym hoặc bằng cách chuyển hóa của polynucleotit như thường thấy trong tự nhiên, cũng như trong các dạng hóa học

đặc trưng của ADN và ARN của các vi rút và tế bào. "Polynucleotit" đồng thời bao gồm cả những mạch axit nucleic tương đối ngắn, thường được gọi là oligonucleotit.

Ý nghĩa của thuật ngữ "về căn bản là đồng dạng" có thể khác nhau tùy vào ngữ cảnh sử dụng thuật ngữ. Bởi sự biến đổi trình tự tự nhiên có khả năng tồn tại trong các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và các gen mã hóa chúng, người ta cho rằng sẽ tìm thấy sự biến đổi ở một mức độ nào đó bên trong các trình tự axit amin hoặc các gen mã hóa các kháng thể và các mảnh gắn kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này, với tác động rất ít hoặc không có tác động đến các đặc tính liên kết duy nhất của chúng (ví dụ, tính đặc hiệu và ái lực). Sự mong đợi này một phần là do sự suy biến của mã di truyền, và do thành tựu tiến hóa của các biến thể của trình tự axit amin bảo thủ, các nguyên nhân này không làm thay đổi đáng kể bản chất của protein được mã hóa. Do đó, trong ngữ cảnh các trình tự axit amin, "về căn bản là đồng dạng" có nghĩa là có sự đồng nhất ở mức ít nhất 65 % giữa hai hoặc nhiều trình tự. Tốt hơn là thuật ngữ này chỉ sự đồng nhất ở mức ít nhất 70 % giữa hai hoặc nhiều trình tự, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 75 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 80 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 85 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 90 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 91 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 92 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 93 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 94 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 95 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 96 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 97 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 98 %, và tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 99 % hoặc đồng nhất hơn nữa. Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự là hàm của số lượng vị trí đồng nhất của các trình tự (tức là % tương đồng = số lượng vị trí đồng nhất/tổng số các vị trí x 100), có tính đến số khoảng trống và chiều dài của mỗi khoảng trống, các khoảng trống cần được đưa vào để có sự bắt cặp tối ưu giữa hai trình tự. Phần trăm đồng nhất giữa hai nucleotit hoặc trình tự axit amin có thể, ví dụ, được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller, Comput. Appl. Biosci (Ứng dụng điện toán vào khoa học sinh học) 4, 11-17 (1988), được hợp nhất vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0), sử dụng bảng trọng số gốc PAM120, điểm phạt chiều dài khoảng trống bằng 12 và điểm phạt khoảng trống bằng 4. Ngoài ra, phần trăm đồng nhất

giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman và Wunsch, J. Mol. Biol. (Tạp chí sinh học phân tử) 48, 444-453 (1970).

Mức biến đổi này, diễn ra bên trong trình tự axit amin của protein mà không có tác động đáng kể lên chức năng của protein, thấp hơn nhiều so với mức của trình tự axit nucleic, do nguyên lý suy biến này không áp dụng cho các trình tự axit amin. Theo đó, trong ngữ cảnh kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, "về căn bản là đồng dạng" có nghĩa là các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên đồng nhất ở mức 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, hay 99 % với các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được mô tả. Các phương án khác bao gồm các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc các mảnh gắn kháng nguyên có khung, giàn giáo hoặc các vùng không liên kết khác không đồng nhất đáng kể với các kháng thể và mảnh gắn kháng nguyên trong bản mô tả này, nhưng có hợp nhất một hoặc nhiều CDR hoặc các trình tự cần thiết khác để tạo nên liên kết đồng nhất 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, hay 99 % với các trình tự này trong bản mô tả. "Vectơ" là một đơn vị sao chép, như plasmit, thực khuẩn, cosmid hoặc vi rút trong đó một đoạn axit nucleic khác có thể sẽ được chèn vào để có thể tạo nên sự sao chép hoặc biểu hiện đoạn đó.

Một "dòng tế bào vô tính" là một tập hợp các tế bào được dẫn xuất từ một tế bào hoặc tế bào sơ khai chung bằng quá trình nguyên phân. Một "dòng tế bào" là một dòng vô tính các tế bào sơ cấp có khả năng tăng trưởng ổn định trong ống nghiệm trong nhiều thế hệ. Trong một số ví dụ được cung cấp trong bản mô tả này, các tế bào được biến nạp bằng cách chuyển nhiễm các tế bào với ADN.

Các thuật ngữ "biểu hiện" và "tạo" được sử dụng đồng nghĩa trong bản mô tả này, và chỉ sự sinh tổng hợp một sản phẩm gen. Các thuật ngữ này có nghĩa sự phiên mã một gen tạo thành ARN. Các thuật ngữ này cũng có nghĩa là sự dịch mã ARN thành một hoặc nhiều polypeptit, và còn bao hàm tất cả các điều hòa diễn ra tự nhiên sau phiên mã và sau dịch mã. Sự biểu hiện hoặc tạo thành kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của chúng có thể nằm trong tế bào chất của tế bào, hoặc môi trường ngoại bào như môi trường sinh trưởng của môi trường nuôi cấy tế bào.

Các thuật ngữ "trị" hoặc "điều trị" chỉ sự thành công hoặc dấu hiệu thành công trong việc làm suy giảm hoặc cải thiện một thương tổn, bệnh lý hoặc tình trạng, bao gồm thông số chủ quan và khách quan bất kỳ như làm giảm bớt, thoái

lui, thu nhỏ các triệu chứng hoặc làm cho tình trạng trở nên dễ chịu hơn đối với người bệnh, làm chậm tốc độ thoái hóa hoặc đi xuống, khiến cho điểm cuối của thoái hóa bớt suy yếu hơn, cải thiện tình trạng thể chất và tinh thần của đối tượng, hoặc kéo dài thời gian sống sót. Có thể đánh giá điều trị bằng các thông số chủ quan hoặc khách quan; bao gồm các kết quả thăm khám lâm sàng, thăm khám thần kinh hoặc các đánh giá tâm thần.

"Lượng hữu hiệu" hay "lượng điều trị hữu hiệu" chỉ lượng có hiệu quả, với các liều lượng và trong các khoảng thời gian cần thiết, để đạt được hiệu quả điều trị mong muốn. Lượng điều trị hữu hiệu kháng thể GPRC5D x CD3 có thể khác nhau tùy theo các yếu tố như tình trạng bệnh, giới tính, độ tuổi và cân nặng của cá thể bệnh nhân, và khả năng của kháng thể trong việc mang lại đáp ứng mong muốn ở cá thể bệnh nhân. Lượng điều trị hữu hiệu đồng thời là một lượng mà trong đó các hiệu quả lợi ích điều trị của kháng thể hoặc một phần của kháng thể nhiều hơn so với các tác dụng có hại hoặc độc hại.

"Kháng thể" chỉ tất cả các lớp kháng thể globulin miễn dịch (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD, và IgY), bao gồm các dạng monome, polyme và tổng hợp, trừ khi được quy định khác. Thuật ngữ "kháng thể" cụ thể bao gồm các kháng thể đa dòng, các kháng thể đơn dòng (mAb), và các polypeptit giống kháng thể, như kháng thể tổng hợp và kháng thể nhân hóa.

"Các mảnh gắn kháng nguyên" là các cấu trúc protein bất kỳ có thể biểu hiện ái lực liên kết đối với một kháng nguyên cụ thể. Các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm các loại được cung cấp bằng kỹ thuật đã biết bất kỳ, như các kỹ thuật phân cắt bằng enzym, tổng hợp peptit và tái tổ hợp. Một số mảnh gắn kháng nguyên được cấu tạo từ các phần kháng thể nguyên vẹn, vẫn giữ được tính đặc hiệu gắn kháng nguyên của phân tử kháng thể mẹ. Ví dụ, các mảnh gắn kháng nguyên có thể bao gồm ít nhất một vùng biến đổi (vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ) hoặc một hoặc nhiều CDR của kháng thể đã biết để liên kết với một kháng nguyên cụ thể. Các ví dụ về các mảnh gắn kháng nguyên phù hợp bao gồm, nhưng không giới hạn, các diabody (kháng thể đặc hiệu đôi tái tổ hợp) và phân tử đơn chuỗi và các phân tử Fab (mảnh gắn kháng nguyên), F(ab')2, Fc, Fabc, và Fv, các kháng thể đơn chuỗi (Sc), các chuỗi nhẹ kháng thể riêng lẻ, các chuỗi nặng kháng thể riêng lẻ, thể dung hợp tổng hợp giữa các chuỗi kháng thể hoặc CDR và các

protein khác, giàn giáo protein, monome hoặc đime chuỗi nặng, monome hoặc đime chuỗi nhẹ, đime chứa một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ, một mảnh đơn trị chứa các miền VL, VH, CL và CH1, hoặc kháng thể đơn trị như được mô tả trong WO2007059782, các mảnh lưỡng trị bao gồm hai mảnh Fab liên kết với nhau bằng cầu đisulfua tại vùng bản lề, mảnh Fd chứa chủ yếu các miền V.sub.H và C.sub.H1; mảnh Fv chứa chủ yếu các miền VL và VH của một nhánh của kháng thể, mảnh dAb (Ward và cộng sự, Nature (Tự nhiên) 341, 544-546 (1989)), bao gồm chủ yếu miền VH và đồng thời được gọi là các kháng thể miền (Holt và cộng sự; Trends Biotechnol. (Các xu hướng trong công nghệ sinh học) 11/2003; 21(11):484-90); họ lạc đà hoặc nanobody (kháng thể đơn miền) (Revets và cộng sự; Expert Opin Biol Ther. (Quan điểm chuyên gia về học thuyết sinh học) 01/2005; 5(1):111-24); vùng xác định bổ sung (CDR) phân lập, v.v. Có thể sử dụng tất cả các lớp kháng thể để sản xuất các mảnh gắn kháng nguyên. Ngoài ra, các mảnh gắn kháng nguyên có thể bao gồm các khung protein không phải kháng thể có thể tích hợp thành công các đoạn polypeptit theo hướng tạo ra ái lực đối với kháng nguyên quan tâm đã cho, như các giàn giáo protein. Các mảnh gắn kháng nguyên có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc bằng cách phân cắt bằng enzym hay bằng hóa chất đối với các kháng thể nguyên vẹn. Cụm từ "kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó" có thể được sử dụng để biểu thị việc mảnh gắn kháng nguyên đã cho hợp nhất một hoặc nhiều đoạn axit amin của kháng thể được đề cập trong cụm từ.

Thuật ngữ "CDR" và dạng số nhiều "các CDR" chỉ vùng xác định bổ sung (CDR) mà ba vùng này tạo nên đặc điểm liên kết của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDRL1, CDRL2 và CDRL3) và tạo nên đặc điểm liên kết của vùng biến đổi chuỗi nặng (CDRH1, CDRH2 và CDRH3). Các CDR góp phần vào hoạt tính chức năng của phân tử kháng thể và được tách bởi các trình tự axit amin bao gồm vùng giàn giáo hoặc khung. Các độ dài và ranh giới CDR xác định chính xác tùy thuộc vào các hệ thống đánh số và phân loại khác nhau. Vì vậy, các CDR có thể được gọi theo Kabat, Chothia, điểm tiếp xúc hoặc bất kỳ sự xác định ranh giới nào khác. Mặc dù các ranh giới khác nhau, mỗi hệ thống này có một số mức độ chồng lấp cấu thành "vùng siêu biến" trong các trình tự biến đổi. Vì vậy, sự xác định CDR theo các hệ thống này có thể khác nhau về độ dài và các khu vực ranh giới đối với vùng khung liền kề. Xem, ví dụ Kabat và cộng sự, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (Trình tự protein có lợi ích

miễn dịch), tái bản lần 5 NIH số công bố 91-3242 (1991); Chothia và cộng sự, "Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins" (Cấu trúc hợp chuẩn cho các vùng siêu biến của globulin miễn dịch), *J. Mol. Biol. (Tạp chí sinh học phân tử)* 196:901 (1987); và MacCallum và cộng sự, "Antibody-Antigen Interactions (Sự tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể): Contact Analysis and Binding Site Topography" (Phân tích tiếp xúc và địa thể điểm gắn), J. Mol. Biol. (Tạp chí sinh học phân tử) 262:732 (1996)), mỗi tham chiếu này được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn.

Thông thường, các CDR tạo cấu trúc vòng có thể được phân loại thành cấu trúc hợp chuẩn. Thuật ngữ "cấu trúc hợp chuẩn" chỉ cấu hình chuỗi chính được sử dụng bởi các vòng gắn kháng nguyên (CDR). Từ các nghiên về cứu cấu trúc so sánh đã phát hiện ra rằng 5 trong 6 vòng gắn kháng nguyên chỉ có tập hợp toàn bộ các loại (repertoire) cấu hình có sẵn giới hạn. Mỗi cấu trúc hợp chuẩn có thể được đặc trưng hóa bởi các góc xoắn của khung polypeptit. Do đó, các vòng tương ứng giữa các kháng thể có thể có các cấu trúc 3 chiều rất giống nhau, mặc dù sự biến đổi trình tự axit amin cao ở hầu hất các phần của vòng (Chothia và cộng sự, "Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins" (Cấu trúc hợp chuẩn cho các vùng siêu biến của globulin miễn dịch) *J. Mol. Biol. (Tạp chí sinh học phân tử)* 196:901 (1987); Chothia và cộng sự, "Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions" (Cấu hình của các vùng siêu biến globulin miễn dịch) I 342:877 (1989); Martin và Thornton, "Structural Families in Loops of Homologous Proteins (Họ cấu trúc trong các vòng của protein tương đồng: Automatic Classification, Modelling and Application to Antibodies" (Phân loại tự động, tạo mẫu và áp dụng cho các kháng thể) *J. Mol. Biol. (Tạp chí sinh học phân tử)* 263:800 (1996), mỗi tham chiếu này được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn). Ngoài ra, có mối quan hệ giữa cấu trúc vòng được sử dụng và các trình tự axit amin quanh nó. Cấu hình của lớp hợp chuẩn cụ thể được xác định theo độ dài của vòng và các đơn phân axit amin nằm ở các vị trí chính trong vòng, cũng như trong khung được bảo thủ (tức là, nằm ngoài vòng). Vì thế, có thể thực hiện phân định cho lớp hợp chuẩn cụ thể dựa trên sự xuất hiện các đơn phân axit amin chính này.

Thuật ngữ "polypeptit" được sử dụng thay thế cho thuật ngữ "protein" và theo nghĩa rộng nhất chỉ hợp chất gồm hai hoặc nhiều axit amin tiểu phần, chất tương tự axit amin hoặc peptidomimetic. Các tiểu phần có thể được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit. Trong phương án khác, tiểu phần có thể được liên kết bởi các liên kết khác, ví dụ, este, ete, v.v. Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ "axit amin" chỉ axit amin tự nhiên và/hoặc không tự nhiên hoặc tổng hợp, bao gồm glyxin và cả các chất đồng phân quang học D và L, các chất tương tự axit amin và peptidomimetic. Peptit của ba axit amin trở lên thường được gọi là oligopeptit nếu chuỗi peptit ngắn. Nếu chuỗi peptit dài, peptit thường được gọi là polypeptit hoặc protein.

"Liên kết đặc hiệu" hay "liên kết một cách đặc hiệu đặc hiệu" hoặc các dẫn xuất của chúng khi được sử dụng trong ngữ cảnh về các kháng thể, hay mảnh kháng thể, thể hiện sự liên kết với một hoặc nhiều epitope của protein quan tâm qua các miền được mã hóa bởi các gen globulin miễn dịch hoặc các mảnh của các gen globulin miễn dịch, mà không liên kết ưu tiên các phân tử khác trong mẫu chứa tập hợp hỗn hợp các phân tử. Thông thường, kháng thể liên kết với kháng nguyên cùng nguồn gốc bằng K_d nhỏ hơn khoảng $1x10^{-8}$ M, như được đo bằng xét nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt hoặc xét nghiệm liên kết tế bào. Các cụm từ như kháng thể "đặc hiệu [kháng nguyên]" (ví dụ, kháng thể đặc hiệu GPRC5D) có nghĩa là kháng thể đã nêu liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đã nêu.

"Polynucleotit", đồng nghĩa với "phân tử axit nucleic", "nucleotit" hay "axit nucleic", chỉ polyribonucleotit hay polydeoxyribonucleotit bất kỳ, có thể là ARN hay ADN chưa điều hòa hoặc ARN hay ADN đã điều hòa. "Polynucleotit" bao gồm, không giới hạn, ADN sợi đơn và sợi kép, ADN là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép, các ARN sợi đơn và sợi kép, và ARN là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép, các phân tử lai chứa ADN và ARN có thể là sợi đơn hoặc, điển hình hơn, là sợi kép hoặc là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép. Ngoài ra, "polynucleotit" chỉ các vùng có cấu trúc ba mạch bao gồm ARN hoặc ADN hoặc cả ARN và ADN. Thuật ngữ polynucleotit còn bao gồm các ADN hoặc ARN chứa một hoặc nhiều base (gốc) đã điều hòa và ADN hoặc ARN với các khung được điều hòa cho mục đích ổn định hoặc cho các lý do khác. Các base "điều hòa" bao gồm, ví dụ, các base đã bổ sung

nhóm bảo vệ trityl và các base không thông thường khác như inosin. Có thể thực hiện nhiều kiểu điều hòa khác nhau đối với ADN và ARN; do đó, "polynucleotit" bao gồm các dạng được điều hòa hóa học, điều hòa bằng enzym hoặc bằng cách chuyển hóa của polynucleotit như thường thấy trong tự nhiên, cũng như trong các dạng hóa học đặc trưng của ADN và ARN của các vi rút và tế bào. "Polynucleotit" đồng thời bao gồm cả những mạch axit nucleic tương đối ngắn, thường được gọi là oligonucleotit.

"Vectơ" là một đơn vị sao chép, như plasmit, thực khuẩn, cosmid hoặc vi rút trong đó một đoạn axit nucleic khác có thể sẽ được chèn vào để có thể tạo nên sự sao chép hoặc biểu hiện đoạn đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào chủ" có thể là loại tế bào bất kỳ, ví dụ, tế bào sơ cấp, tế bào trong môi trường nuôi cấy, hoặc tế bào từ dòng tế bào. Trong các phương án cụ thể, thuật ngữ "tế bào chủ" chỉ tế bào được chuyển nhiễm với phân tử axit nucleic và thế hệ con hoặc thế hệ con tiềm năng của tế bào này. Thế hệ con của tế bào này có thể không đồng nhất với tế bào mẹ được chuyển nhiễm với phân tử axit nucleic, ví dụ, do các đột biến hoặc ảnh hưởng môi trường có thể xảy ra ở các thế hệ tiếp theo hoặc sự hợp nhất phân tử axit nucleic thành bộ gen tế bào chủ. Các thuật ngữ "biểu hiện" và "tạo" được sử dụng đồng nghĩa trong bản mô tả này, và chỉ sự sinh tổng hợp một sản phẩm gen. Các thuật ngữ này có nghĩa sự phiên mã một gen tạo thành ARN. Các thuật ngữ này cũng có nghĩa là sự dịch mã ARN thành một hoặc nhiều polypeptit, và còn bao hàm tất cả các điều hòa diễn ra tự nhiên sau phiên mã và sau dịch mã. Sự biểu hiện hoặc tạo thành kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của chúng có thể nằm trong tế bào chất của tế bào, hoặc môi trường ngoại bào như môi trường sinh trưởng của môi trường nuôi cấy tế bào. Ý nghĩa của thuật ngữ "về căn bản là đồng dạng" có thể khác nhau tùy vào ngữ cảnh sử dụng thuật ngữ. Bởi sự biến đổi trình tự tự nhiên có khả năng tồn tại trong các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và các gen mã hóa chúng, người ta cho rằng sẽ tìm thấy sự biến đổi ở một mức độ nào đó bên trong các trình tự axit amin hoặc các gen mã hóa các kháng thể và các mảnh gắn kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này, với tác động rất ít hoặc không có tác động đến các đặc tính liên kết duy nhất của chúng (ví dụ, tính đặc hiệu và ái lực). Sự mong đợi này một phần là do sự suy biến của mã di truyền, và do thành tựu tiến hóa của các biến thể

của trình tự axit amin bảo thủ, các nguyên nhân này không làm thay đổi đáng kể bản chất của protein được mã hóa. Do đó, trong ngữ cảnh các trình tự axit amin, "về căn bản là đồng dạng" có nghĩa là có sự đồng nhất ở mức ít nhất 65 % giữa hai hoặc nhiều trình tự. Tốt hơn là thuật ngữ này chỉ sự đồng nhất ở mức ít nhất 70 % giữa hai hoặc nhiều trình tự, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 75 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 80 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 85 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 90 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 91 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 92 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 93 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 94 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 95 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 96 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 97 %, tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 98 %, và tốt hơn là đồng nhất ở mức ít nhất 99 % hoặc đồng nhất hơn nữa. Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự là hàm của số lượng vị trí đồng nhất của các trình tự (tức là % tương đồng = số lượng vị trí đồng nhất/tổng số các vị trí x 100), có tính đến số khoảng trống và chiều dài của mỗi khoảng trống, các khoảng trống cần được đưa vào để có sự bắt cặp tối ưu giữa hai trình tự. Phần trăm đồng nhất giữa hai nucleotit hoặc trình tự axit amin có thể, ví dụ, được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller, Comput. Appl. Biosci (Ứng dụng điện toán vào khoa học sinh học) 4, 11-17 (1988), được hợp nhất vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0), sử dụng bảng trọng số gốc PAM120, điểm phạt chiều dài khoảng trống bằng 12 và điểm phạt khoảng trống bằng 4. Ngoài ra, phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman và Wunsch, J. Mol. Biol. (Tạp chí sinh học phân tử) 48, 444-453 (1970).

Mức biến đổi này, diễn ra bên trong trình tự axit amin của protein mà không có tác động đáng kể lên chức năng của protein, thấp hơn nhiều so với mức của trình tự axit nucleic, do nguyên lý suy biến này không áp dụng cho các trình tự axit amin. Theo đó, trong ngữ cảnh kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, "về căn bản là đồng dạng" có nghĩa là các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên đồng nhất ở mức 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, hay 99 % với các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên được mô tả. Các phương án khác bao gồm các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc các mảnh gắn kháng nguyên có khung, giàn giáo hoặc các vùng không

liên kết khác không đồng nhất đáng kể với các kháng thể và mảnh gắn kháng nguyên trong bản mô tả này, nhưng có hợp nhất một hoặc nhiều CDR hoặc các trình tự cần thiết khác để tạo nên liên kết đồng nhất 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, hay 99 % với các trình tự này trong bản mô tả.

Thuật ngữ "đối tượng" chỉ các động vật là con người và không phải là con người, bao gồm tất cả các loài động vật có xương sống, ví dụ, động vật có vú và không có vú, như các loài linh trưởng không phải là con người, chuột, thỏ, cừu, chó, mèo, ngựa, bò, gà, lưỡng cư, và bò sát. Trong nhiều phương án về các phương pháp được trình bày, đối tượng là con người.

Thuật ngữ "chuyển hướng " hoặc "sự chuyển hướng" được sử dụng trong bản mô tả này chỉ khả năng của kháng thể GPRC5D x CD3 dẫn hướng hoạt tính của tế bào T một cách hiệu quả, từ tính đặc hiệu cùng gốc vốn có của nó hướng đến phản ứng kháng các tế bào biểu hiện GPRC5D.

Thuật ngữ "mẫu" trong bản mô tả này chỉ tập hợp các chất lỏng, tế bào hoặc mô đồng dạng (ví dụ, mô khối u cắt bỏ bằng phẫu thuật, mô sinh thiết, bao gồm tế bào chọc hút bằng kim nhỏ), được phân lập từ đối tượng, cũng như các chất lỏng, tế bào hoặc mô trong cơ thể đối tượng. Trong một số phương án, mẫu là chất lỏng sinh học. Chất lỏng sinh học thông thường là chất lỏng ở nhiệt độ sinh lý và có thể bao gồm các chất lỏng tự nhiên có trong, được hút ra từ, được ép hoặc được chiết từ đối tượng hoặc nguồn sinh học. Một số chất lỏng sinh học được dẫn xuất từ các mô, cơ quan hay vùng cục bộ cụ thể và một số chất lỏng sinh học khác có thể được lấy từ nhiều chỗ hơn hay toàn thân ở đối tượng hoặc nguồn sinh học. Các ví dụ về chất lỏng sinh học bao gồm máu, huyết thanh và dịch huyết thanh, huyết tương, bạch huyết, nước tiểu, nước bọt, dịch nang, giọt nước mắt, phân, đờm, dịch tiết của niêm mạc của các mô tiết và các cơ quan, dịch tiết âm đạo, dịch cổ trướng như các loại dịch liên quan đến các khối u không rắn, dịch màng phổi, màng tim, màng bụng, bụng và các khoang cơ thể khác, chất lỏng được thu thập từ việc rửa phế quản và v.v. Các chất lỏng sinh học cũng có thể bao gồm các dung dịch lỏng tiếp xúc với đối tượng hoặc nguồn sinh học, ví dụ, môi trường nuôi cấy tế bào và cơ quan bao gồm môi trường điều hòa tế bào hoặc cơ quan, chất lỏng thụt rửa và v.v. Trong bản

mô tả này, thuật ngữ "mẫu" bao gồm các chất được lấy từ đối tượng hoặc các chất có trong đối tượng.

Một "tiêu chuẩn đã biết" có thể là một dung dịch có lượng hoặc hàm lượng GPRC5D đã biết, trong đó dung dịch có thể là dung dịch xuất hiện tự nhiên, như mẫu từ bệnh nhân mắc ung thư giai đoạn sớm, trung, muộn, tiến triển, hoặc tĩnh, hoặc dung dịch có thể là dung dịch tổng hợp như nước có chất đệm có một lượng đã biết GPRC5D được pha loãng trong đó. Tiêu chuẩn đã biết trong bản mô tả này có thể bao gồm GPRC5D được phân lập từ đối tượng, protein GPRC5D được tinh chế hoặc tái tổ hợp, hoặc một giá trị hàm lượng GPRC5D liên quan đến tình trạng bệnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "Thụ thể liên kết với protein G họ C nhóm 5 thành phần D" và "GPRC5D" cụ thể, ví dụ, bao gồm protein GPRC5D người như được mô tả trong GenBank mã truy cập BC069341, trình tự tham chiếu NCBI: NP_061124.1 và UniProtKB/Swiss-Prot mã truy cập Q9NZD1 (xem Brauner-Osborne, H. và cộng sự 2001, Biochim. Biophys. Acta 1518, 237-248).

Thuật ngữ "CD3" chỉ phức hợp đa tiểu phần protein CD3 người. Phức hợp đa tiểu phần protein CD3 được tạo thành từ 6 chuỗi polypeptit khác nhau. Các chuỗi này bao gồm chuỗi Cd3γ (SwissProt P09693), chuỗi Cd3δ (SwissProt P04234), hai chuỗi Cd3ε (SwissProt P07766), và một đồng đime chuỗi CD3 ζ (SwissProt 20963), và kết hợp với chuỗi α và β của thụ thể tế bào T. Thuật ngữ "CD3" bao gồm biến thể, thể đồng dạng và đồng đẳng loài CD3 bất kỳ được biểu hiện tự nhiên bởi các tế bào (bao gồm các tế bào T) hoặc có thể được biểu hiện trên các tế bào chuyển nhiễm với các gen hoặc ADN bổ sung mã hóa các polypeptit này, trừ khi có quy định khác.

"Kháng thể GPRC5D x CD3" là kháng thể đa hiệu, tùy chọn là kháng thể đặc hiệu đôi, bao gồm hai vùng gắn kháng nguyên khác nhau, một vùng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên GPRC5D và vùng kia liên kết đặc hiệu với CD3. Kháng thể đa hiệu có thể là kháng thể đặc hiệu đôi, diabody, hoặc phân tử tương tự (ví dụ, xem mô tả các diabody trong *PNAS USA* 90(14), 6444-8 (1993)). Trong bản mô tả này, các kháng thể đặc hiệu đôi, diabody, hoặc phân tử tương tự có thể liên kết với đích phù hợp bất kỳ ngoài phần của GPRC5D. Thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu đôi" được hiểu là một kháng thể có hai vùng gắn kháng nguyên khác nhau được xác định bằng các trình tự kháng

thể khác nhau. Có thể hiểu là chúng liên kết các đích khác nhau nhưng cũng liên kết với các epitope khác nhau trong cùng một đích.

"Mẫu tham chiếu" là mẫu có thể được so sánh với mẫu khác, như mẫu thử nghiệm, để đặc trưng hóa mẫu được so sánh. Mẫu tham chiếu sẽ có một số đặc tính được đặc trưng hóa, là cơ sở để so sánh với mẫu thử nghiệm. Ví dụ, có thể sử dụng mẫu tham chiếu làm chuẩn về mức GPRC5D chỉ báo đối tượng mắc ung thư. Mẫu tham chiếu không cần phải được phân tích song song với mẫu thử nghiệm, do đó trong một số trường hợp mẫu tham chiếu có thể là một giá trị hoặc phạm vi bằng số đã được xác định trước đó để đặc trưng hóa một tình trạng đã cho, như các mức GPRC5D chỉ báo ung thư ở đối tượng. Thuật ngữ cũng bao gồm các mẫu được sử dụng cho mục đích so sánh, có liên quan đến trạng thái sinh lý hoặc tình trạng bệnh, như bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D, nhưng có mức GPRC5D chưa xác định.

Thuật ngữ "tiến triển", được sử dụng trong ngữ cảnh bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D có sự tiến triển, bao gồm sự thay đổi bệnh ung thư từ trạng thái ít nghiêm trọng sang trạng thái nghiêm trọng hơn. Trạng thái này có thể bao gồm mức gia tăng trong số lượng hoặc trong tính nghiêm trọng của các khối u, mức độ di căn, tốc độ phát triển hay lan rộng của bệnh ung thư, v.v. Ví dụ, "sự tiến triển của bệnh ung thư ruột kết" bao gồm sự tiến triển của bệnh ung thư này từ trạng thái ít nghiêm trọng sang trạng thái nghiêm trọng hơn, như sự tiến triển từ giai đoạn I sang giai đoạn II, từ giai đoạn II sang giai đoạn III, v.v.

Thuật ngữ "thoái lui", được sử dụng trong ngữ cảnh bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D có sự thoái lui, bao gồm sự thay đổi bệnh ung thư từ trạng thái nghiêm trọng hơn sang trạng thái không nghiêm trọng bằng. Trạng thái này có thể bao gồm mức giảm trong số lượng hoặc trong tính nghiêm trọng của các khối u, mức độ di căn, tốc độ phát triển hay lan rộng của bệnh ung thư, v.v. Ví dụ, "sự thoái lui của bệnh ung thư ruột kết" bao gồm sự thoái lui của bệnh ung thư này từ trạng thái nghiêm trọng sang trạng thái ít nghiêm trọng hơn, như sự thoái lui từ giai đoạn III sang giai đoạn II, từ giai đoạn II sang giai đoạn I, v.v.

Thuật ngữ "ổn định", được sử dụng trong ngữ cảnh bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D có tình trạng ổn định, nhằm để mô tả một tình trạng bệnh không hoặc đã

không thay đổi đủ nhiều trong một giai đoạn lâm sàng phù hợp để có thể được coi là tiến triển hoặc thoái lui.

Các phương án được mô tả trong bản mô tả này không bị giới hạn trong các phương pháp, thuốc thử, hợp chất, chế phẩm hay hệ sinh học cụ thể, và các yếu tố này dĩ nhiên là có thể thay đổi.

Các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và mảnh gắn kháng nguyên

Bản mô tả này mô tả các kháng thể đơn dòng phân lập hoặc các mảnh gắn kháng nguyên liên kết đặc hiệu với GPRC5D. Cấu trúc chung của một phân tử kháng thể bao gồm một miền gắn kháng nguyên, bao gồm các chuỗi nặng và nhẹ, và miền Fc có các chức năng khác nhau, bao gồm chức năng cố định bổ thể và liên kết các thụ thể kháng thể.

Các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên trong bản mô tả bao gồm tất cả các lớp kháng thể IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, và các multime tổng hợp của cấu trúc globulin miễn dịch bốn chuỗi. Các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên trong bản mô tả còn bao gồm lớp kháng thể IgY thường thấy trong huyết thanh hoặc lòng đỏ trứng của gà mái hoặc gà tây.

Các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và mảnh gắn kháng nguyên có thể được dẫn xuất từ loài bất kỳ bằng các phương tiện tái tổ hợp. Ví dụ, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có thể có nguồn gốc từ chuột nhắt, chuột, dê, ngựa, lợn, trâu, bò, gà, thỏ, họ lạc đà, lừa, con người, hoặc thể tổng hợp của chúng. Để cho con người sử dụng, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có nguồn gốc không phải là người có thể được thay đổi về cấu trúc hoặc gen để ít tính kháng nguyên hơn khi đưa vào cho bệnh nhân là con người sử dụng.

Trong một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là thể tổng hợp. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "tổng hợp" chỉ một kháng thể, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, có ít nhất một số phần của ít nhất một miền biến đổi được dẫn xuất từ trình tự axit amin của kháng thể của một động vật có vú không phải là con người, động vật gặm nhấm, hoặc bò sát, trong khi các phần còn lại của kháng thể, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, được dẫn xuất từ con người.

Trong một số phương án, các kháng thể là kháng thể nhân hóa. Các kháng thể nhân hóa có thể là globulin miễn dịch tổng hợp, chuỗi globulin miễn dịch hoặc các mảnh của nó (như Fv, Fab, Fab', F(ab')2 hoặc các trình tự con gắn kháng nguyên khác của các kháng thể) chứa trình tự tối thiểu được dẫn xuất từ globulin miễn dịch không phải của con người. Phần lớn các kháng thể nhân hóa là các globulin miễn dịch người (kháng thể người nhận) trong đó các gốc từ vùng xác định bổ sung (CDR) của người nhận được thay thế bằng các gốc từ CDR của các loài không phải là người (kháng thể của đối tượng hiến tặng) như chuột nhắt, chuột hoặc thỏ có tính đặc hiệu, ái lực và khả năng mong muốn. Nhìn chung, kháng thể được nhân hóa sẽ bao gồm gần như tất cả trong ít nhất một, và thông thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các vùng CDR tương ứng với các vùng của globulin miễn dịch không phải của người và tất cả hoặc gần như tất cả vùng khung là vùng khung của trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể nhân hóa có thể bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định globulin miễn dịch (Fc), thông thường là globulin miễn dịch của người.

Trong bản mô tả này, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có thể xuất hiện dưới nhiều dạng khác nhau, nhưng sẽ bao gồm một hoặc nhiều CDR kháng thể có mặt trong Bảng 1.

Bản mô tả này mô tả các kháng thể phân lập và các mảnh gắn kháng nguyên liên kết miễn dịch đặc hiệu với GPRC5D. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc các mảnh gắn kháng nguyên là IgG người hoặc các dẫn xuất của nó. Mặc dù các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc các mảnh gắn kháng nguyên được đưa ra làm ví dụ trong bản mô tả này là của người, các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên ví dụ có thể là thể được tổng hợp.

Một số phương án đề xuất kháng thể đặc hiệu GPRC5D, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, bao gồm chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2 và CDR3 của kháng thể bất kỳ trong các kháng thể được trình bày trong Bảng 1. Một số phương án đề xuất kháng thể đặc hiệu GPRC5D, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, bao gồm chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2 và CDR3 của kháng thể bất kỳ trong các kháng thể được trình bày trong Bảng 1, và chuỗi nhẹ chứa CDR1, CDR2 và CDR3 của kháng thể bất kỳ trong các kháng thể được trình bày trong Bảng 1.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 1, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 5, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 9. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 1, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 5, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 9, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 16, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 19. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 52. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 52 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 56. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 2, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 6, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 10. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 2, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 6, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 10, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 16, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 19. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 53. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 53 và miền biến đổi chuỗi

nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 56. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 3, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 7, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 11. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 3, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 7, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 11, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 17, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 20. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 54. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 54 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 57. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 4, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 8, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 12. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 4, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 8, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 12, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 15, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 21. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung

của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 55. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 55 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 58. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 61, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 67, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 72. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 61, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 67, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 72, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 78, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 80. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 82. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 82 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 92. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 2, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 30. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn

kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 2, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 30, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 16, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 19. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 83. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 83 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 56. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 27, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 29, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 73. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 27, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 29, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 73, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 17, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 20. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 84. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 84 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 57. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này

phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 27, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 29, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 11. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 27, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 29, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 11, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 17, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 20. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 85. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 85 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 57. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 62, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 68, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 74. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 62, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 68, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 74, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 17, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 20. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc

đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 86. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 86 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 57. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 63, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 69, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 75. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 63, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 69, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 75, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 78, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 80. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 87. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 87 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 92. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 64, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 70, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 12. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 64, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 70, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ:

12, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 15, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 21. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 88. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 88 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 58. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 65, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 68, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 76. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 65, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 68, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 76, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 95, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 79, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 81. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 89. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 89 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 93. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 66, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 71, và CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 77. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 66, CDR2 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 71, CDR3 của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 77, CDR1 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 15, CDR2 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 21. Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 91. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 91 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SỐ ID TRÌNH TỰ: 94. Miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể trình bày trong đoạn này phù hợp để bao gồm các cấu trúc đặc hiệu đôi trong đó một nhánh là nhánh kháng GPRC5D.

Trong một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là IgG, hoặc dẫn xuất của nó, ví dụ các lớp kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Trong một số phương án trong đó kháng thể là lớp kháng thể IgG1, kháng thể bao gồm vùng Fc của IgG1 (SỐ ID TRÌNH TỰ 60).

SỐ ID TRÌNH TỰ 60

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trong một số phương án trong đó kháng thể thuộc lớp kháng thể IgG4, kháng thể bao gồm các thay thế S228P, L234A, và L235A tại vùng Fc của nó (SỐ ID TRÌNH TỰ 59).

SỐ ID TRÌNH TỰ 59

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Các kháng thể đặc hiệu được xác định bởi CDR và/hoặc trình tự miền biến đổi được trình bày ở các đoạn trên có thể bao gồm các điều hòa này.

Bản mô tả này cũng mô tả các polynucleotit phân lập mã hóa các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên liên kết miễn dịch đặc hiệu với GPRC5D. Có thể bao gồm polynucleotit phân lập có khả năng mã hóa các đoạn của miền biến đổi trong bản mô tả này trong cùng vectơ, hoặc trong các vectơ khác nhau để tạo các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên. Trình tự polynucleotit mẫu mã hóa kháng thể GPRC5D như sau:

Trình tự chuỗi nặng (SỐ ID TRÌNH TỰ: 96):

atggcctgggtctggaccctgctgttcctgatggccgctgcccagagcatccaggcccaggtgcagctggtgca
gagcggcgccgaggtgaagaagcccggcgccagcgtgaaggtgagctgcaaggccagcggctacagcttcaccggcta
caccatgaactgggtgcggcaggcccccggccagggcctggagtggatgggcctgatcaacccctacaacagcgacacc
aactacgcccagaagctgcagggccgggtgaccatgaccaccgacaccagcaccagcaccgcctacatggagctgcgg
agcctgcggagcgacgacaccgccgtgtactactgcgcccgggtggccctgcgggtggccctggactactggggccagg
gcaccctggtgaccgtgagcagcgcctccaccaagggcccatccgtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctcc
gagagcacagccgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccct
gaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctcc
agcagcttgggcacgaaaacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtc

caaatatggtcccccatgcccaccatgcccagcacctgaggccgccgggggaccatcagtcttcctgttccccccaaaacc
caaggacactctcatgatctcccggacccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccgaggtcc
agttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtac
cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagg
cctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgcccccat
cccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggag
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctac
agcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaac
cactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaatga

Trình tự chuỗi nhẹ (SỐ ID TRÌNH TỰ:90):
atgcgggtgctggcccagctgctgggactgctgctgctgtgcttccctggcgccagatgcgacatccagatgacccagagc
cccagcagcctgagcgccagcgtgggcgaccgggtgaccatcacctgcaaggccagccagaacgtggccacccacgtg
ggctggtaccagcagaagcccggcaaggcccccaagcggctgatctacagcgccagctaccggtacagcggcgtgccc
agccggttcagcggcagcggcagcggcaccgagttcaccctgaccatcagcaacctgcagcccgaggacttcgccacct
actactgccagcagtacaaccggtacccctacaccttcggccagggcaccaagctggagatcaagcgtacggtggctgca
ccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatccca
gagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacag
caaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgc
gaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttga

Các polynucleotit mã hóa protein gắn kháng nguyên tái tổ hợp cũng nằm trong phạm vi của bản công bố sáng chế này. Trong một số phương án, các polynucleotit được mô tả (và các peptit mà chúng mã hóa) bao gồm một trình tự dẫn đầu. Có thể sử dụng trình tự dẫn đầu bất kỳ được biết tới trong ngành. Trình tự dẫn đầu có thể bao gồm, nhưng không bị hạn chế trong vị trí cắt giới hạn hoặc vị trí khởi đầu dịch mã.

Các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này bao gồm các biến thể có một hoặc nhiều axit amin được thay thế, bị làm mất hoặc được bổ sung giữ lại các đặc tính sinh học (ví dụ, ái lực liên kết hoặc hoạt tính tế bào thực thi miễn dịch) của các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh

gắn kháng nguyên. Trong ngữ cảnh của sáng chế, các quy tắc ký hiệu sau được sử dụng, trừ khi được quy định khác, để mô tả một đột biến; i) sự thay thế axit amin tại vị trí đã cho được ghi là, ví dụ, S228P có nghĩa là Serin ở vị trí 228 được thay thế bằng Prolin; và ii) đối với các biến thể đặc hiệu, sử dụng mã ba hoặc một chữ cái cụ thể, bao gồm các mã Xaa và X để biểu thị đơn phân axit amin bất kỳ. Do đó, Serin thay thế cho Arginin ở vị trí 228 được ký hiệu là: S228P, hay đơn phân axit amin bất kỳ thay thế cho Serin ở vị trí 228 được ký hiệu là S228P. Trường hợp Serin ở vị trí 228 bị làm mất được biểu thị bằng ký hiệu S228*. Người có trình độ trong ngành có thể tạo ra các biến thể có một hoặc nhiều axit amin được thay thế, bị làm mất hoặc được bổ sung.

Các biến thể này có thể bao gồm: (a) các biến thể trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được thay thế bằng các axit amin bảo thủ hoặc không bảo thủ, (b) các biến thể trong đó một hoặc nhiều axit amin được bổ sung cho hoặc bị làm mất từ polypeptit, (c) các biến thể trong đó một hoặc nhiều axit amin bao gồm một nhóm thay thế, và (d) các biến thể trong đó polypeptit được dung hợp với peptit hoặc polypeptit khác là đối tác dung hợp, nhãn protein hoặc gốc hóa học khác, chúng có thể mang lại các đặc tính có lợi cho polypeptit như, ví dụ, epitope cho kháng thể, trình tự polyhistiđin, gốc biotin, v.v. Trong bản mô tả này, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên có thể bao gồm các biến thể trong đó các đơn phân axit amin từ một loài được thay thế cho đơn phân tương ứng ở loài khác, ở các vị trí bảo thủ hoặc không được bảo thủ. Trong các phương án khác, các đơn phân axit amin tại các vị trí không bảo thủ được thay thế bằng các đơn phân bảo thủ hoặc không bảo thủ. Các kỹ thuật nhằm thu được các biến thể này, bao gồm các kỹ thuật di truyền (làm mất, đột biến, v.v.), kỹ thuật hóa học và kỹ thuật enzym, đã được những người có trình độ bình thường trong ngành biết đến.

Các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên trong bản mô tả này có thể bao gồm một số lớp kháng thể, như IgM, IgD, IgG, IgA và IgE. Trong một số phương án, lớp kháng thể là IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, tốt nhất là IgG1 hoặc IgG4. Tính đặc hiệu của kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của chúng chủ yếu được quyết định bởi cấu trúc và trình tự axit amin của các CDR. Do đó, các CDR của một lớp kháng thể có thể được truyền tới lớp kháng thể khác mà không làm thay đổi tính đặc hiệu của kháng nguyên. Hoặc, các kỹ thuật đã được thiết lập để khiến các tế bào lai chuyển từ sản xuất một lớp kháng thể sang lớp khác

(chuyển đổi lớp kháng thể) mà không làm thay đổi tính đặc hiệu của kháng nguyên. Theo đó, các lớp kháng thể này nằm trong phạm vi các kháng thể hoặc đoạn gắn kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này.

Bản mô tả cũng cung cấp các vectơ chứa các polynucleotit được mô tả tại đây. Các vectơ có thể là vectơ biểu hiện. Do đó, các vectơ biểu hiện tái tổ hợp chứa một trình tự mã hóa popypeptit quan tâm được dự kiến thuộc phạm vi của bản bộc lộ sáng chế này. Vectơ biểu hiện có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự bổ sung như, nhưng không giới hạn trong, các trình tự điều hòa (ví dụ, vùng khởi động, vùng tăng cường), dấu ấn chọn lọc, và tín hiệu polyadenyl hóa. Các vectơ để biến nạp một phạm vi rộng lớn các tế bào chủ đã được biết rộng rãi và bao gồm, nhưng không giới hạn trong, các plasmit, phagemid, cosmid, vi rút Baculo, bacmid, và các nhiễm sắc thể vi khuẩn nhân tạo (BAC), các nhiễm sắc thể nấm men nhân tạo (YAC), và các vectơ vi khuẩn, nấm men và vi rút khác.

Các vectơ biểu hiện tái tổ hợp trong phạm vi bản mô tả bao gồm các mảnh axit nucleic tổng hợp, các mảnh axit nucleic thuộc bộ gen hoặc các mảnh axit nucleic dẫn xuất từ ADN bổ sung mã hóa ít nhất một protein tái tổ hợp có thể liên kết được với các yếu tố điều hòa phù hợp. Các yếu tố điều hòa này có thể bao gồm vùng khởi động phiên mã, các trình tự mã hóa các điểm bám ribô thể của ARN thông tin phù hợp, và các trình tự điều khiển kết thúc dịch mã và phiên mã. Các vectơ biểu hiện, cụ thể là các vectơ biểu hiện của động vật có vú, cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều các yếu tố không phiên mã, như gốc sao chép, vùng khởi động hoặc vùng tăng cường phù hợp liên kết với gen được biểu hiện, các trình tự không phiên mã hai bên đầu 5' hoặc 3' khác, các trình tự không dịch mã đầu 5' hoặc 3' (như các điểm bám ribô thể cần thiết), điểm polyadenyl hóa, vị trí cho và nhận cắt nối, hoặc các trình tự kết thúc phiên mã. Gốc sao chép tạo khả năng sao chép trong vật chủ cũng có thể được bao gồm.

Các trình tự điều khiển phiên mã và dịch mã trong các vectơ biểu hiện sẽ được sử dụng trong các tế bào biến nạp của động vật có xương sống có thể được cung cấp từ các nguồn vi rút. Các vectơ ví dụ có thể được cấu tạo như Okayama và Berg mô tả trong 3 *Mol. Cell. Biol.* (*Sinh học phân tử và tế bào*). 280 (1983).

Trong một số phương án, trình tự mã hóa mảnh gắn kháng nguyên hoặc kháng thể được đặt dưới sự điều khiển của một vùng khởi động cơ định có hiệu lực như các

vùng khởi động cho các gen sau: transferaza phosphoribosyl hypoxantin (HPRT), adenosin deaminaza, pyruvat kinaza, beta-actin, myosin người, hemoglobin người, creatin cơ người, và các gen khác. Ngoài ra, có nhiều vùng khởi động của vi rút hoạt động một cách cơ định trong các tế bào nhân thực và phù hợp để sử dụng với các phương án được mô tả. Các vùng khởi động của vi rút bao gồm, nhưng không giới hạn trong, vùng khởi động sớm tức thì của vi rút cytomegalo (CMV), vùng khởi động sớm và muộn của SV40, vùng khởi động của vi rút gây ung thư vú chuột nhắt (MMTV), các đoạn lặp lại đầu dài (LTR) của vi rút bạch cầu Maloney, vi rút gây ra hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải ở người (HIV), vi rút Epstein Barr (EBV), vi rút sarcôm Rous (RSV), và các retrovirus khác, và các vùng khởi động thymiđin kinaza của vi rút herpes đơn dạng. Trong một phương án, trình tự mã hóa kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó được đặt dưới sự điều khiển của một vùng khởi động cảm ứng như vùng khởi động metallothionein, vùng khởi động cảm ứng tetraxyclin, vùng khởi động cảm ứng doxycycline, các vùng khởi động chứa một hoặc nhiều yếu tố đáp ứng kích thích interferon (ISRE) như R 2',5'-oligoadenylate synthetaza của kinaza protein R, các gen Mx, ADAR1, v.v.

Trong bản mô tả này, các vectơ có thể chứa một hoặc nhiều vị trí tiếp nhận ribô thể bên trong (Internal Ribosome Entry Site, IRES). Việc các vectơ dung hợp chứa một trình tự IRES có thể có lợi trong việc tăng cường biểu hiện của một số protein. Trong một số phương án, hệ vectơ sẽ bao gồm một hoặc nhiều điểm polyadenyl hóa (ví dụ, SV40), các điểm này đứng trước hoặc đứng sau các trình tự axit nucleic đã đề cập ở phần trên. Các thành phần vectơ có thể liên kết tiếp giáp với nhau, hoặc được sắp xếp sao cho có thể tạo khoảng cách tối ưu để biểu hiện các sản phẩm gen (tức là, bằng cách đưa các nucleotit "đoạn đệm" vào giữa các ORF) hoặc có thể được định vị theo cách khác. Các yếu tố điều hòa, như mô-tip IRES cũng có thể được sắp xếp để tạo khoảng cách tối ưu dành cho biểu hiện.

Các vectơ có thể bao gồm các dấu ấn chọn lọc, điều này đã được biết đến rộng rãi trong ngành. Các dấu ấn chọn lọc bao gồm các dấu ấn chọn lọc dương và các dấu ấn chọn lọc âm, ví dụ, các gen kháng kháng sinh (ví dụ gen kháng neomyxin, gen kháng hygromyxin, gen kháng kanamyxin, gen kháng tetraxyclin, gen kháng penixilin, gen kháng puromyxin, gen kháng blastixđin), gen glutamat synthase, các

chất dẫn xuất HSV-TK, HSV-TK để chọn lọc ganciclovir, hoặc gen phosphorylaza purin nucleosit của vi khuẩn để chọn 6-metylpurin (Gadi và cộng sự, 7 *Gene Ther*. (Liệu pháp gen) 1738-1743 (2000)). Trình tự axit nucleic mã hóa dấu ấn chọn lọc hoặc điểm tách dòng có thể đứng trước hoặc đứng sau trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit quan tâm hoặc điểm tách dòng.

Trong bản mô tả này, các vectơ có thể được sử dụng để biến nạp các tế bào khác nhau với các gen mã hóa các kháng thể hay mảnh gắn kháng nguyên đã nêu. Ví dụ, có thể sử dụng các vectơ để tạo các tế bào sản xuất kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên. Do đó, phương án khác mô tả các tế bào chủ biến nạp với các vectơ chứa trình tự axit nucleic mã hóa một kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GPRC5D, như các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên đã được mô tả và nêu ví dụ trong bản mô tả này.

Chúng ta đã biết rất nhiều kỹ thuật đưa các gen ngoại lai vào các tế bào, có thể dùng các kỹ thuật này để tạo kết cấu các tế bào tái tổ hợp để thực hiện các phương pháp đã mô tả, theo các phương án khác nhau đã được mô tả và nêu ví dụ trong bản mô tả này. Các kỹ thuật sử dụng phải giúp truyền ổn định trình tự gen không tương đồng đến tế bào chủ, sao cho thế hệ con của tế bào có thể di truyền và biểu hiện trình tự gen không tương đồng này, đồng thời các chức năng sinh lý và phát triển cần thiết của các tế bào nhận không bị gián đoạn. Các kỹ thuật có thể sử dụng bao gồm nhưng không giới hạn trong kỹ thuật vận chuyển nhiễm sắc thể (ví dụ, dung hợp tế bào, vận chuyển gen qua trung gian nhiễm sắc thể, vận chuyển gen qua trung gian vi bào), các phương pháp vật lý (chuyển nhiễm, dung hợp tế bào bị mất vách (spheroplast), vi tiêm, xung điện, chất mang hạt mỡ), vận chuyển vectơ vi rút (ví dụ, các vi rút ADN tái tổ hợp, các vi rút ARN tái tổ hợp) và phương pháp tương tự (được mô tả trong Cline, 29 *Pharmac. Ther*. (Dược lý học và Điều trị) 69-92 (1985)). Cũng có thể sử dụng kỹ thuật kết tủa canxi phosphat và dung hợp cảm ứng polyetylen glycol (PEG) tế bào vi khuẩn bị mất vách với các tế bào của động vật có vú để biến nạp tế bào.

Các tế bào phù hợp để biểu hiện các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên trong bản mô tả này tốt hơn là các tế bào nhân thực, tốt hơn là các tế bào có nguồn gốc thực vật, động vật gặm nhấm, hay nguồn gốc con người, ví dụ, nhưng không giới hạn trong các tế bào NSO, CHO, CHOK1, perC.6, Tk-ts13, BHK,

HEK293, các tế bào COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L, các tế bào u tủy C127, 3T3, HeLa, NS1, Sp2/0, và các dòng tế bào BHK, và các loại tế bào khác. Ngoài ra, có thể đạt được biểu hiện của kháng thể bằng cách sử dụng các tế bào lai. Các phương pháp tạo tế bào lai đã được thiết lập trong ngành.

Trong bản mô tả này, các tế bào được biến nạp bằng các vectơ biểu hiện có thể được chọn hoặc sàng lọc để biểu hiện tái tổ hợp các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên đã mô tả. Các tế bào dương tính tái tổ hợp được mở rộng và sàng lọc để tìm kiếm các dòng phụ biểu hiện kiểu hình mong muốn, như các đặc điểm tăng trưởng được tăng cao, các đặc điểm được biểu hiện ở mức cao, hoặc khả năng tạo ra các protein có các đặc trưng hóa sinh mong muốn, ví dụ, bằng cách điều hòa protein hay điều hòa sau dịch mã biến đổi. Có thể đạt được các kiểu hình này dựa vào các đặc tính vốn có của dòng tế bào phụ đã cho hoặc bằng cách đột biến. Các đột biến có thể được tạo bằng cách sử dụng hóa chất, ánh sáng có bước sóng-tia UV, bức xạ, vi rút, tác nhân gây đột biến được chèn vào, ức chế cơ chế sửa chữa lỗi ADN bắt cặp sai, hoặc kết hợp các phương pháp này.

Các phương pháp sử dụng kháng thể đặc hiệu GPRC5D để điều trị bệnh

Bản mô tả này cung cấp các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên của chúng để sử dụng trong liệu pháp điều trị. Cụ thể, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể hữu ích trong điều trị bệnh ung thư, như bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Theo đó, sáng chế cung cấp phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm bước cho bệnh nhân sử dụng kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này, như các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của nó. Ví dụ, việc sử dụng kháng thể có thể là bằng cách can thiệp bằng tương tác GPRC5D-thụ thể hoặc bằng cách trong đó kháng thể được tiếp hợp với độc tố, từ đó hướng độc tố nhắm đích đến tế bào ung thư biểu hiện GPRC5D. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D bao gồm ung thư hạch bạch huyết, như bệnh đa u tủy (MM). Các kháng thể để sử dụng trong các phương pháp này bao gồm các kháng thể được mô tả ở phần trên trong bản mô tả này, ví dụ, kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó có các đặc điểm trình bày trong Bảng 1, ví dụ, các CDR hoặc các trình tự miền biến đổi, cũng như các kháng thể được đề cập trong các phần trình bày khác về chúng.

Trong một số phương án trong bản mô tả này, các đặc tính của tế bào thực thi miễn dịch của kháng thể đặc hiệu GPRC5D có thể được tăng cường hoặc làm câm bằng cách điều hòa Fc bằng các kỹ thuật được các chuyên gia trong ngành biết. Ví dụ, các chức năng của tế bào thực thi Fc như liên kết C1q, gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), thực bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), giảm biểu hiện thụ thể trên bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B; BCR), v.v. có thể được cung cấp và/hoặc được điều khiển bằng cách điều hòa các đơn phân trong Fc chịu trách nhiệm cho các hoạt tính này.

"Gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể" hay "ADCC" chỉ sự phản ứng qua trung gian tế bào trong đó các tế bào gây độc tế bào không đặc hiệu biểu hiện thụ thể Fc (FcR) (ví dụ, tế bào sát thủ tự nhiên (NK), bạch cầu trung tính, và đại thực bào) nhận biết được kháng thể được gắn trên tế bào đích và sau đó khiến cho tế bào đích bị ly giải.

Khả năng của các kháng thể đơn dòng gây ra cơ chế ADCC có thể được tăng cường bằng cách kiến tạo thành phần oligosacarit của chúng. IgG1 hoặc IgG3 người có dạng glycosyl hóa tại vị trí N tại Asn297 với phần lớn polysacarit có dạng hai râu phổ biến G0, G0F, G1, G1F, G2 hoặc G2F. Các kháng thể được tạo ra bằng các tế bào CHO không được kiến tạo thường có hàm lượng đường fucoza trong polysacarit ít nhất bằng khoảng 85 %. Việc loại bỏ fucoza lõi từ oligosacarit dạng phức hai râu gắn với vùng Fc sẽ làm tăng cường cơ chế ADCC của kháng thể bằng liên kết Fc.gamma.RIIIa được cải thiện mà không làm thay đổi liên kết kháng nguyên hoặc hoạt tính của CDC. Có thể thu được các kháng thể đơn dòng (mAb) này bằng các phương pháp khác nhau được báo cáo là dẫn tới biểu hiện thành công các kháng thể được khử fucoza hóa tương đối cao mang oligosacarit Fc dạng phức hai râu như đối chứng có hàm lượng molan đồng thẩm áp của môi trường nuôi cấy (Konno và cộng sự, Cytotechnology (Công nghệ tế bào) 64:249-65, 2012), ứng dụng dòng CHO biến thể Lec13 làm dòng tế bào chủ (Shields và cộng sự, J Biol Chem (Tạp chí Sinh hóa học) 277:26733-26740, 2002), ứng dụng dòng CHO biến thể EB66 làm dòng tế bào chủ (Olivier và cộng sự, MAbs (Các kháng thể đơn dòng); 2(4), 2010; Chế bản điện tử trước khi in bản giấy; PMID:20562582), ứng dụng dòng tế bào của tế bào lai của chuột YB2/0 làm dòng tế bào chủ (Shinkawa và cộng sự,

J Biol Chem (Tạp chí Sinh hóa học) 278:3466-3473, 2003), đưa ARN can thiệp nhỏ đặc hiệu kháng gen.alpha.1,6-fucosyltrasferaza (FUT8) (Mori và cộng sự, Biotechnol Bioeng (Công nghệ sinh học và Kỹ thuật sinh học) 88:901-908, 2004), hoặc đồng biểu hiện β-1,4-N-axetylglucosaminyltransferaza III và golgi α-mannosiđaza II hoặc chất ức chế alpha-mannosiđaza I hiệu lực cao, kifunensin (Ferrara và cộng sự, J Biol Chem (Tạp chí Sinh hóa học) 281:5032-5036, 2006, Ferrara và cộng sự, Biotechnol Bioeng (Công nghệ sinh học và Kỹ thuật sinh học) 93:851-861, 2006; Xhou *và cộng sự*, Biotechnol Bioeng (Công nghệ sinh học và Kỹ thuật sinh học) 99:652-65, 2008).

Trong một số phương án trong bản mô tả này, cơ chế ADCC gây ra bởi kháng thể kháng GPRC5D cũng có thể được tăng cường bởi một số thay thế nhất định trong Fc kháng thể. Các thay thế ví dụ là, ví dụ, các thay thế tại các vị trí axit amin 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 hoặc 430 (việc đánh số gốc theo chỉ mục EU) như được mô tả trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 6,737,056.

Các phương pháp phát hiện GPRC5D

Bản mô tả cung cấp các phương pháp phát hiện GPRC5D trong mẫu sinh học bằng cách cho mẫu tiếp xúc với kháng thể, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Trong bản mô tả này, các mẫu được dẫn xuất từ nước tiểu, máu, huyết thanh, huyết tương, nước bọt, dịch cổ trướng, tế bào tuần hoàn, tế bào khối u tuần hoàn, tế bào không kết hợp với mô (*tức là* tế bào tự do), các mô (*ví dụ*, các mô khối u cắt bỏ bằng phẫu thuật, mô sinh thiết, bao gồm tế bào chọc hút bằng kim nhỏ), các tiêu bản mô v.v. Trong một số phương án, các phương pháp trong bản mô tả bao gồm phương pháp phát hiện GPRC5D trong mẫu sinh học bằng cách cho mẫu tiếp xúc với các kháng thể đặc hiệu GPRC5D, hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của nó.

Trong một số phương án, mẫu có thể được tiếp xúc với một hoặc nhiều kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của nó như được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, mẫu có thể được tiếp xúc với kháng thể đặc hiệu GPRC5D thứ nhất hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, sau đó tiếp xúc với kháng thể đặc hiệu GPRC5D thứ hai hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể thứ nhất hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó và kháng thể thứ hai hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó không phải cùng một loại kháng thể hoặc mảnh gắn kháng

nguyên. Trong một số phương án, kháng thể thứ nhất hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó có thể được để trên một bề mặt, như đĩa nhiều lỗ, chip, hay cơ chất tương đương trước khi tiếp xúc với mẫu. Trong một số phương án, kháng thể thứ nhất hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó có thể không được để trên, hay đi kèm với bất kỳ vật gì trước khi tiếp xúc với mẫu.

Các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này có thể được gắn nhãn để dễ phát hiện. Trong một số phương án, các kháng thể được gắn nhãn và các mảnh gắn kháng nguyên có thể hỗ trợ phát hiện GPRC5D bằng các phương pháp đã nêu trong bản mô tả. Những người có trình độ trong ngành đã biết nhiều loại nhãn như thế này. Ví dụ, các nhãn phù hợp bao gồm, nhưng không giới hạn trong chất đồng vị phóng xạ, nhãn huỳnh quang, nhãn epitope, bioti, nhãn nhóm mang màu, nhãn ECL, hay enzym. Cụ thể hơn, các nhãn trong bản mô tả bao gồm ruteni, ^{111}In-DOTA, ^{111}In- axit đietylenetriaminpentaaxetic (DTPA), peroxyđaza ở cây cải ngựa, phosphataza kiềm và beta-galactosiđaza, poly-histiđin (gắn nhãn HIS), thuốc nhuộm acriđin, thuốc nhuộm xyanin, thuốc nhuộm flo, thuốc nhuộm oxazin, thuốc nhuộm phenanthriđin, thuốc nhuộm rođamin, thuốc nhuộm Alexa Fluor®, v.v.

Các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên trong bản mô tả có thể được sử dụng trong nhiều loại xét nghiệm khác nhau để phát hiện GPRC5D trong mẫu sinh học. Một số xét nghiệm phù hợp bao gồm, nhưng không giới hạn trong phân tích lai thấm protein (western blot analysis), xét nghiệm miễn dịch dùng đồng vị phóng xạ, cộng hưởng Plasmon bề mặt, xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang, kết tủa miễn dịch, thẩm tách cân bằng, khuếch tán miễn dịch, xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang (ECL), hóa mô miễn dịch, phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS) hoặc xét nghiệm ELISA.

Trong một số phương án trong bản mô tả này, việc phát hiện các tế bào ung thư biểu hiện GPRC5D ở đối tượng có thể được sử dụng để xác định đối tượng có thể được điều trị bằng một loại thuốc điều trị định hướng kháng GPRC5D.

GPRC5D có mặt ở mức có thể phát hiện trong các mẫu máu và huyết thanh. Do đó, bản mô tả cung cấp các phương pháp phát hiện GPRC5D trong mẫu sinh học dẫn xuất từ máu, như mẫu huyết thanh, bằng cách cho mẫu tiếp xúc với kháng

thể liên kết đặc hiệu với GPRC5D, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Mẫu máu, hoặc dẫn xuất của nó, có thể được pha loãng, cất phân đoạn, hoặc được xử lý thêm để tạo ra một mẫu để có thể thực hiện phương pháp được mô tả trên đây. Trong một số phương án, có thể phát hiện GPRC5D trong mẫu máu, hoặc dẫn xuất của nó bằng các xét nghiệm bất kỳ đã biết trong ngành, nhưng không giới hạn trong các xét nghiệm sau: phân tích lai thấm protein (western blot analysis), xét nghiệm miễn dịch dùng đồng vị phóng xạ, cộng hưởng Plasmon bề mặt, xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang, kết tủa miễn dịch, thẩm tách cân bằng, khuếch tán miễn dịch, xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang (ECL), hóa mô miễn dịch, phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS) hoặc xét nghiệm ELISA.

Các phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư

Bản mô tả này cũng trình bày các phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D ở đối tượng. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D bao gồm ung thư hạch bạch huyết, như bệnh đa u tủy (MM). Trong một số phương án, như được mô tả ở phần trên, việc phát hiện GPRC5D trong mẫu sinh học như mẫu máu hay mẫu huyết thanh, đã mang lại khả năng chẩn đoán bệnh ung thư ở đối tượng cho mẫu. Hoặc, trong một số phương án, các mẫu khác như mẫu mô học, mẫu tế bào chọc hút bằng kim nhỏ, mô khối u cắt bỏ, tế bào tuần hoàn, tế bào khối u tuần hoàn, v.v., có thể được sử dụng để đánh giá liệu người hiến tặng mẫu có mắc ung thư hay không. Trong một số phương án, có thể đã biết đối tượng cho mẫu mắc bệnh ung thư, nhưng loại ung thư có thể chưa được chẩn đoán hoặc chẩn đoán ban đầu có thể chưa rõ ràng, thì việc phát hiện GPRC5D trong mẫu sinh học lấy từ đối tượng có thể cho phép, hoặc giải thích, việc chẩn đoán ung thư. Ví dụ, có thể đã biết đối tượng mắc bệnh ung thư, nhưng có thể chưa biết hoặc chưa biết rõ bệnh ung thư đó có phải là ung thư biểu hiện GPRC5D hay không.

Trong một số phương án, các phương pháp được mô tả có liên quan đến bước đánh giá liệu đối tượng có đang mắc ung thư biểu hiện GPRC5D hay không bằng cách xác định lượng GPRC5D có trong mẫu sinh học lấy từ đối tượng; và bước so sánh lượng GPRC5D quan sát được với lượng GPRC5D trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu, trong đó sự chênh lệch giữa lượng GPRC5D trong mẫu lấy từ đối tượng

và lượng GPRC5D trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu là chỉ báo cho biết đối tượng có đang mắc ung thư biểu hiện GPRC5D hay không. Trong phương án khác, có thể so sánh lượng GPRC5D quan sát được trong mẫu sinh học lấy từ đối tượng với các mức GPRC5D có liên quan đến một số dạng hoặc giai đoạn ung thư nhất định, để xác định dạng hoặc giai đoạn của bệnh ung thư của đối tượng. Trong một số phương án, lượng GPRC5D trong mẫu lấy từ đối tượng được đánh giá bằng cách cho mẫu tiếp xúc với kháng thể liên kết miễn dịch đặc hiệu với GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, như các kháng thể đặc hiệu GPRC5D được mô tả trong bản mô tả này. Mẫu được đánh giá về sự có mặt của GPRC5D có thể được dẫn xuất từ nước tiểu, máu, huyết thanh, huyết tương, nước bọt, dịch cổ trướng, tế bào tuần hoàn, tế bào khối u tuần hoàn, tế bào không kết hợp với mô (*tức là* tế bào tự do), các mô (*ví dụ*, các mô khối u cắt bỏ bằng phẫu thuật, mô sinh thiết, bao gồm tế bào chọc hút bằng kim nhỏ), các tiêu bản mô v.v. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D bao gồm ung thư huyết học, như bệnh đa u tủy (MM). Trong một số phương án, đối tượng là con người.

Trong một số phương án, phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D sẽ bao gồm: bước cho mẫu sinh học của đối tượng tiếp xúc với kháng thể đặc hiệu GPRC5D, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó (như các loại dẫn xuất từ các kháng thể và mảnh kháng thể trong Bảng 1), bước định lượng GPRC5D có trong mẫu liên kết với kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, bước so sánh lượng GPRC5D có trong mẫu với một tiêu chuẩn đã biết hoặc mẫu tham chiếu; và bước xác định liệu mức GPRC5D của đối tượng có rơi vào trong phạm vi các mức GPRC5D liên quan đến bệnh ung thư hay không. Trong một phương án bổ sung, phương pháp chẩn đoán có thể có thêm bước cho sử dụng hoặc kê đơn một loại thuốc điều trị ung thư đặc hiệu. Trong phương án khác, phương pháp chẩn đoán có thể có thêm bước chuyển kết quả xác định để hỗ trợ việc điều trị bệnh ung thư. Trong một số phương án, thuốc điều trị ung thư đặc hiệu có thể được định hướng kháng các bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D, như các kháng thể đa đặc hiệu GPRC5D x CD3 như được mô tả trong bản mô tả này.

Trong một số phương án, các phương pháp được mô tả có liên quan đến bước đánh giá liệu đối tượng có đang mắc ung thư biểu hiện GPRC5D hay không bằng cách xác định lượng GPRC5D có trong mẫu máu hoặc huyết thanh lấy từ đối tượng;

và bước so sánh lượng GPRC5D quan sát được với lượng GPRC5D trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu, trong đó sự chênh lệch giữa lượng GPRC5D trong mẫu lấy từ đối tượng và lượng GPRC5D trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu là chỉ báo cho biết đối tượng có đang mắc ung thư biểu hiện GPRC5D hay không.

Trong một số phương án, mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu có thể được lấy từ đối tượng không mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Trong một số phương án, mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu có thể được lấy từ đối tượng mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Trong một số phương án, trong đó mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu được lấy từ đối tượng không mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D, khi lượng GPRC5D quan sát được trong mẫu thử tăng so với mức quan sát được trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu, thì mức tăng này sẽ là chỉ báo rằng đối tượng đang được đánh giá đã bị mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Trong một số phương án, trong đó mẫu đối chứng được lấy từ đối tượng không mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D, khi lượng GPRC5D quan sát được trong mẫu thử giảm hoặc bằng so với mức quan sát được trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu, thì mức giảm hoặc bằng này sẽ là chỉ báo rằng đối tượng đang được đánh giá không bị mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Trong một số phương án, trong đó mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu được lấy từ đối tượng mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D, khi lượng GPRC5D quan sát được trong mẫu thử tương tự so với mức quan sát được trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu, thì mức tương tự này sẽ là chỉ báo rằng đối tượng đang được đánh giá đã bị mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Trong một số phương án, trong đó mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu được lấy từ đối tượng mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D, khi lượng GPRC5D quan sát được trong mẫu thử giảm so với mức quan sát được trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu, thì mức giảm này sẽ là chỉ báo rằng đối tượng đang được đánh giá không bị mắc bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D.

Trong một số phương án, lượng GPRC5D trong mẫu sinh học lấy từ đối tượng được đánh giá bằng cách cho mẫu tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu với GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, như các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này. Mẫu được đánh giá về sự có mặt của GPRC5D có thể được dẫn xuất từ mẫu máu, mẫu huyết thanh, tế bào tuần hoàn, tế bào khối u tuần hoàn,

tế bào không kết hợp với mô (*tức là* tế bào tự do), các mô (*ví dụ*, các mô khối u cắt bỏ bằng phẫu thuật, mô sinh thiết, bao gồm tế bào chọc hút bằng kim nhỏ), các tiêu bản mô v.v.

Trong các phương án khác nhau, lượng GPRC5D được xác định bằng cách cho mẫu tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu với GPRC5D, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Trong một số phương án, mẫu có thể được tiếp xúc với một hoặc nhiều loại kháng thể liên kết đặc hiệu với GPRC5D, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Trong một số phương án, mẫu có thể được tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu GPRC5D thứ nhất hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, sau đó tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu GPRC5D thứ hai hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Các kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc các mảnh gắn kháng nguyên như được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong khả năng này.

Có thể sử dụng các kết hợp khác nhau của các kháng thể đặc hiệu GPRC5D và các mảnh gắn kháng nguyên để cung cấp kháng thể "thứ nhất" và "thứ hai" hoặc các mảnh gắn kháng nguyên để thực hiện các phương pháp chẩn đoán đã nêu. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D bao gồm các loại ung thư hạch bạch huyết, như bệnh đa u tủy (MM).

Trong một số phương án, lượng GPRC5D được xác định bằng phương pháp phân tích lai thấm protein (western blot analysis), xét nghiệm miễn dịch dùng đồng vị phóng xạ, xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang, kết tủa miễn dịch, thẩm tách cân bằng, khuếch tán miễn dịch, xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang (ECL), hóa mô miễn dịch, phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS) hoặc xét nghiệm ELISA.

Trong các phương án khác nhau về các phương pháp chẩn đoán đã mô tả, mẫu đối chứng hoặc mẫu tham chiếu được sử dụng. Mẫu này có thể là mẫu đối chứng xét nghiệm dương tính hoặc âm tính đảm bảo xét nghiệm sử dụng được thực hiện đúng; ví dụ, đối chứng xét nghiệm như vậy có thể được sử dụng chung cho các xét nghiệm hóa mô miễn dịch. Hoặc, mẫu có thể là một tham chiếu chuẩn hóa cho lượng GPRC5D trong mẫu sinh học lấy từ một đối tượng khỏe mạnh. Trong một số phương án, có thể so sánh mức GPRC5D quan sát được của đối tượng thử nghiệm với mức GPRC5D quan sát được trong các mẫu từ các đối tượng đã biết là mắc bệnh ung thư

biểu hiện GPRC5D. Trong một số phương án, đối tượng đối chứng có thể bị mắc một bệnh ung thư cụ thể. Trong một số phương án, đối tượng đối chứng được biết là đã bị mắc bệnh ung thư giai đoạn sớm, bệnh ung thư này có thể không phải hoặc có thể là bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Trong một số phương án, đối tượng đối chứng được biết là đã bị mắc bệnh ung thư giai đoạn giữa, bệnh ung thư này có thể không phải hoặc có thể là bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Trong một số phương án, đối tượng đối chứng được biết là đã bị mắc bệnh ung thư giai đoạn cuối, bệnh ung thư này có thể không phải hoặc có thể là bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D.

Các phương pháp theo dõi bệnh ung thư

Bản mô tả này cũng trình bày các phương pháp theo dõi bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D ở đối tượng. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D bao gồm các loại ung thư hạch bạch huyết, như bệnh đa u tủy (MM). Trong một số phương án, các phương pháp được mô tả có liên quan đến bước đánh giá liệu bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D đang tiến triển, đang thoái lui hay trong tình trạng ổn định bằng cách xác định lượng GPRC5D có trong mẫu thử lấy từ đối tượng; và bước so sánh lượng GPRC5D quan sát được với lượng GPRC5D trong mẫu sinh học lấy được bằng cách tương tự từ đối tượng ở một thời điểm trước đó, trong đó sự chênh lệch giữa lượng GPRC5D trong mẫu thử và trong mẫu lấy trước đó là chỉ báo cho biết bệnh ung thư đang tiến triển, đang thoái lui hay đang trong tình trạng ổn định. Về vấn đề này, mẫu thử có lượng GPRC5D tăng, so với lượng quan sát được ở mẫu lấy từ trước, có thể chỉ báo sự tiến triển của bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Ngược lại, mẫu thử có lượng GPRC5D giảm, so với lượng quan sát được ở mẫu lấy từ trước, có thể chỉ báo sự thoái lui của bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D.

Theo đó, mẫu thử có lượng GPRC5D chênh lệch không đáng kể, so với lượng quan sát được ở mẫu lấy từ trước có thể chỉ báo tình trạng ổn định của bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Trong một số phương án, lượng GPRC5D trong mẫu sinh học lấy từ đối tượng được đánh giá bằng cách cho mẫu tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu với GPRC5D hoặc mảnh kháng thể của nó, như các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này. Mẫu được đánh giá về sự có mặt của GPRC5D có thể được dẫn xuất từ nước tiểu,

máu, huyết thanh, huyết tương, nước bọt, dịch cổ trướng, tế bào tuần hoàn, tế bào khối u tuần hoàn, tế bào không kết hợp với mô (tức là tế bào tự do), các mô (ví dụ, mô khối u cắt bỏ bằng phẫu thuật, mô sinh thiết, bao gồm tế bào chọc hút bằng kim nhỏ), các tiêu bản mô, v.v. Trong một số phương án, đối tượng là con người.

Trong một số phương án, phương pháp theo dõi bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D sẽ bao gồm: bước cho mẫu sinh học của đối tượng tiếp xúc với kháng thể đặc hiệu GPRC5D, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó (như các loại dẫn xuất từ các kháng thể và mảnh kháng thể trong Bảng 1), bước định lượng GPRC5D có trong mẫu, bước so sánh lượng GPRC5D có trong mẫu với lượng GPRC5D xác định được trong mẫu sinh học lấy được bằng cách tương tự từ cùng một đối tượng ở thời điểm sớm hơn; và bước xác định mức GPRC5D của đối tượng có thay đổi theo thời gian hay không. Mẫu thử có lượng GPRC5D tăng so với lượng quan sát được ở mẫu lấy từ trước có thể chỉ báo sự tiến triển của bệnh ung thư. Ngược lại, mẫu thử có lượng GPRC5D giảm so với lượng quan sát được ở mẫu lấy từ trước có thể chỉ báo sự thoái lui của bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Theo đó, mẫu thử có lượng GPRC5D chênh lệch không đáng kể so với lượng quan sát được ở mẫu lấy từ trước có thể chỉ báo tình trạng ổn định của bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D. Trong một số phương án, chỉ cần so sánh các mức GPRC5D của mẫu với chuẩn đã biết hoặc mẫu tham chiếu, hoặc có thể so sánh thêm với các mức GPRC5D quan sát được của mẫu được đánh giá ở thời điểm sớm hơn. Trong một phương án bổ sung, phương pháp chẩn đoán có thể có thêm bước cho sử dụng một loại thuốc điều trị ung thư đặc hiệu. Trong một số phương án, thuốc điều trị ung thư đặc hiệu có thể được định hướng kháng các bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D.

Trong các phương án khác nhau, lượng GPRC5D được xác định bằng cách cho mẫu tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu với GPRC5D, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Trong một số phương án, mẫu có thể được tiếp xúc với một hoặc nhiều loại kháng thể liên kết đặc hiệu với GPRC5D, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Trong một số phương án, mẫu có thể được tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu GPRC5D thứ nhất hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, sau đó tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu GPRC5D thứ hai hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Các kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong khả năng này.

Có thể sử dụng các kết hợp khác nhau của các kháng thể và các mảnh gắn kháng nguyên như trong Bảng 1 để cung cấp kháng thể "thứ nhất" và "thứ hai" hoặc các mảnh gắn kháng nguyên để thực hiện các phương pháp theo dõi đã nêu. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D bao gồm ung thư huyết học, như bệnh đa u tủy (MM).

Trong một số phương án, lượng GPRC5D được xác định bằng phương pháp phân tích lai thấm protein (western blot analysis), xét nghiệm miễn dịch dùng đồng vị phóng xạ, xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang, kết tủa miễn dịch, thẩm tách cân bằng, khuếch tán miễn dịch, xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang (ECL), hóa mô miễn dịch, phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS) hoặc xét nghiệm ELISA.

Kit phát hiện GPRC5D

Bản mô tả còn cung cấp các kit phát hiện GPRC5D trong mẫu sinh học. Các kit này bao gồm một hoặc nhiều các kháng thể đặc hiệu GPRC5D đã mô tả, hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của chúng, và các hướng dẫn sử dụng kit.

Kháng thể đặc hiệu GPRC5D hoặc mảnh gắn kháng nguyên được cung cấp có thể ở dạng dung dịch; dạng đông khô; được để trên cơ chất, chất mang hoặc đĩa; hoặc được gắn nhãn để dễ phát hiện.

Các kit được mô tả cũng có thể bao gồm các thành phần bổ sung hữu ích cho việc thực hiện các phương pháp đã nêu. Ví dụ, các kit có thể bao gồm các phương tiện lấy mẫu từ đối tượng, mẫu đối chứng hay mẫu tham chiếu, *ví dụ*, mẫu từ đối tượng mắc bệnh ung thư tiến triển chậm và/hoặc đối tượng không mắc ung thư, một hoặc nhiều ngăn chứa mẫu, và/hoặc tài liệu hướng dẫn mô tả cách thực hiện phương pháp của sáng chế và các đối chứng hoặc các mẫu đặc hiệu mô.

Các phương tiện xác định mức GPRC5D còn bao gồm, ví dụ, các dung dịch đệm hoặc các thuốc thử khác để sử dụng trong xét nghiệm xác định mức GPRC5D. Các hướng dẫn có thể là, ví dụ, các tài liệu in hướng dẫn thực hiện xét nghiệm và/hoặc hướng dẫn đánh giá mức biểu hiện GPRC5D.

Các kit đã nêu còn có thể bao gồm các phương tiện sử dụng để phân lập mẫu từ đối tượng. Các phương tiện này có thể bao gồm một hoặc nhiều dụng cụ hoặc

thuốc thử được sử dụng để lấy chất lỏng hoặc mô từ đối tượng. Các phương tiện lấy mẫu từ đối tượng cũng có thể bao gồm các phương tiện phân lập các thành phần máu, như huyết thanh, từ mẫu máu. Tốt nhất là, kit được thiết kế để sử dụng cho đối tượng là con người.

Các kháng thể đa hiệu

Các miền liên kết của các kháng thể kháng GPRC5D được mô tả trong bản mô tả này nhận biết được các tế bào biểu hiện GPRC5D trên bề mặt của chúng. Như đã lưu ý ở phần trên, biểu hiện GPRC5D có thể là chỉ báo của tế bào ung thư. Có thể nhắm đích đặc hiệu hơn đến các tập hợp con cụ thể của các tế bào bằng cách tạo các phân tử đặc hiệu đôi, như các kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết với GPRC5D và với đích khác, như CD3 và BCMA. Thực hiện điều này bằng cách tạo một phân tử bao gồm vùng thứ nhất liên kết với GPRC5D và vùng liên kết thứ hai liên kết với kháng nguyên đích khác. Các vùng liên kết kháng nguyên có thể có dạng bất kỳ cho phép nhận diện đặc hiệu đích, ví dụ vùng liên kết có thể là hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng, Fv (kết hợp vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ), vùng liên kết dựa trên miền dạng III fibronectin (như từ fibronectin, hoặc dựa trên sự liên ứng của các miền dạng III từ fibronectin, hoặc từ tenascin hoặc dựa trên sự liên ứng của các miền dạng III từ tenascin, như các phân tử Centyrin từ Janssen Biotech, Inc., xem *ví dụ* WO2010/051274 và WO2010/093627). Theo đó, bản mô tả cung cấp các phân tử đặc hiệu đôi bao gồm hai vùng liên kết kháng nguyên khác nhau lần lượt liên kết với GPRC5D và kháng nguyên khác.

Một số trong các kháng thể đa hiệu được mô tả trong bản mô tả này bao gồm hai vùng liên kết kháng nguyên khác nhau lần lượt liên kết với GPRC5D và CD3. Trong các phương án ưu tiên, các kháng thể đa hiệu liên kết với GPRC5D và CD3 ("các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3") và các mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của chúng được cung cấp. Trong một số phương án, kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 bao gồm chuỗi nặng thứ nhất (HC1) và chuỗi nhẹ thứ nhất (LC1) bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với GPRC5D và chuỗi nặng thứ hai (HC2) và chuỗi nhẹ thứ hai (LC2) bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với CD3. Trong một số phương án ưu tiên, kháng thể đa

hiệu GPRC5D x CD3 là kháng thể đặc hiệu đôi bao gồm nhánh đặc hiệu GPRC5D chứa chuỗi nặng thứ nhất (HC1) và chuỗi nhẹ thứ nhất (LC1) bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD3 và nhánh đặc hiệu CD3 chứa chuỗi nặng thứ hai (HC2) và chuỗi nhẹ thứ hai (LC2) bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với GPRC5D. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu đôi của sáng chế bao gồm các kháng thể có cấu trúc kháng thể đầy đủ chiều dài. Trong bản mô tả này, "kháng thể đầy đủ chiều dài" chỉ một kháng thể có hai chuỗi nặng kháng thể đầy đủ chiều dài và hai chuỗi nhẹ kháng thể đầy đủ chiều dài. Một chuỗi nặng (HC) kháng thể đầy đủ chiều dài bao gồm các miền biến đổi và miền hằng định chuỗi nặng là VH, CH1, CH2, và CH3. Một chuỗi nhẹ (LC) kháng thể đầy đủ chiều dài bao gồm các miền biến đổi và miền hằng định chuỗi nhẹ là VL và CL. Kháng thể đầy đủ chiều dài có thể thiếu lysin đầu C (K) trong một hoặc cả hai chuỗi nặng. Thuật ngữ "nhánh Fab" hay "nửa phân tử" chỉ một cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên. Trong một số phương án, một trong các miền gắn kháng nguyên là miền liên kết không dựa trên kháng thể, *ví dụ* miền liên kết dựa trên miền dạng 3 fibronectin, *ví dụ*, Centyrin.

Nhánh liên kết GPRC5D của các kháng thể đa hiệu cung cấp trong bản mô tả này có thể được dẫn xuất từ các kháng thể đặc hiệu GPRC5D bất kỳ đã nêu ở phần trên. Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết GPRC5D này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với GPRC5D bao gồm CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng dẫn xuất từ dòng kháng thể như được mô tả trong Bảng 1. Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết GPRC5D này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với GPRC5D bao gồm CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng và CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ dẫn xuất từ dòng kháng thể như được mô tả trong Bảng 1. Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết GPRC5D này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với GPRC5D bao gồm CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nặng của dòng GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598, hoặc GC5B597.

Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết GPRC5D này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với GPRC5D bao gồm CDR1, CDR2, và CDR3 của

chuỗi nặng và CDR1, CDR2, và CDR3 của chuỗi nhẹ của dòng GC5B81, GC5B465, GS5B483 hoặc GC5B596. Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết GPRC5D này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với GPRC5D bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng dẫn xuất từ dòng kháng thể như được mô tả trong Bảng 1. Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết GPRC5D này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với GPRC5D bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ dẫn xuất từ dòng kháng thể như được mô tả trong Bảng 1. Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết GPRC5D này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với GPRC5D bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của dòng GC5B81, GC5B465, GS5B483 hoặc GC5B596. Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết GPRC5D này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với GPRC5D bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của dòng GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598, hoặc GC5B597.

Bảng 3 cung cấp danh sách các kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 có một cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đặc hiệu đối với GPRC5D và một cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác đặc hiệu đối với CD3, trong đó ID kháng thể cụ thể được liệt kê để mô tả các nhánh kháng thể đặc hiệu kháng nguyên được sử dụng để tạo phương án được mô tả.

Bảng 3:

Nhánh đặc hiệu GPRC5D = ID kháng thể	**Nhánh đặc hiệu CD3 = ID kháng thể**
GC5B81	CD3B219
GC5B465	CD3B219
GC5B483	CD3B219
GC5B596	CD3B219
GC5B382	CD3B219
GC5B379	CD3B219
GC5B373	CD3B219
GC5B376	CD3B219
GC5B385	CD3B219

Nhánh đặc hiệu GPRC5D = ID kháng thể	Nhánh đặc hiệu CD3 = ID kháng thể
GC5B370	CD3B219
GC5B602	CD3B219
GC5B603	CD3B219
GC5B599	CD3B219
GC5B601	CD3B219
GC5B598	CD3B219
GC5B597	CD3B219

Trong một số phương án về kháng thể đặc hiệu đôi, nhánh liên kết GPRC5D còn liên kết với GPRC5D khỉ, tốt nhất là với miền ngoại bào của nó.

Trong một số phương án, nhánh liên kết GPRC5D của kháng thể đa hiệu là IgG, hoặc dẫn xuất của nó, ví dụ các lớp kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Trong một số phương án trong đó nhánh liên kết GPRC5D có lớp kháng thể IgG4, nó bao gồm (các) thay thế S228P, L234A, và L235A tại vùng Fc của nó.

Trong một số phương án về các kháng thể đặc hiệu đôi, nhánh liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết với CD3 người. Trong một số phương án ưu tiên, nhánh đặc hiệu CD3 của kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 được dẫn xuất từ kháng thể đặc hiệu CD3 liên kết và hoạt hóa các tế bào T sơ cấp của người và/hoặc tế bào T sơ cấp của khỉ. Trong một số phương án, nhánh liên kết CD3 liên kết với epitope tại đầu N của CD3ε. Trong một số phương án, nhánh liên kết CD3 tiếp xúc với epitope bao gồm sáu axit amin đầu N của CD3ε. Trong một số phương án, nhánh liên kết đặc hiệu CD3 của kháng thể đặc hiệu đôi được dẫn xuất từ kháng thể đơn dòng SP34 của chuột, lớp kháng thể IgG3/lambda của chuột. Trong một số phương án, nhánh liên kết CD3 bao gồm các CDR của kháng thể SP34. Nhánh liên kết CD3 này có thể liên kết với CD3 bằng ái lực nhỏ hơn hoặc bằng $5x10^{-7}$ M, như nhỏ hơn hoặc bằng $1x10^{-7}$ M, nhỏ hơn hoặc bằng $5x10^{-8}$ M, nhỏ hơn hoặc bằng $1x10^{-8}$ M, nhỏ hơn hoặc bằng $5x10^{-9}$ M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng $1x10^{-9}$ M. Nhánh liên kết đặc hiệu CD3 có thể là phiên bản nhân hóa của một nhánh của kháng thể đơn dòng SP34 của chuột. Có thể sử dụng sự thích ứng với khung của người (HFA) để nhân hóa kháng thể kháng CD3 mà từ đó nhánh đặc hiệu CD3 được dẫn xuất. Trong một số phương án về các kháng thể đặc hiệu đôi, nhánh liên kết CD3 bao gồm một cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ Bảng 2.

Trong một số phương án, nhánh liên kết CD3 là IgG, hoặc dẫn xuất của nó. Trong một số phương án, nhánh liên kết CD3 là IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4. Trong một số phương án trong đó nhánh liên kết CD3 có lớp kháng thể IgG4, nó bao gồm (các) thay thế S228P, L234A, L235A, F405L, và R409K tại vùng Fc của nó. Trong một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên liên kết với CD3ε trên các tế bào T sơ cấp của người. Trong một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên liên kết với CD3ε trên các tế bào T sơ cấp của khỉ. Trong một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên liên kết với CD3ε trên các tế bào T sơ cấp của người và khỉ. Trong một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên hoạt hóa các tế bào T CD3+ sơ cấp của người. Trong một số phương án, các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên hoạt hóa các tế bào T CD4+ sơ cấp của khỉ.

Một số phương án cung cấp kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 có nhánh liên kết GPRC5D bao gồm chuỗi nặng của dòng kháng thể GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598, hoặc GC5B597. Một số phương án cung cấp kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 có nhánh liên kết GPRC5D bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của dòng kháng thể GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598, hoặc GC5B597. Một số phương án cung cấp kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 có nhánh liên kết CD3 bao gồm chuỗi nặng của dòng kháng thể CD3B219. Một số phương án cung cấp kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 có nhánh liên kết CD3 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của dòng kháng thể CD3B219. Một số phương án cung cấp kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 có nhánh liên kết GPRC5D bao gồm chuỗi nặng của dòng kháng thể GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602, GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598, hoặc GC5B597 và nhánh liên kết CD3 bao gồm chuỗi nặng của dòng kháng thể CD3B219. Một số phương án cung cấp kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 có nhánh liên kết GPRC5D bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của dòng kháng thể GC5B81, GC5B465, GS5B483, GC5B596, GC5B382, GC5B379, GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B370, GC5B602,

GC5B603, GC5B599, GC5B601, GC5B598, hoặc GC5B597 và nhánh liên kết CD3 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của dòng kháng thể CD3B219.

Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 mẫu được cung cấp trong Bảng 23.

Các định dạng khác nhau của các kháng thể đặc hiệu đôi đã được mô tả và xem xét mới đây bởi Chames và Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev (Quan điểm hiện nay về phát triển và nghiên cứu dược phẩm) 12: 276.

Trong một số phương án, kháng thể đặc hiệu đôi của sáng chế là diabody (kháng thể đặc hiệu đôi tái tổ hợp), cross-body (kháng thể chéo), hoặc kháng thể đặc hiệu đôi thu được bằng cách trao đổi nhánh Fab có điều khiển, như các loại kháng thể được mô tả trong sáng chế này.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu đôi bao gồm các phân tử giống IgG có các miền CH3 bổ sung để thúc đẩy sự dị đime hóa; các phân tử nhắm đích kép giống IgG tái tổ hợp, trong đó hai mạch của phân tử mỗi mạch chứa mảnh Fab hoặc một phần của mảnh Fab của ít nhất hai kháng thể khác nhau; các phân tử dung hợp IgG, trong đó các kháng thể IgG đầy đủ chiều dài được dung hợp với một mảnh Fab khác nữa hoặc các phần của mảnh Fab; các phân tử dung hợp Fc, trong đó các phân tử Fv đơn chuỗi hoặc các diabody ổn định được dung hợp với các miền hằng định của chuỗi nặng, các vùng Fc hoặc các phần của chúng; các phân tử dung hợp Fab, trong đó các mảnh Fab khác nhau được dung hợp cùng nhau; các kháng thể nền ScFv và diabody và chuỗi nặng (ví dụ, các kháng thể miền, nanobody (kháng thể đơn miền)) trong đó các phân tử Fv đơn chuỗi khác nhau hoặc các diabody khác nhau hoặc các kháng thể chuỗi nặng khác nhau (ví dụ, các kháng thể miền, nanobody) được dung hợp với nhau hoặc với phân tử protein hoặc chất mang khác.

Trong một số phương án, các phân tử giống IgG với các phân tử miền CH3 bổ sung bao gồm Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), Knobs-into-Hole (Genentech), CrossMAb (Roche) và phân tử có thể ghép tĩnh điện (Amgen), LUZ-Y (Genentech), kháng thể Strand Exchange Engineered Domain (Miền kiến tạo trao đổi sợi) (SEEDbody)(EMD Serono), Biclonic (Merus) và DuoBody (Genmab A/S).

Trong một số phương án, các phân tử nhắm đích kép giống IgG tái tổ hợp bao gồm Dual Targeting (nhắm đích kép) (DT)-Ig (GSK/Domantis), Two-in-one Antibody

(kháng thể hai trong một) (Genentech), Cross-linked Mabs (kháng thể đơn dòng liên kết ngang) (Karmanos Cancer Center), mAb2 (kháng thể đơn dòng 2) (F-Star) và CovX-body (CovX/Pfizer).

Trong một số phương án, các phân tử dung hợp IgG bao gồm Dual Variable Domain (miền biến đổi kép) (DVD)-Ig (Abbott), IgG-like Bispecific (đặc hiệu đôi giống IgG) (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) và BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) và TvAb (Roche).

Trong một số phương án, các phân tử dung hợp Fc bao gồm ScFv/Fc Fusions (dung hợp ScFv/Fc)(Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), Dual Affinity Retargeting Technology (công nghệ tái nhắm đích ái lực kép) (Fc-DART) (MacroGenics) và Dual(ScFv).sub.2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine (Trung tâm nghiên cứu quốc gia về y học kháng thể)--Trung Quốc).

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu đôi dung hợp Fab bao gồm F(ab)2 (Medarex/AMGEN), Dual-Action hoặc Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalent Bispecific (Biotecnol) và Fab-Fv (UCB-Celltech). Các kháng thể nền ScFv, diabody và kháng thể miền bao gồm nhưng không giới hạn trong Bispecific T Cell Engager (thành phần gắn kết tế bào T đặc hiệu đôi) (BiTE) (Micromet), Tandem Diabody (Diabody kép) (Tandab) (Affimed), Dual Affinity Retargeting Technology (công nghệ tái nhắm đích ái lực kép) (DART) (MacroGenics), Single-chain Diabody (diabody đơn chuỗi) (Academic), TCR-like Antibodies (kháng thể giống TCR) (AIT, ReceptorLogics), Human Serum Albumin ScFv Fusion (dung hợp ScFv albumin huyết thanh người) (Merrimack) và COMBODY (Epigen Biotech), các nanobody nhắm đích kép (Ablynx), các kháng thể miền chỉ chuỗi nặng nhắm đích kép.

Có thể tạo các kháng thể đặc hiệu đôi đầy đủ chiều dài của sáng chế, ví dụ, bằng cách trao đổi nhánh Fab (hoặc trao đổi nửa phân tử) giữa hai kháng thể lưỡng trị đơn đặc hiệu bằng cách đưa các thay thế tại giao diện CH3 chuỗi nặng tại mỗi nửa phân tử để hỗ trợ hình thành dị đime của hai nửa phân tử kháng thể có tính đặc hiệu khác nhau trong ống nghiệm trong môi trường không có tế bào hoặc bằng cách đồng biểu hiện. Phản ứng trao đổi nhánh Fab là kết quả của phản ứng isome hóa

liên kết đisulfua và sự phân ly-kết hợp các miền CH3. Các liên kết đisulfua chuỗi nặng trong các vùng bản lề của các kháng thể đơn đặc hiệu mẹ bị khử. Các xystein tự do thu được của một trong các kháng thể đơn đặc hiệu mẹ tạo thành liên kết đisulfua chuỗi nặng bên trong với các gốc xystein của phân tử kháng thể đơn đặc hiệu mẹ thứ hai và đồng thời với các miền CH3 của các kháng thể mẹ được phóng thích và sửa chữa bởi quá trình phân ly-kết hợp. Các miền CH3 của các nhánh Fab có thể được kiến tạo để hỗ trợ quá trình dị đime hóa hơn là đồng đime hóa. Sản phẩm tạo thành là kháng thể đặc hiệu đôi có hai nhánh Fab hoặc hai nửa phân tử mỗi nửa liên kết với một epitope khác nhau, tức là một epitope trên GPRC5D và một epitope trên CD3.

Trong bản mô tả này, "đồng đime hóa" chỉ sự tương tác của hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 đồng nhất. Trong bản mô tả này, "đồng đime" chỉ kháng thể có hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 đồng nhất.

Trong bản mô tả này, "dị đime hóa" chỉ sự tương tác của hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 không đồng nhất. Trong bản mô tả này, "dị đime" chỉ kháng thể có hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 không đồng nhất.

Có thể sử dụng phương pháp "knob-in-hole" (nghĩa là mô hình gói các mạch bên của axit amin giữa các chuỗi xoắn alpha liền kề) (xem, ví dụ, Bằng sáng chế quốc tế Số công bố WO 2006/028936) để tạo các kháng thể đặc hiệu đôi đầy đủ chiều dài. Tóm tắt như sau, các axit amin được chọn tạo thành giao diện của các miền CH3 trong IgG người có thể bị đột biến ở các vị trí tác động đến các tương tác của các miền CH3 để thúc đẩy việc tạo thành dị đime. Một axit amin có mạch bên nhỏ (hole - lỗ) được đưa vào chuỗi nặng của một kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và một axit amin có mạch bên lớn (knob - đầu núm) được đưa vào chuỗi nặng của một kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai. Sau khi đồng biểu hiện hai kháng thể, một dị đime được tạo thành, là kết quả của tương tác ưu tiên của chuỗi nặng có "hole" ("lỗ") với chuỗi nặng có "knob" ("đầu núm"). Ví dụ về các cặp thay thế CH3 tạo thành đầu núm và lỗ là (được biểu hiện là vị trí điều hòa tại miền CH3 thứ nhất của chuỗi nặng thứ nhất/vị trí điều hòa tại miền CH3 thứ hai của chuỗi nặng thứ hai): T366Y/F405A, T366W/ F405W, F405W/Y407A,

T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S và T366W/T366S_L368A_Y407V.

Có thể sử dụng các phương pháp khác như phương pháp thúc đẩy quá trình dị đime hóa chuỗi nặng bằng tương tác tĩnh điện bằng cách thay thế các gốc tích điện dương tại một mặt CH3 và các gốc tích điện âm tại mặt CH3 thứ hai, như được mô tả trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2010/0015133; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2009/0182127; Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2010/028637, hoặc Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2011/0123532. Trong các phương pháp khác, quá trình dị đime hóa có thể được thúc đẩy bởi các thay thế sau (được biểu hiện là vị trí điều hòa tại miền CH3 thứ nhất của chuỗi nặng thứ nhất/vị trí điều hòa tại miền CH3 thứ hai của chuỗi nặng thứ hai): L351Y_F405AY407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V K409F Y407A/T366A_K409F, hoặc T350V_L351Y_F405A Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W như được mô tả trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2012/0149876 hoặc Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số công bố US2013/0195849.

Ngoài các phương pháp được mô tả ở phần trên, các kháng thể đặc hiệu đôi của sáng chế có thể được tạo trong ống nghiệm trong môi trường không có tế bào bằng cách đưa các đột biến bất đối xứng vào các vùng CH3 của hai kháng thể đồng đime đơn đặc hiệu và tạo thành kháng thể dị đime đặc hiệu đôi từ hai kháng thể đồng đime đơn đặc hiệu mẹ trong các điều kiện khử để cho phép isome hóa liên kết đisulfua theo các phương pháp được mô tả trong Bằng Bằng sáng chế quốc tế Số công bố W02011/131746. Trong các phương pháp này, kháng thể lưỡng trị đơn đặc hiệu thứ nhất (ví dụ, kháng thể kháng GPRC5D) và kháng thể lưỡng trị đơn đặc hiệu thứ hai (ví dụ, kháng thể kháng CD3) được kiến tạo để có một số thay thế tại miền CH3 làm tăng tính bền của dị đime; các kháng thể được ủ cùng nhau trong các điều kiện khử đủ để cho phép các xystein trong vùng bản lề trải qua quá trình isome hóa liên kết đisulfua; từ đó tạo ra kháng thể đặc hiệu đôi bằng cách trao đổi nhánh Fab. Các điều kiện ủ nuôi cấy có thể được khôi phục lại tình trạng không khử một cách tối ưu. Ví dụ về các chất khử có thể được sử dụng là 2- mercaptoetylamin (2-MEA), đithiothreitol (DTT),

đithioerythritol (DTE), glutathion, tris (2-carboxyetyl)phosphin (TCEP), L-xystein và beta-mercaptoetanol, tốt nhất là chất khử được chọn từ nhóm bao gồm: 2-mercaptoetylamin, đithiothreitol và tris (2-carboxyetyl)phosphin. Ví dụ, có thể ủ trong ít nhất 90 phút ở nhiệt độ ít nhất bằng 20 °C với sự có mặt của ít nhất 25 mM 2-MEA hoặc với sự có mặt của ít nhất 0,5 mM đithiothreitol với độ pH bằng từ 5-8, ví dụ với độ pH bằng 7,0 hoặc độ pH bằng 7,4.

Ngoài các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 được mô tả, sáng chế cũng đề xuất các trình tự polynucleotit có khả năng mã hóa các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 này. Bản mô tả còn cung cấp các vectơ chứa các polynucleotit được mô tả, các tế bào biểu hiện các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 được mô tả tại đây. Đồng thời bản mô tả cũng đề cập đến các tế bào có khả năng biểu hiện các vectơ được bộc lộ. Các tế bào này có thể là tế bào động vật có vú (như các tế bào 293F, các tế bào CHO), tế bào côn trùng (như tế bào Sf7), tế bào nấm men, tế bào thực vật, hoặc tế bào vi khuẩn (như *E. coli*). Các kháng thể được mô tả cũng có thể được sản xuất bằng các tế bào lai.

Chế phẩm điều trị và các phương pháp điều trị sử dụng các kháng thể đa hiệu và các mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của chúng

Các kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D như được trình bày ở phần trên, ví dụ kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 đã nêu, có thể được dùng trong điều trị bệnh. Cụ thể, các kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D có thể được dùng trong điều trị bệnh ung thư. Bản mô tả này cũng cung cấp các chế phẩm điều trị dùng để điều trị rối loạn tăng sinh lympho bào ở động vật có vú, bao gồm một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đa hiệu hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu đã nêu và một chất mang dược dụng. Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu là kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 của nó. Trong một phương án, chế phẩm dược đã nêu được dùng để điều trị bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D, bao gồm (nhưng không giới hạn trong) các loại sau: Các bệnh ung thư tế bào B biểu hiện GPRC5D, như bệnh đa u tủy (MM); và các bệnh ung thư khác biểu hiện

GPRC5D chưa được xác định. Có thể sử dụng các kháng thể đặc hiệu đôi cụ thể để điều trị bệnh ung thư, như bệnh ung thư huyết học, bao gồm các loại bệnh ung thư cụ thể đề cập ở phần trên, bao gồm các kháng thể GC5B81, GC5B465, GS5B483 hoặc GC5B596.

Các chế phẩm dược được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm: a) một lượng hữu hiệu kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể của sáng chế và b) chất mang dược dụng, có thể là chất trơ hoặc có hoạt tính sinh lý học. Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu là kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 của nó. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất mang dược dụng" bao gồm tất cả và dung môi, môi trường phân tán, lớp phủ, chất kháng khuẩn và kháng nấm, và chất tương tự thích ứng về mặt sinh lý bất kỳ. Các ví dụ về chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược phù hợp bao gồm một hoặc nhiều loại trong các chất như nước, dung dịch muối đẳng trương, dung dịch muối đẳng trương đệm phosphat, đextroza, glyxerol, etanol, v.v và kết hợp bất kỳ của chúng. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là bao gồm chất đẳng trương, như đường, rượu đa chức, hoặc natri clorua trong chế phẩm. Cụ thể, các ví dụ về chất mang phù hợp bao gồm: (1) Dung dịch muối đẳng trương đệm phosphat của Dulbecco, độ pH bằng khoảng 7,4, chứa hoặc không chứa khoảng 1 mg/mL đến 25 mg/mL albumin huyết thanh người, (2) dung dịch muối đẳng trương 0,9 % (natri clorua (NaCl) có khối lượng/thể tích là 0,9 %), và (3) đextroza 5 % (khối lượng/thể tích); và cũng có thể bao gồm các chất chống oxy hóa như triptamin và chất ổn định như Tween 20 ®.

Các chế phẩm trong bản mô tả này cũng có thể còn chứa một loại thuốc điều trị cần thiết khác cho loại rối loạn cụ thể. Tốt nhất là kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể và hoạt chất phụ sẽ có các hoạt tính bổ sung không có các tác dụng có hại khi tương tác với nhau. Trong một phương án ưu tiên, thuốc điều trị khác này là thuốc cytoxar, anthracycline (thuốc chống u bướu), histamine dihydrochloride hoặc interleukin 2. Trong một phương án ưu tiên, thuốc điều trị khác là một loại thuốc hóa trị liệu.

Các chế phẩm của sáng chế có thể có nhiều dạng khác nhau. Các dạng này bao gồm, ví dụ, các dạng bào chế lỏng, bán rắn và rắn, nhưng dạng ưu tiên tùy thuộc vào

đường sử dụng thuốc và cách điều trị. Các chế phẩm ưu tiên điển hình có dạng dung dịch có thể tiêm được hoặc không nóng chảy. Đường sử dụng ưu tiên là đường dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, dưới da). Trong một phương án ưu tiên, các chế phẩm của sáng chế được cho dùng qua đường tĩnh mạch bằng tiêm nhanh hoặc truyền liên tục trong một khoảng thời gian. Trong phương án ưu tiên khác, chúng được tiêm cơ, dưới da, trong khớp, trong bao hoạt dịch, trong khối u, quanh khối u, trong thương tổn hoặc quanh thương tổn để tạo ra hiệu quả điều trị tại chỗ và toàn thân.

Các chế phẩm vô trùng để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể được điều chế bằng cách hợp nhất kháng thể, mảnh kháng thể hoặc phức hợp kháng thể của sáng chế với số lượng theo yêu cầu trong chất dung môi phù hợp, sau đó tiệt trùng bằng vi lọc. Dung môi hoặc chất mang có thể được sử dụng là nước, dung dịch muối đẳng trương, dung dịch muối đẳng trương đệm phosphat, đextroza, glyxerol, etanol, v.v và kết hợp bất kỳ của chúng. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn là bao gồm chất đẳng trương, như đường, rượu đa chức, hoặc natri clorua trong chế phẩm. Các chế phẩm này cũng có thể chứa các tá chất, cụ thể là các chất thấm ướt, chất đẳng trương, chất nhũ hóa, chất phát tán và chất ổn định. Các chế phẩm vô trùng để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể được điều chế dưới dạng chế phẩm rắn vô trùng có thể được hòa tan khi sử dụng trong nước vô trùng hoặc môi trường vô trùng khác bất kỳ có thể tiêm được.

Kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể cũng có thể được dùng bằng đường uống. Các chế phẩm rắn có thể được sử dụng bằng đường uống là viên nén, viên, bột (viên nang gelatin, gói) hoặc dạng hạt. Trong các chế phẩm này, hoạt chất theo sáng chế được trộn với một hoặc nhiều chất pha loãng trơ, như tinh bột, xenluloza, lactoza hoặc silic, trong dòng khí argon. Các chế phẩm này cũng có thể bao gồm các chất khác ngoài chất pha loãng, ví dụ, một hoặc nhiều chất bôi trơn như magie stearat hay hoạt thạch, chất tạo màu, vỏ (viên nén bao đường) hoặc men bóng.

Các chế phẩm lỏng có thể được sử dụng bằng đường uống là các dung dịch, huyền phù, nhũ tương, xi-rô và cồn ngọt dược dụng chứa các chất pha loãng trơ như nước, etanol, glyxerol, dầu thực vật hoặc dầu parafin. Các chế phẩm này cũng có thể bao gồm các chất khác ngoài chất pha loãng, ví dụ như các chất thấm ướt, chất làm ngọt, chất làm dày, chất tạo hương vị hoặc chất ổn định.

Liều dùng tùy vào tác dụng mong muốn, thời gian điều trị và đường dùng áp dụng; liều dùng thông thường nằm trong khoảng 5 mg đến 1000 mg một ngày qua đường uống cho người trưởng thành với liều đơn vị nằm trong khoảng từ 1 mg đến 250 mg hoạt chất. Thông thường, bác sĩ sẽ xác định liều phù hợp dựa trên tuổi, cân nặng và các yếu tố cụ thể khác của đối tượng được điều trị.

Bản mô tả cũng cung cấp các phương pháp tiêu diệt tế bào GPRC5D + bằng cách cho bệnh nhân sử dụng kháng thể đa hiệu liên kết với GPRC5D đã nêu và có khả năng tuyển mộ tế bào T để tiêu diệt tế bào GPRC5D + đã nêu (tức là chuyển hướng tế bào T). Kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể bất kỳ của sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh. Ví dụ, trong một phương án, kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư ở đối tượng.

Trong phương án ưu tiên, các kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể của sáng chế được sử dụng để điều trị rối loạn tăng sinh lympho bào ở động vật có vú. Trong một phương án ưu tiên hơn, một trong các chế phẩm dược được bộc lộ ở phần trên, và chứa kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể của sáng chế, được sử dụng để điều trị rối loạn tăng sinh lympho bào ở động vật có vú. Trong một phương án, rối loạn là bệnh ung thư. Cụ thể, bệnh ung thư là bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D, bao gồm (nhưng không giới hạn trong) các loại sau: Các bệnh ung thư tế bào B biểu hiện GPRC5D, như bệnh đa u tủy (MM); và các bệnh ung thư khác biểu hiện GPRC5D chưa được xác định. Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu là kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 của nó.

Theo đó, chế phẩm dược của sáng chế hữu ích trong điều trị hoặc ngăn ngừa các loại bệnh ung thư khác nhau, bao gồm (nhưng không giới hạn trong) bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D, bao gồm (nhưng không giới hạn trong) các loại sau: Các bệnh ung thư tương bào/tế bào B biểu hiện GPRC5D, như là bệnh đa u tủy cấp (MM) hoặc u tủy tiền ác tính như MGUS (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (Bệnh lý gamma đơn dòng có ý nghĩa không xác định)) và SMM (Đa u tủy tiềm tàng) và u tương bào; và các bệnh ung thư khác biểu hiện GPRC5D chưa được xác định.

Tương tự, bản mô tả còn đề xuất phương pháp ức chế sự tăng trưởng của quần thể tế bào được chọn bao gồm bước cho tế bào đích biểu hiện GPRC5D, hoặc mô chứa các tế bào đích này, tiếp xúc với một lượng hữu hiệu kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể của sáng chế, dùng riêng hay kết hợp với các thuốc điều trị hoặc gây độc tế bào khác, với sự có mặt của tế bào máu đơn nhân ngoại vi (PBMC). Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu là kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 của nó. Trong một phương án ưu tiên, thuốc điều trị khác này là thuốc cytoxar, anthracycline (thuốc chống u bướu), histamine dihydrochloride hoặc interleukin 2. Trong một phương án ưu tiên, thuốc điều trị khác là một loại thuốc hóa trị liệu. Các phương pháp ức chế sự sự tăng trưởng của quần thể tế bào được chọn có thể được thực hiện *trong ống nghiệm, trong cơ thể sống*, hoặc *ngoài cơ thể sống*.

Các ví dụ về sử dụng *trong ống nghiệm* bao gồm các xử lý tủy xương tự ghép trước khi ghép vào cùng một bệnh nhân để tiêu diệt các tế bào bị bệnh hoặc tế bào ác tính; các xử lý tủy xương trước khi cấy ghép nhằm tiêu diệt các tế bào T khả nạp và ngăn ngừa bệnh mảng ghép chống lại ký chủ (GVHD); các xử lý môi trường nuôi cấy tế bào nhằm tiêu diệt tất cả các tế bào trừ các biến thể mong muốn không biểu hiện kháng nguyên đích; hoặc tiêu diệt các biến thể biểu hiện kháng nguyên không mong muốn. Các chuyên gia trong ngành đã xác định được các điều kiện sử dụng *trong ống nghiệm* không lâm sàng.

Các ví dụ về sử dụng *ngoài cơ thể sống* lâm sàng nhằm loại bỏ các tế bào khối u trước khi ghép tủy tự ghép trong điều trị ung thư. Có thể xử lý như sau. Lấy tủy xương từ bệnh nhân hoặc người khác và sau đó ủ trong môi trường chứa huyết thanh có bổ sung chất gây độc tế bào của sáng chế. Các nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 uM đến 1 uM, trong khoảng 30 phút đến khoảng 48 giờ ở 37 °C. Các điều kiện chính xác về nồng độ và thời gian ủ, tức là liều lượng, sẽ được những người có trình độ trong ngành xác định. Sau khi ủ, các tế bào tủy xương được rửa bằng môi trường chứa huyết thanh và đưa trở lại bệnh nhân bằng cách truyền tĩnh mạch theo các phương pháp đã biết. Trong các trường hợp trong đó bệnh nhân nhận được điều trị khác như một đợt hóa trị liệu hủy diệt hay chiếu xạ toàn thân giữa thời

gian lấy tủy và thời gian truyền lại các tế bào đã được xử lý, các tế bào tủy đã được xử lý được trữ đông trong nitơ lỏng bằng thiết bị y tế tiêu chuẩn.

Trong trường hợp sử dụng *trong cơ thể sống* lâm sàng, đối tượng cần điều trị được cho sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đa hiệu hoặc mảnh gắn kháng nguyên. Ví dụ, các kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 và các mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của chúng có thể hữu ích trong điều trị bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D ở đối tượng cần điều trị. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện GPRC5D là ung thư tế bào B, như bệnh đa u tủy (MM). Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu là kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 của nó. Trong một số phương án, đối tượng là động vật có vú, tốt nhất đối tượng là con người. Trong một số phương án, kháng thể đa hiệu hoặc mảnh gắn kháng nguyên có thể được cho sử dụng dưới dạng dung dịch đã được kiểm tra vô trùng.

Các chế độ cho liều trong các phương pháp điều trị và sử dụng mô tả trên đây được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng tối ưu theo mong muốn (ví dụ, đáp ứng điều trị). Ví dụ, có thể sử dụng một liều tiêm nhanh, một số liều được chia nhỏ dùng dần hoặc liều có thể được giảm hoặc tăng tỷ lệ theo sự cấp bách của tình hình điều trị. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa có thể được điều chế dưới dạng liều đơn vị để dễ sử dụng và thống nhất về liều lượng.

Các liều hữu hiệu và các chế độ cho liều đối với các kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể dựa vào bệnh và tình trạng cần điều trị và sẽ được người có trình độ trong ngành xác định. Ví dụ, nhưng không hạn chế, về khoảng sử dụng lượng điều trị hữu hiệu của hỗn hợp của sáng chế là bằng khoảng 0,001-10 mg/kg, như khoảng 0,001-5 mg/kg, ví dụ khoảng 0,001-2 mg/kg, như khoảng 0,001-1 mg/kg, ví dụ khoảng 0,001, khoảng 0,01, khoảng 0,1, khoảng 1 hoặc khoảng 10 mg/kg.

Bác sĩ hoặc bác sĩ thú y có trình độ bình thường trong ngành có thể đã xác định được và kê đơn lượng hữu hiệu của chế phẩm dược theo yêu cầu. Ví dụ, bác sĩ hoặc bác sĩ thú y có thể bắt đầu các liều kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể có trong chế phẩm dược ở các mức thấp hơn mức yêu cầu đạt được hiệu quả điều trị mong muốn và dần dần tăng liều lượng cho đến khi đạt được hiệu quả mong muốn.

Nhìn chung, liều dùng hàng ngày của kháng thể đặc hiệu đôi của sáng chế sẽ là lượng hỗn hợp là liều dùng thấp nhất có hiệu quả trong việc tạo ra tác dụng điều trị. Đường dùng có thể là, ví dụ, ngoài đường tiêu hóa, như tĩnh mạch, trong cơ hoặc dưới da. Trong một phương án, kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể có thể được cho dùng bằng đường truyền với liều mỗi tuần một lần được tính theo mg/m^2. Các liều dùng này có thể, ví dụ, dựa trên các liều tính bằng mg/kg được cho ở phần trên theo công thức sau: liều (mg/kg)x70: 1,8. Có thể sử dụng lặp lại, ví dụ, 1 đến 8 lần, như 3 đến 5 lần. Có thể dùng thuốc bằng cách truyền liên tục trong một khoảng thời gian bằng từ 2 đến 24 giờ, như bằng từ 2 đến 12 giờ. Trong một phương án, có thể dùng kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể bằng cách truyền chậm liên tục trong một thời gian dài, như lâu hơn 24 giờ, để làm giảm tác dụng phụ độc hại.

Trong một phương án, có thể dùng kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể theo liều hàng tuần được tính là liều cố định dùng trong tối đa tám lần, như từ bốn đến sáu lần trong một tuần. Chế độ này có thể được lặp lại một hoặc nhiều lần khi cần, ví dụ, sau sáu tháng hoặc mười hai tháng. Các liều dùng cố định này có thể, ví dụ, dựa trên các liều tính bằng mg/kg được cho ở phần trên, với trọng lượng cơ thể ước tính là 70 kg. Có thể xác định hoặc điều chỉnh liều dùng bằng cách đo lượng kháng thể đặc hiệu đôi của sáng chế trong máu sau khi sử dụng bằng cách, ví dụ, lấy mẫu sinh học và sử dụng các kháng thể kháng idiotypic nhắm đích vùng gắn kháng nguyên GPRC5D của các kháng thể đa hiệu của sáng chế.

Trong một phương án, có thể dùng kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể theo liệu pháp điều trị duy trì, ví dụ như, một lần một tuần trong khoảng thời gian sáu tháng hoặc lâu hơn.

Có thể dùng kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể theo liệu pháp phòng ngừa nhằm làm giảm nguy cơ phát triển ung thư, làm trì hoãn xảy ra sự kiện trong tiến trình phát triển ung thư, và/hoặc làm giảm nguy cơ tái phát khi ung thư đã thuyên giảm.

Cũng có thể dùng kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể của chúng như mô tả trong bản mô tả này theo liệu pháp phối hợp, tức là kết hợp với các thuốc điều trị khác phù hợp với bệnh hoặc tình trạng cần điều trị. Theo đó, trong một phương án, thuốc chứa kháng thể được kết hợp với một hoặc nhiều thuốc điều trị khác, như thuốc hóa trị liệu.

Trong một số phương án, thuốc điều trị khác là thuốc cytoxar, anthraxyclin (thuốc chống u bướu), histamin đihyđroclorua, hoặc interleukin 2. Thuốc có thể được sử dụng kết hợp đồng thời, tách riêng hoặc tuần tự, theo thứ tự bất kỳ. Trong trường hợp sử dụng đồng thời, các loại thuốc có thể được sử dụng dưới dạng một chế phẩm hoặc các chế phẩm riêng rẽ theo nhu cầu.

Trong một phương án, phương pháp điều trị một tình trạng rối loạn liên quan đến tế bào biểu hiện GPRC5D ở đối tượng được đề xuất, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể, như kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 được mô tả trong bản mô tả này, và điều trị bằng xạ trị cho đối tượng. Trong một phương án, phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư được đề xuất, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể, như kháng thể GPRC5D x CD3 được mô tả trong bản mô tả này, và điều trị bằng xạ trị cho đối tượng. Liệu pháp xạ trị có thể bao gồm bức xạ hoặc cho bệnh nhân sử dụng kết hợp thuốc chứa nguyên tố phóng xạ. Nguồn bức xạ có thể là nguồn bên ngoài hoặc bên trong đối với bệnh nhân đang được điều trị (điều trị bằng bức xạ, ví dụ, có thể dưới dạng điều trị bằng bức xạ tia bên ngoài (EBRT) hoặc xạ trị áp sát (BT)). Các nguyên tố phóng xạ có thể được sử dụng để thực hiện các phương pháp này bao gồm, ví dụ, rađi, xesi-137, iriđi-192, amerixi-241, vàng-198, coban-57, đồng-67, tecneti-99, iođua-123, iođua-131, và inđi-111.

Kit

Bản mô tả này còn đề xuất các kit, ví dụ, bao gồm kháng thể đa hiệu đã mô tả hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó và các hướng dẫn sử dụng kháng thể hoặc mảnh kháng thể để tiêu diệt các loại tế bào cụ thể. Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu là kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 của nó. Các hướng dẫn này có thể bao gồm các hướng dẫn sử dụng kháng thể đa hiệu hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó trong ống nghiệm, trong cơ thể sống, hoặc ngoài cơ thể sống.

Thông thường, kit sẽ gồm một ngăn chứa chứa kháng thể đa hiệu hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Kháng thể đa hiệu hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó có thể có dạng đông khô, dạng lỏng, hoặc dạng khác có thể điều chỉnh để đựng trong kit. Kit cũng có thể bao gồm các yếu tố cần thiết khác để thực hiện phương pháp mô tả trong tài liệu hướng dẫn trong kit, như dung dịch vô trùng để tái tạo lại bột đông khô, các tác nhân bổ sung để kết hợp với kháng thể đa hiệu hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó trước khi cho bệnh nhân sử dụng, và các dụng cụ hỗ trợ bệnh nhân sử dụng kháng thể đa hiệu hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó.

Sử dụng để chẩn đoán

Cũng có thể sử dụng kháng thể đa hiệu hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó cho các mục đích chẩn đoán. Vì vậy, bản mô tả này cũng đề xuất các chế phẩm dùng để chẩn đoán bao gồm kháng thể đa hiệu hoặc mảnh kháng thể đã nêu, và cách sử dụng chúng. Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu là kháng thể đa hiệu GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 như đã nêu trong bản mô tả, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 của nó. Trong một phương án, sáng chế đề xuất kit sử dụng để chẩn đoán ung thư bao gồm một dụng cụ chứa kháng thể GPRC5D x CD3 đặc hiệu đôi, và một hoặc nhiều thuốc thử để phát hiện sự liên kết của kháng thể với GPRC5D. Các thuốc thử có thể bao gồm, ví dụ, nhãn huỳnh quang, nhãn enzym hoặc các nhãn có thể phát hiện khác. Các thuốc thử cũng có thể bao gồm các kháng thể cấp hai hoặc cấp ba hoặc các thuốc thử cho các phản ứng enzym, trong đó các phản ứng enzym tạo ra sản phẩm nhìn thấy được. Ví dụ, các kháng thể đa hiệu được mô tả trong bản mô tả này, hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của chúng, có thể được đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ, nhãn huỳnh quang, nhãn epitope, bioti, nhãn nhóm mang màu, nhãn ECL, enzym, ruteni, ^{111}In-DOTA, ^{111}In- axit đietylentriaminpentaaxetic (DTPA), peroxyđaza ở cây cải ngựa, phosphataza kiềm và beta-galactosiđaza, hoặc poly-histiđin hoặc các nhãn tương tự đã biết trong ngành.

CÁC PHƯƠNG ÁN

Sáng chế bộc lộ trong bản mô tả còn cung cấp các phương án không giới hạn sau đây.

1. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với GPRC5D bao gồm:

a. vùng xác định bổ sung chuỗi nặng 1 (CDR1) có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 1, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 5, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 9;

b. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 2, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 6, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 10;

c. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 3, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 7, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 11;

d. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 4, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 8, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 12;

e. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 61, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 67, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 72;

f. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 2, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 30;

g. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 27, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 29, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 73;

h. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 27, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 29, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 11;

i. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 62, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 68, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 74;

j. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 63, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 69, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 75;

k. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 64, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 70, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 12;

l. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 65, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 68, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 76; hoặc

m. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 66, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 71, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 77.

2. Kháng thể phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó

a. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 1, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 5, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 9 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 16, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 19;

b. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 2, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 6, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 10 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 16, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 19;

c. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 3, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 7, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 11 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 17, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 20;

d. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 4, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 8, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 12 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 15, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 21;

e. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 61, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 67, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 72 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 78, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 80;

f. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 2, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 30 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 6, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 19;

g. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 27, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 29, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 73 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 17, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 20;

h. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 27, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 29, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 11 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 17, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 20;

i. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 62, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 68, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 74 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 14, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 17, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 20;

j. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 63, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 69, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 75 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 78, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 80;

k. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 61, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 67, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 72 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 13, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 78, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 80;

l. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 65, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 68, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 76 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 95, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 79, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 81; hoặc

m. kháng thể đã nêu bao gồm CDR1 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 66, CDR2 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 71, và CDR3 chuỗi nặng đã nêu có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 77 còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 15, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 21.

3. Kháng thể phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với GPRC5D, và bao gồm vùng chuỗi nặng biến đổi (VH) được chọn từ nhóm bao gồm các SỐ ID TRÌNH TỰ: 52, 53, 54, 55, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, hoặc 91.

4. Kháng thể theo phương án 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng chuỗi nhẹ biến đổi (VL) được chọn từ nhóm bao gồm các SỐ ID TRÌNH TỰ: 56, 57, 58, 92, 93, hoặc 94.

5. Kháng thể theo phương án 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng VH được chọn từ nhóm bao gồm các SỐ ID TRÌNH TỰ: 52, 53, 54, 55, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, hoặc 91 và vùng VL được chọn từ nhóm bao gồm các SỐ ID TRÌNH TỰ: 56, 57, 58, 92, 93, hoặc 94.

6. Kháng thể theo phương án 5, trong đó vùng chuỗi VH bao gồm các SỐ ID TRÌNH TỰ: 52, 53 hoặc 83 được ghép với vùng chuỗi VL bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 56.

7. Kháng thể theo phương án 5, trong đó vùng chuỗi VH bao gồm các SỐ ID TRÌNH TỰ: 54, 84, 85, 86, hoặc 90 được ghép với vùng chuỗi VL bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 57.

8. Kháng thể theo phương án 5, trong đó vùng chuỗi VH bao gồm các SỐ ID TRÌNH TỰ: 55 hoặc 88 được ghép với vùng chuỗi VL bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 58.

9. Kháng thể theo phương án 5, trong đó vùng chuỗi VH bao gồm các SỐ ID TRÌNH TỰ: 82 hoặc 87 được ghép với vùng chuỗi VL bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 92.

10. Kháng thể theo phương án 5, trong đó vùng chuỗi VH bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 89 được ghép với vùng chuỗi VL bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 93.

11. Kháng thể theo phương án 5, trong đó vùng chuỗi VH bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 91 được ghép với vùng chuỗi VL bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 94.

12. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 11, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với polypeptit có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 22.

13. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 12, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của người.

14. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 13, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là tái tổ hợp.

15. Mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 14, trong đó mảnh gắn kháng nguyên là mảnh Fab, mảnh Fab2, hoặc kháng thể chuỗi đơn.

16. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 15, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó là lớp kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

17. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 9 là lớp kháng thể IgG1 hoặc IgG4.

18. Kháng thể theo phương án 17, trong đó IgG1 có sự thay thế K409R trong vùng Fc của nó.

19. Kháng thể theo phương án 17, trong đó IgG1 có sự thay thế F405L trong vùng Fc của nó.

20. Kháng thể theo phương án 20, trong đó IgG4 có sự thay thế F405L và thay thế R409K trong vùng Fc của nó.

21. Kháng thể theo phương án 16 còn bao gồm sự thay thế S228P, thay thế L234A, và thay thế L235A trong vùng Fc của nó.

22. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 14, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GPRC5D người và phản ứng chéo với GPRC5D khỉ đuôi dài.

23. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án 17, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của cảm ứng ADCC *trong ống nghiệm* với EC_{50} thấp hơn khoảng 28 nM.

24. Tế bào phân lập biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 11.

25. Tế bào theo phương án 24, trong đó tế bào là tế bào lai.

26. Tế bào theo phương án 24, trong đó kháng thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp.

27. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 phân lập bao gồm:

a) chuỗi nặng thứ nhất (HC1);

b) chuỗi nặng thứ hai (HC2);

c) chuỗi nhẹ thứ nhất (LC1); và

d) chuỗi nhẹ thứ hai (LC2),

trong đó HC1 và LC1 bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD3, và HC2 và LC2 bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với GPRC5D, hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 của nó.

28. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 27, trong đó HC1 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 25 và LC1 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 26.

29. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 52 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 56.

30. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 53 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 56.

31. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 54 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 57.

32. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 55 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 58.

33. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 82 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 92.

34. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 83 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 56.

35. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 84 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 57.

36. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 85 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 57.

37. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 86 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 57.

38. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 87 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 92.

39. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 88 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 58.

40. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 89 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 93.

41. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 91 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 94.

42. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 28, trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 85 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 57.

43. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 27 đến 42, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi là lớp kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

44. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 43, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi là lớp kháng thể IgG4.

45. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo các phương án từ 27 đến 42, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi của nó liên kết với GPRC5D trên bề mặt của các tế bào u tủy người.

46. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo các phương án từ 27 đến 42, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi của nó liên kết với GPRC5D trên bề mặt của các tế bào đa u tủy người.

47. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 27 đến 42, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi cảm ứng hoạt hóa tế bào T người trong ống nghiệm với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 0,22 nM.

48. Kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án từ 27 đến 42, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi cảm ứng cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc tế bào T đối với các tế bào biểu hiện GPRC5D trong ống nghiệm với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 0,89 nM.

49. Tế bào phân lập biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 27 đến 42.

50. Tế bào theo phương án 49, trong đó tế bào là tế bào lai.

51. Tế bào theo phương án 49, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi được tạo ra bằng cách tái tổ hợp.

52. Phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư, phương pháp này bao gồm:

bước cho bệnh nhân sử dụng lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 27 đến 42 trong một thời gian đủ để điều trị bệnh ung thư.

53. Phương pháp ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh các tế bào ung thư, phương pháp này bao gồm:

bước cho sử dụng lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 27 đến 42 để ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh các tế bào ung thư.

54. Phương pháp chuyển hướng tế bào T đến tế bào ung thư biểu hiện GPRC5D, phương pháp này bao gồm:

bước cho sử dụng lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 27 đến 42 để chuyển hướng tế bào T đến tế bào ung thư.

55. Phương pháp theo phương án 52, 53, hoặc 54, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư huyết học.

56. Phương pháp theo phương án 55, trong đó bệnh ung thư huyết học là ung thư tế bào B biểu hiện GPRC5D.

57. Phương pháp theo phương án 56, trong đó bệnh ung thư tế bào B biểu hiện GPRC5D là đa u tủy.

58. Phương pháp theo phương án 52 còn bao gồm bước cho sử dụng tác nhân điều trị thứ hai.

59. Phương pháp theo phương án 58, trong đó tác nhân điều trị thứ hai là thuốc hóa trị liệu hoặc liệu pháp kháng ung thư nhắm đích.

60. Phương pháp theo phương án 59, trong đó thuốc hóa trị liệu là thuốc cytoxar, anthraxyclin (thuốc chống u bướu), histamin đihyđroclorua, hoặc interleukin 2.

61. Phương pháp theo phương án 59, trong đó thuốc điều trị thứ hai được cho đối tượng nêu trên sử dụng đồng thời, một cách tuần tự hoặc riêng biệt với kháng thể đặc hiệu đôi.

62. Chế phẩm dược bao gồm kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 27 đến 42 và chất mang dược dụng.

63. Phương pháp tạo kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 27 đến 42 bằng cách nuôi cấy tế bào theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 49 đến 51.

64. Polynucleotit tổng hợp được phân lập mã hóa HC1, HC2, LC1 hoặc LC2 của kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 27 đến 42.

65. Kit bao gồm kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi như đã định nghĩa theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 27 đến 42 và/hoặc polynucleotit như đã định nghĩa theo phương án 63 và bao bì đóng gói.

VÍ DỤ

Các ví dụ sau đây được cung cấp để bổ sung cho mô tả ở phần trên và giúp hiểu rõ hơn về chủ đề được mô tả. Các ví dụ này không nhằm giới hạn chủ đề của bản mô tả. Cần hiểu rằng các ví dụ và phương án được mô tả trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa, và những người có trình độ trong ngành hiểu là sẽ có các phương án cải biến hoặc thay đổi dựa vào các phương án này, các phương án cải biến hoặc thay đổi này được bao gồm trong sáng chế và được thực hiện miễn là không vượt quá phạm vi của sáng chế.

VÍ DỤ 1: CÁC KHÁNG NGUYÊN

Do những khó khăn khi tạo các kháng nguyên GPRC5D tái tổ hợp, các dòng tế bào được chuyển nhiễm biểu hiện GPRC5D [người (SỐ ID TRÌNH TỰ: 22), khỉ (SỐ ID TRÌNH TỰ: 23) và chuột (SỐ ID TRÌNH TỰ: 24)] được tạo bằng các phương pháp tiêu chuẩn sẽ được sử dụng làm các kháng nguyên toàn tế bào cho các nghiên cứu đặc trưng hóa và tạo kháng thể (Bảng 4).

Bảng 4. Các dòng tế bào biểu hiện GPRC5D

Protein	Dòng tế bào	Vùng khởi động	Kháng chất
GPRC5D người	HEK293T	CMV	Neomyxin
GPRC5D khỉ	HEK293F	CMV	Blastixiđin

VÍ DỤ 2: TẠO CÁC KHÁNG THỂ GPRC5D BẰNG KỸ THUẬT BIỂU HIỆN TRÊN THỰC KHUẨN

Áp dụng hai phương pháp riêng biệt khi tạo các kháng thể GPRC5D bằng thực khuẩn: sàng lọc tế bào chuẩn (chọn lọc dấu ấn âm) và sàng lọc thực khuẩn tế bào FACS (chọn lọc cạnh tranh).

Sàng lọc thực khuẩn tế bào chuẩn (chọn lọc dấu ấn âm):

Thư viện thực khuẩn mới nội bộ đã được mô tả chi tiết (Shi và cộng sự (2010) J. Mol. Biol. (Tạp chí sinh học phân tử) 397:385-396; Bằng sáng chế quốc tế số công bố WO09/085462). Các thư viện này được xây dựng trên 3 gen dòng mầm VH người (IGHV1-69, 3-23, 5-51) và 4 gen dòng mầm VL người (A27, B3, L6, O12)

được thiết kế để có tính đa dạng cao ở CDR-H3. Ba thư viện thực khuẩn mới (DNP00004 -169HC /LC mix, DNP00005 -323HC /LC mix và DNP00006 -551HC / LC mix) biểu hiện các biến thể Fab trên protein áo pIX của thực khuẩn được sàng lọc về các tế bào ổn định HEK293 G5 biểu hiện GPRC5D (các tế bào đích) cho vòng 1, 3, 5 và cho vòng 2 và 4, vòng trước của thực khuẩn Fab-pIX đã nhân lên được áp dụng cho các tế bào nền HEK293 (lựa chọn dấu ấn âm) (xem Bảng 5). Thực khuẩn Fab-pIX mới của vòng 1 liên kết với các tế bào đích được thu hồi để nhân rộng qua đêm. Thực khuẩn đã chọn của vòng 1 được áp dụng cho các tế bào nền cho vòng 2, trong đó thực khuẩn Fab-pIX không liên kết được thu hồi để nhân rộng qua đêm thực khuẩn được chọn dấu ấn âm. Tập hợp các vòng dương và âm khác của việc sàng lọc được thực hiện, vòng 3 và 4. Vòng cuối được thực hiện với vòng trước của thực khuẩn được nhân lên đã được chọn dấu ấn âm được chia thành 2 mẫu sàng lọc, một mẫu cho các tế bào đích và mẫu còn lại dành cho sàng lọc tế bào nền.

Bảng 5: Lưu đồ sàng lọc thực khuẩn tế bào chuẩn-lựa chọn dấu ấn âm

Vòng sàng lọc	Các tế bào được sử dụng làm kháng nguyên
1	HEK293 GPRC5D người
2	HEK293
3	HEK293 GPRC5D người
4	HEK293
5 (phân chia)	HEK293 GPRC5D người
	HEK293

Sàng lọc thực khuẩn tế bào chuẩn (chọn lọc nền):

Thư viện biểu hiện thực khuẩn Fab-pIX được bổ sung cho các tế bào HEK293 trong môi trường và thời gian ủ tương tự như đã thực hiện với quy trình sàng lọc tế bào chuẩn nêu trên (Bảng 6). Sau 3 vòng, ADN tương ứng với HEK293 liên kết với thực khuẩn Fab-pIX được sử dụng để tạo amplicon PCR cho NGS. Các kết quả NGS được sử dụng trong phân tích loại trừ động bổ sung trong phần mềm NGS2.0 để giúp phân biệt các ứng viên Fab đặc hiệu đích khả thi.

Bảng 6: Lưu đồ sàng lọc thực khuẩn tế bào chuẩn-lựa chọn nền

Vòng sàng lọc	Các tế bào được sử dụng làm kháng nguyên
1	HEK293
2	HEK293
3	HEK293

Sàng lọc thực khuẩn tế bào FACS (lựa chọn cạnh tranh)

Ba vòng sàng lọc được thực hiện theo cách áp dụng thực khuẩn Fab-pIX để trộn các tế bào đích và tế bào nền cùng lúc (Bảng 7). Đối với vòng 1 và 2, các tế bào đích gắn kết với thực khuẩn Fab-pIX được phân loại bằng cách sử dụng tín hiệu GFP. Để thu thực khuẩn Fab-pIX từ các tế bào được phân loại, áp dụng ly giải tế bào axit bằng cách cho nhiễm E. coli. Hỗn hợp thực khuẩn Fab-pIX đã nhân lên của vòng 2 và tế bào được phân loại thành 2 quần thể trong vòng cuối, bị chặn đối với các tế bào đích GFP và các tế bào nền không GFP. Thực khuẩn Fab-pIX liên kết cho cả hai quần thể tế bào thu được bằng cách ly giải axit và cho nhiễm E. coli.

Bảng 7: Lưu đồ sàng lọc thực khuẩn tế bào FACS-lựa chọn cạnh tranh

Vòng sàng lọc	Các tế bào được sử dụng làm kháng nguyên
1	GPRC5D_GFP người & HEK293
2	GPRC5D_GFP người & HEK293
3	GPRC5D_GFP người & HEK293

Giải trình tự thế hệ tiếp theo (NGS) của sàng lọc thực khuẩn

Sự tăng trưởng qua đêm trong môi trường ức chế glucoza được thực hiện cho 6 mẫu trong các mẫu sàng lọc của vòng trước. Các môi trường nuôi cấy này được sử dụng để tạo ADN điều chế nhỏ, kit Qiagen QIAspin DNA. 6 mẫu ADN được sử dụng như mẫu PCR để tạo amplicon đo từ HCDR1 đến HCDR3. 6 amplicon là gel được tinh chế và tập hợp bằng cách giữ phiên bản 2.1, 3.0 tách biệt nhau để sàng lọc tế bào chuẩn và được tập hợp toàn bộ để sàng lọc tế bào FACS. Amplicon được tinh chế gel đã được tập hợp này được cung cấp cho dịch vụ Genewiz NGS để xử lý bằng công nghệ MiSeq 1x300. Các tập tin được chuyển bởi Genewiz và được tải lên máy chủ cục bộ (nas2.0). Trong máy chủ này, ứng dụng phần mềm NGS2.0 được sử dụng để tải, đọc và phân tích các tập tin trình tự. 88 trình tự đầu tiên theo số bản sao (>50) và tỷ lệ giữa trình tự tế bào đích (+) và tế bào nền (-) (tỷ lệ >5:1) được chọn để chuyển hóa IgG. Vì chỉ có trình tự

chuỗi nặng biến đổi được xác định bởi NGS, các cấu trúc chuỗi nặng đầy đủ phải được xây dựng bằng đường điện tử trong khung phù hợp. Ngoài ra, khi chỉ mỗi trình tự chuỗi nặng được xác định, mỗi ứng viên được kết hợp với 4 chuỗi nhẹ mẹ (A27, B3, L6, O12). Sự chuyển hóa cuối cho các ứng viên được thực hiện thành IgG4PAA người.

Giải trình tự chuẩn và sàng lọc ELISA

Từ cùng một ADN điều chế được sử dụng cho NGS, sự thủy phân bằng enzym giới hạn và tự thắt buộc được thực hiện để cắt gen pIX để kích hoạt biểu hiện Fab tan. 92 dòng, được chọn cho từng mẫu trong 3 mẫu sàng lọc được đánh giá về biểu hiện Fab bằng ELISA và được giải trình tự để xác định cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bằng phương pháp Sanger. Các ứng viên cuối với trình tự đa dạng hóa trong các LCDR được tạo dòng thành các plasmit biểu hiện ở động vật có vú.

VÍ DỤ 4: ĐẶC TRƯNG HÓA BAN ĐẦU CÁC KHÁNG THỂ GPRC5D ĐƯỢC THỰC HIỆN BẰNG CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN THỰC KHUẨN

Liên kết GPRC5D:

Sự sàng lọc thực khuẩn toàn tế bào được hoàn tất bằng cách sử dụng các tế bào GPRC5D người làm kháng nguyên như mô tả trên. Theo phân tích NGS, chỉ mỗi trình tự chuỗi nặng được xác định cho mỗi ứng viên. Kết quả là mỗi chuỗi nặng phải được kết hợp với 4 chuỗi nhẹ mẹ (A27, B3, L6, O12), dẫn đến 348 kháng thể đơn dòng từ 87 trình tự Hc được xác định bằng NGS. Các kháng thể đơn dòng này được đánh giá ban đầu để liên kết với GPRC5D khỉ bằng cách sử dụng FACS. Dòng tế bào GPRC5D khỉ được chọn để sàng lọc ban đầu để tối đa hóa tín hiệu liên kết tiềm năng khi dòng tế bào GPRC5D khỉ có mức biểu hiện cao hơn dòng tế bào GPRC5D người. Tóm lại, sàng lọc FACS được thực hiện bằng cách chuẩn hóa nồng độ protein đến 1 ug/ml và 100 ul protein được trộn với 200.000 tế bào cho mỗi lỗ. Kháng thể đơn dòng được ủ với các tế bào trong 1 giờ ở 4 °C. Sau đó các tế bào được rửa 3 lần với PBS và FBS 0,2 %. Sau đó bổ sung kháng thể đơn dòng kháng kháng thể thứ cấp người được tiếp hợp với PE (Jackson cat # 709-116-149) dưới dạng thuốc thử phát hiện. Các tế bào và kháng thể thứ cấp được ủ trong 1 giờ ở

4 °C. Sau đó các tế bào được rửa 3 lần với PBS và FBS 0,2 %. Các tế bào được rửa lần nữa bằng cách sử dụng PBS và FBS 0,2 %, sau đó được phân tích trên FACSarry.

Quan sát được số lượng lớn kết quả là liên kết với GPRC5D khỉ, bao gồm 15 kháng thể đơn dòng với MFI trên 100.000, 23 kháng thể đơn dòng với MFI dưới 100.000 nhưng trên 10.000 và 63 kháng thể đơn dòng với MFI dưới 10.000 nhưng trên 1000. (Bảng 8).

Bảng 8: Dữ liệu liên kết FACS cho các kháng thể đơn dòng dẫn xuất từ NGS với GPRC5D khỉ. Các trình tự chuỗi nặng xác định từ phân tích NGS được ghép với mỗi chuỗi nhẹ mẹ như đã trình bày. GC5M29 được sử dụng làm đối chứng (chuỗi nhẹ PH9L3). Các kháng thể đơn dòng được tô đậm có MFI >1000

ID chuỗi nặng	Kháng thể đơn dòng GPRC5D [PH9L1 (A27)]	MFI	Kháng thể đơn dòng GPRC5D [PH9L2 (B3)]	MFI	Kháng thể đơn dòng GPRC5D [PH9L3 (L6)]	MFI	Kháng thể đơn dòng GPRC5D [PH9L4 (O12)]	MFI
GC5H18	GC5B22	198	GC5B23	230	GC5B24	246	**GC5B25**	31324
GC5H17	GC5B66	242	GC5B67	272	**GC5B68**	2682	**GC5B69**	17416
GC5H20	GC5B114	199	GC5B115	266	GC5B116	253	**GC5B117**	5037
GC5H15	**GC5B158**	14407	**GC5B159**	139766	**GC5B160**	84111	**GC5B161**	7856
GC5H13	**GC5B202**	89948	GC5B203	9173	**GC5B204**	15203	**GC5MB205**	52663
GC5H23	GC5B242	242	**GC5B243**	116641	GC5B244	249	GC5B245	469
GC5H14	GC5B282	487	GC5B283	341	GC5B284	249	**GC5B285**	87116
GC5H22	GC5B326	195	GC5B237	265	GC5B328	248	GC5B329	292
GC5H24	GC5B26	194	GC5B27	265	GC5B28	229	GC5B29	590
GC5H19	GC5B70	214	GC5B71	229	**GC5B72**	2013	**GC5B73**	3827
GC5H33	GC5B118	178	GC5B119	222	GC5B120	880	**GC5B121**	43924
GC5H36	**GC5B162**	86773	**GC5B163**	21970	**GC5B164**	122043	**GC5B165**	1870
GC5H31	GC5B206	467	**GC5B207**	3636	GC5B208	481	**GC5B209**	1409
GC5H29	GC5B246	202	**GC5B247**	3037	**GC5B248**	2835	**GC5B249**	1373
GC5H34	GC5B286	239	**GC5B287**	163990	GC5B288	259	GC5B289	271
GC5H35	GC5B330	202	GC5B331	552	**GC5B332**	191978	**GC5B333**	1591
GC5H26	GC5B30	204	GC5B31	230	**GC5B32**	16553	GC5B33	270
GC5H27	GC5B74	238	GC5B75	365	GC5B76	829	GC5B77	317
GC5H25	GC5B122	153	GC5B123	237	**GC5B124**	6026	**GC5B125**	6197
GC5H30	**GC5B166**	1510	**GC5B167**	6266	**GC5B168**	32482	GC5B169	327
GC5H47	**GC5B210**	1730	GC5B211	284	GC5B212	278	GC5B213	727
GC5H42	**GC5B250**	3969	**GC5B251**	213233	**GC5B252**	63295	GC5B253	574
GC5H37	**GC5B290**	8839	**GC5B291**	201024	**GC5B292**	110940	GC5B293	305

GC5H45	GC5B334	160	**GC5B335**	1434	**GC5B336**	3228	GC5B337	309
GC5H38	GC5B34	157	GC5B35	283	**GC5B36**	14936	GC5B37	297
GC5H40	GC5B78	162	GC5B79	309	GC5B80	428	**GC5B81**	74140
GC5H43	GC5B126	157	GC5B127	265	GC5B128	268	**GC5B129**	1283
GC5H49	**GC5B170**	1014	**GC5B171**	51995	**GC5B172**	1434	GC5B173	332
GC5H62	**GC5B214**	2565	GC5B215	274	GC5B216	263	**GC5B217**	1589
GC5H60	GC5B254	161	**GC5B255**	5788	GC5B256	460	GC5B257	308
GC5H94	GC5B294	190	**GC5B295**	2312	GC5B296	745	GC5B298	261
GC5H69	GC5B338	188	GC5B339	260	**GC5B340**	1798	GC5B341	290
GC5H85	**GC5B38**	10809	**GC5B39**	1112	**GC5B40**	110654	**GC5B41**	4379
GC5H96	GC5B82	165	GC5B83	272	**GC5B84**	1547	**GC5B85**	3563
GC5H97	GC5B130	174	GC5B131	293	GC5B132	306	GC5B133	343
GC5H76	GC5B174	219	**GC5B175**	3631	GC5B176	244	GC5B177	324
GC5H68	**GC5B218**	21420	GC5B219	310	GC5B220	777	GC5B221	762
GC5H79	GC5B256	714	GC5B257	1146	GC5B258	456	GC5B259	1129
GC5H71	GC5B298	185	GC5B299	1370	GC5B300	260	GC5B301	292
GC5H93	GC5B342	164	GC5B343	247	GC5B344	401	GC5B345	283
GC5H21	GC5B42	219	GC5B43	307	**GC5B44**	2694	**GC5B45**	1022
GC5H39	GC5B86	192	GC5B87	344	GC5B88	470	**GC5B89**	41027
GC5H50	GC5B134	764	GC5B135	340	GC5B136	600	**GC5B137**	2087
GC5H28	GC5B178	750	**GC5B179**	6708	**GC5B180**	1005	GC5B181	535
GC5H53	GC5B222	284	GC5B223	264	GC5B224	228	GC5B225	605
GC5H51	GC5B262	159	**GC5B263**	1013	GC5B267	238	GC5B268	309
GC5H64	GC5B302	184	GC5B303	329	GC5B304	240	**GC5B305**	1571
GC5H16	GC5B346	182	GC5B347	259	GC5B348	332	GC5B349	552
GC5H65	GC5B46	204	GC5B47	327	**GC5B48**	1320	GC5B49	392
GC5H32	GC5B90	335	GC5B91	340	**GC5B92**	1848	**GC5B93**	1780
GC5H54	GC5B138	193	GC5B139	354	GC5B140	323	GC5B141	292
GC5H99	GC5B182	196	**GC5B183**	6421	GC5B184	309	GC5B185	280
GC5H52	GC5B226	204	GC5B227	298	GC5B228	247	GC5B229	263
GC5H48	GC5B266	268	**GC5B267**	2160	GC5B268	235	GC5B269	281
GC5H44	GC5B306	204	GC5B307	313	GC5B308	302	GC5B309	621
GC5H46	GC5B350	198	GC5B351	287	**GC5B352**	4300	**GC5B353**	1708
GC5H56	GC5B50	229	**GC5B51**	36679	GC5B52	386	GC5B53	446
GC5H55	GC5B94	255	GC5B95	609	GC5B96	411	GC5B97	350
GC5H98	GC5B142	194	GC5B143	407	GC5B144	284	GC5B145	483
GC5H61	GC5B186	543	**GC5B187**	1132	GC5B188	376	GC5B189	333
GC5H92	GC5B320	297	GC5B321	294	GC5B322	280	GC5B323	386
GC5H5	GC5B17	243	GC5B18	301	**GC5B19**	1048	GC5B20	384
GC5H59	GC5B98	272	GC5B99	388	GC5B100	661	GC5B101	528
GC5H66	GC5B354	223	GC5B355	852	GC5B356	374	GC5B357	500
GC5H80	GC5B54	299	GC5B55	415	GC5B56	422	GC5B57	487

GC5H87	GC5B102	383	GC5B103	460	**GC5B104**	3130	GC5B105	456
GC5H67	GC5B146	325	GC5B147	370	GC5B148	383	GC5B149	487
GC5H73	GC5B190	236	**GC5B191**	2556	GC5B192	409	GC5B193	387
GC5H86	**GC5B230**	17885	GC5B231	543	GC5B232	494	GC5B233	620
GC5H70	GC5B270	390	GC5B271	660	GC5B272	389	GC5B273	450
GC5H90	GC5B314	219	GC5B315	334	GC5B316	363	GC5B317	403
GC5H95	GC5B358	211	GC5B359	344	GC5B360	414	GC5B361	449
GC5H74	GC5B58	294	GC5B59	448	GC5B60	477	GC5B61	548
GC5H78	GC5B106	267	GC5B107	440	GC5B108	474	GC5B109	497
GC5H77	GC5B150	312	GC5B151	452	GC5B152	412	GC5B153	709
GC5H91	GC5B194	296	GC5B195	448	GC5B196	491	GC5B197	483
GC5H57	**GC5B234**	128355	**GC5B235**	195348	**GC5B236**	134008	**GC5B237**	11255
GC5H41	GC5B274	313	**GC5B275**	7431	GC5B278	435	GC5B279	542
GC5H58	**GC5B318**	2608	**GC5B319**	5791	**GC5B320**	49616	**GC5B321**	4823
GC5H63	GC5B362	313	GC5B363	392	GC5B364	461	**GC5B365**	3613
GC5H72	GC5B62	326	GC5B63	463	GC5B64	485	GC5B65	694
GC5H75	**GC5B110**	208487	GC5B111	692	**GC5B112**	140269	**GC5B113**	104136
GC5H81	GC5B154	351	GC5B155	412	GC5B156	440	GC5B157	555
GC5H82	GC5B198	285	GC5B199	593	GC5B200	499	GC5B201	485
GC5H83	**GC5B238**	3698	**GC5B239**	4370	**GC5B240**	4676	GC5B241	825
GC5H88	**GC5B278**	3659	GC5B279	481	GC5B280	425	GC5B281	633
GC5H89	GC5B332	299	GC5B333	561	**GC5B334**	4467	GC5B335	494
GC5H84	GC5B366	544	GC5B367	474	**GC5B368**	6313	**GC5B369**	26116

40 kháng thể đơn dòng với ái lực liên kết cao nhất được chọn để đặc trưng hóa bổ sung, bao gồm bước lặp lại nghiên cứu liên kết với các tế bào GPRC5D khỉ, cũng như đánh giá liên kết với các tế bào biểu hiện GPRC5D người bằng cách sử dụng FACS (Bảng 9). Dữ liệu này được phân tích để chọn 17 kháng thể đơn dòng để tinh chế và tạo kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 (tô đậm). Các yếu tố được sử dụng để chọn các kháng thể đơn dòng để tinh chế và tạo kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 bao gồm tính đặc hiệu liên kết với GPRC5D người, sự phản ứng chéo với GPRC5D khỉ và tính đa dạng trình tự chuỗi nặng. Ví dụ, GC5H36 được kết hợp với 3 chuỗi nhẹ riêng biệt và được phân tích về liên kết (GC5B162, GC5B163, GC5B164). Chỉ GC5B164 tiến triển khi quan sát được kháng thể đơn dòng này là có MFI cao hơn đối với GPRC5D người so với GC5B162 hoặc GC5B163.

Bảng 9: Dữ liệu liên kết FACS giữa các kháng thể đơn dòng dẫn xuất từ NGS và các tế bào HEK293F biểu hiện GPRC5D người và khỉ. Các tế bào HEK293F không chuyển nhiễm được sử dụng để đánh giá tính đặc hiệu liên kết cho GPRC5D. TF7M1636 được sử dụng làm đối chứng lớp kháng thể. Các kháng thể đơn dòng đã tô đậm được chọn để phân tích thêm.

ID protein	ID peptit HC	MFI của GPRC5D khỉ	MFI của GPRC5D người	MFI của 293F
GC5B38	GC5H85	6.864	280	215
GC5B110	GC5H75	142.277	2.543	235
GC5B158	GC5H15	4.923	285	235
GC5B162	GC5H36	75.139	2.981	230
GC5B202	GC5H13	30.470	2.152	256
GC5B218	GC5H68	10.451	277	263
GC5B230	GC5H86	19.103	364	290
GC5B234	GC5H57	134.258	1.657	261
GC5B51	GC5H56	22.661	667	480
GC5B159	GC5H15	129.370	1.987	258
GC5B163	GC5H36	7.605	840	310
GC5B171	GC5H49	24.133	1.144	1.321
GC5B235	GC5H57	158.011	2.643	254
GC5B243	GC5H23	67.848	20.458	221
GC5B251	GC5H42	74.510	11.418	235
GC5B281	GC5H34	109.418	5.317	570
GC5B291	GC5H37	77.798	10.427	880
GC5B32	GC5H26	3.597	14.656	358
GC5B36	GC5H38	5.353	2.002	352
GC5B40	GC5H85	67.279	4.510	310
GC5B112	GC5H75	104.875	470	433
GC5B160	GC5H15	40.881	635	276
GC5B164	GC5H36	78.672	12.664	343
GC5B168	GC5H30	41.779	28.885	1.238
GC5B204	GC5H13	5.090	390	212
GC5B236	GC5H57	78.546	1.442	192
GC5B252	GC5H42	22.010	1.498	204
GC5B292	GC5H37	63.366	1.872	480
GC5B320	GC5H58	63.345	22.891	231
GC5B332	GC5H35	106.515	13.348	253
GC5B25	GC5H18	22.079	705	431
GC5B69	GC5H17	1.593	851	284
GC5B81	GC5H40	62.756	9.986	288

GC5B89	GC5H39	31.613	1.068	251
GC5B113	GC5H75	66.475	550	323
GC5B121	GC5H33	35.493	3.061	299
GC5B205	GC5H13	63.610	25.199	260
GC5B237	GC5H57	2.579	267	248
GC5B285	GC5H14	81.405	19.870	225
GC5B369	GC5H84	16.241	559	252
	TF7M1636	956	2.621	1.538
	2nd người	209	316	228
	kháng hGPRC5D	9.001	379	70
	kháng lớp kháng thể chuột	60	82	65
	không được nhuộm	44	50	33

Mức liên kết phụ thuộc nồng độ của mỗi kháng thể đơn dòng được chọn kháng các tế bào HEK293 biểu hiện GPRC5D người và các tế bào HEK293 không chuyển nhiễm được xác định bằng cách sử dụng FACS (Hình 1). Quan sát được tất cả kháng thể đơn dòng liên kết với GPRC5D người theo cơ chế phụ thuộc liều. Cũng quan sát được 3 kháng thể đơn dòng, GC5B36, GC5B168, và GC5B205, liên kết với các tế bào HEK293 không chuyển nhiễm (GPRC5D bất hoạt) và không được ưu tiên do tương tác không đặc hiệu với các tế bào.

14 kháng thể đơn dòng còn lại được chọn để tạo kháng thể đặc hiệu đôi với CD3B219 nhánh kháng CD3 và B23M46 nhánh bất hoạt kháng RSV (Bảng 10).

Bảng 10: Mối quan hệ giữa các ID kháng thể đơn dòng GPRC5D và các ID đặc hiệu đôi.

ID protein kháng thể đơn dòng GPRC5D	ID đặc hiệu đôi x CD3	ID đặc hiệu đôi x B23 bất hoạt
GC5B320	GCDB44	GCDB30
GC5B243	GCDB40	GCDB26
GC5B285	GCDB43	GCDB29
GC5B332	GCDB45	GCDB31
GC5B164	GCDB35	GCDB21
GC5B251	GCDB41	GCDB27
GC5B81	GCDB32	GCDB18
GC5B235	GCDB38	GCDB24
GC5B110	GCDB34	GCDB20
GC5B202	GCDB36	GCDB22

GC5B234	GCDB37	GCDB23
GC5B252	GCDB42	GCDB28
GC5B236	GCDB39	GCDB25
GC5B89	GCDB33	GCDB19

Một kháng thể đặc hiệu đôi, GCDB38, kết tủa khi tái tổ hợp và kháng thể đặc hiệu đôi khác, GCDB36, chứa >10 % kết tụ. Tất cả kháng thể đặc hiệu đôi khác đã thông qua tiêu chí phóng thích chuẩn và các kháng thể đặc hiệu đôi nhánh bất hoạt được phân tích về liên kết phụ thuộc nồng độ với các tế bào HEK293 biểu hiện GPRC5D người (Hình 2).

Quan sát được tất cả kháng thể đặc hiệu đôi liên kết theo cơ chế phụ thuộc liều. GC5B320 được đưa vào làm thuốc so sánh liên kết để thấy rõ sự khác biệt liên kết giữa kháng thể đơn dòng lưỡng trị và kháng thể đặc hiệu đôi đơn trị. GCDB44 được đưa vào làm thuốc so sánh liên kết để thấy rõ sự khác biệt liên kết giữa kháng thể đặc hiệu đôi kháng CD3 và kháng thể đơn dòng nhánh bất hoạt kháng RSV. Quan sát được sự giảm ái lực liên kết biểu kiến theo dự tính khi so sánh kháng thể đơn dòng GC5B320 với kháng thể đặc hiệu đôi GCDB30 và GCDB44. Ngoài ra, quan sát được GCDB44 (kháng thể đặc hiệu đôi kháng CD3) có ái lực liên kết cao hơn đôi chút với các tế bào kháng GPRC5D người so với GCDB30 (kháng thể đặc hiệu đôi nhánh bất hoạt kháng RSV), chứng minh rằng nhánh kháng CD3 được tác động tích cực khi liên kết với dòng tế bào này.

Nhóm kháng thể đặc hiệu đôi cũng được lập mức liên kết kháng tế bào MM1R và H929, biểu hiện nội sinh GPRC5D (Hình 3). Mức liên kết của các kháng thể đặc hiệu đôi trên các tế bào MM1R và H929 được so sánh với các tế bào HEK293F GPRC5D người được biểu hiện quá mức và các tế bào HEK293 không chuyển nhiễm bằng cách sử dụng FACS. Quan sát được các kháng thể đặc hiệu đôi liên kết với GPRC5D như biểu hiện nội sinh trên tế bào MM1R và H929 với khoảng ái lực. Quan sát được liên kết cao nhất với các tế bào HEK GPRC5D người, như dòng tế bào ổn định được biểu hiện quá mức, có mật độ thụ thể cao hơn nhiều so với tế bào MM1R hoặc H929. GCDB37, GCDB38, GCDB39 và GCDB41 không tiến triển do ái lực liên kết thấp quan sát được đối với các tế bào H929 và MM1R.

Cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc tế bào T *trong ống nghiệm*

Nhóm kháng thể đặc hiệu đôi được lập mức hiệu lực trong xét nghiệm gây độc tế bào qua trung gian tế bào T bằng cách sử dụng tế bào đích H929 và MM1R (Hình 4 A và B, Bảng 11). Tóm lại, tế bào đích (tế bào H929, MM1.R, OPM2, LP-1 và Daudi hoặc HEK mẹ và HEK+GPRC5D) được đếm và 10 triệu tế bào được ly tâm ở 1350 vòng/phút trong 3 phút và các viên tế bào được tái huyền phù trong 1 ml dung dịch CFSE pha loãng (nhuộm tăng sinh CellTrace CFSE được tái tạo trong 18 µl DMSO vô trùng và 1 µl dung dịch được pha loãng trong 10 ml PBS vô trùng) và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 8 phút trong tối. Sau khi ủ, 1 ml HI FBS được thêm vào huyền phù tế bào để dập tắt CFSE dư. Các tế bào được rửa hai lần trong RPMI-1640 với FBS 10 %. Sau khi tái tạo trong 10 ml RPMI, các tế bào được đếm và khả năng sống sót của tế bào được ghi lại trong bảng tính. Các tế bào được pha loãng đến 2,2 x10^5/ml và được ủ ở 37 °C đến khi sử dụng.

Sàng lọc các tế bào T từ các đối tượng cho bình thường được rã đông trong bể điều nhiệt 37 °C và các tế bào được ly tâm ở 1350 vòng/phút ở 4 °C trong 3 phút. Các lớp bề mặt được loại bỏ và tái tạo trong môi trường nuôi cấy với nồng độ 1,1x10^6/ml. 2x10^5 tế bào đích được thêm vào các lỗ của đĩa có đáy chữ U 96 lỗ, tiếp theo là chất ức chế Fc (đến khi đạt nồng độ cuối là 2 mg/ml). Tất cả dòng tế bào được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút để ức chế hoạt tính thụ thể Fc. 1x10^5 tế bào T được thêm vào các lỗ (tỷ lệ tế bào thực thi:tế bào đích là 5:1). Sau khi các tế bào đích và tế bào T được trộn với nhau, 20 µl dung dịch pha loãng kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 được thêm vào mỗi lỗ. Các kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 được pha loãng đến 800 µg/ml (10X) trong PBS. Sự chuẩn độ được chuẩn bị trong các dung dịch pha loãng tuần tự gấp 4 lần trong PBS trong đĩa có đáy chữ U 96 lỗ. Cột cuối cùng chỉ còn lại PBS (đối chứng chất mang). Các đĩa được ủ ở 37 °C với 5 % CO_2 trong 48 giờ.

Hai ngày sau (48 giờ), các đĩa được ly tâm và 100 µl lớp bề mặt được lưu trữ ở -80 °C cho xét nghiệm phóng thích cytokin. Các tế bào được rửa trong 200 µl PBS và được ủ trong 50 µl thuốc nhuộm giúp phân biệt tế bào sống/chết near-IR (tỷ lệ pha loãng 1:200) và kháng thể PE kháng CD25 (tỷ lệ pha loãng 1:50) trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các tế bào được rửa một lần trong 200 µl dung dịch đệm FACS và cuối cùng được tái tạo trong 150 µl dung dịch đệm FACS. Các tế bào được phân tích bằng cách sử dụng FACSCanto II và FlowJo 7.6 về cơ chế gây độc

tế bào đích (% tế bào đích) và sự hoạt hóa tế bào T CD25+ (% tế bào T sống). Việc vẽ đồ thị và làm khớp dữ liệu được thực hiện trong GraphPad Prism 6 bằng cách sử dụng hồi quy phi tuyến tính với hàm dốc biến thiên (bốn tham số) sử dụng phương pháp bình phương tối thiểu.

Bảng 11: EC_{50} trung bình được tính từ đánh giá cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T của các kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 bằng cách sử dụng tế bào đích H929 và MM1R.

GPRC5D x CD3 EC50 (nM)			
ID đặc hiệu đôi	H929 (n=5)	MM1R (n=3)	Xếp hạng (trung bình) H929/MM1R
GCDB32	0,39 ± 0,3	0,12 ± 0,1	2/1
GCDB33	4,29 ± 1,28	0,8 ± 0,18	7/6
GCDB34	2,13 ± 0,93	0,77 ± 0,24	5/5
GCDB35	1,39 ± 0,84	0,74 ± 0,32	4/4
GCDB36	5,2 ± 0,93	4,22 ± 0,55	8/9
GCDB40	1,2 ± 0,92	0,52 ± 0,38	3/3
GCDB41	NA	2,58 ± 0,15	10/8
GCDB43	0,36 ± 0,41	0,21 ± 0,29	1/2
GCDB44	10,29 ± 2,65	4,41 ± 0,29	9/10
GCDB45	2,25 ± 1	0,91 ± 0,93	6/7

Tất cả kháng thể đặc hiệu đôi hoạt động khi tiêu diệt tế bào H929 qua trung gian tế bào T, với khoảng hiệu lực quan sát được (Bảng 11). Quan sát được thứ tự xếp hạng tương tự cho cả hai dòng tế bào. Tuy nhiên, quan sát thấy EC_{50} thấp hơn trong tế bào MM1R. Điều đáng quan tâm là ái lực liên kết không tương quan hiệu lực cần thiết trong xét nghiệm cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T. Ví dụ, GCDB44 là kháng thể liên kết ái lực cao nhất nhưng ít hiệu lực nhất trong xét nghiệm cơ chế gây độc tế bào. Trong khi GCDB43, với ái lực liên kết tương tự, mặc dù hơi thấp hơn, có hiệu lực nhất trong xét nghiệm gây độc tế bào.

Để đánh giá phản ứng chéo chức năng với GPRC5D khỉ, nhóm kháng thể đặc hiệu đôi được lập mức gây độc tế bào qua trung gian tế bào T và hoạt hóa tế bào T bằng cách sử dụng tế bào HEK293 GPRC5D khỉ (Hình 5A và B). Tất cả kháng thể đặc hiệu

đôi đều hoạt động trong xét nghiệm này mặc dù quan sát thấy khoảng hiệu lực kháng tế bào biểu hiện GPRC5D+ khỉ.

Hiệu lực *trên cơ thể sống*

Nghiên cứu mức chuẩn *trên cơ thể sống* được hoàn tất để thấy rõ hiệu lực *trên cơ thể sống* của các kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D X CD3 này. GCDB32 và GCDB35 (Hình 5 A & B) được chọn để thử nghiệm trong mẫu khối u phòng ngừa H929. Các tế bào H929 được cấy vào chuột NSG, một tuần sau khi tiêm PBMC người. Điều trị bằng kháng thể đặc hiệu đôi được bắt đầu cùng lúc khi tế bào H929 được cấy và được tiếp tục 2 hoặc 3 ngày một lần (q2d hoặc q3d) với liều 10 ug, 1 ug, và 0,1 ug/con vật trong tổng số 5 liều điều trị. 10 con chuột được sử dụng trong mỗi nhóm và PBS được sử dụng làm đối chứng chất mang. Dừng điều trị vào ngày 11 và kết thúc nghiên cứu vào ngày 25 (Hình 6A và B) hoặc ngày 26 (Hình 12 A-D). Tất cả kháng thể GPRC5D x CD3 được thử nghiệm trong mẫu phòng ngừa này cho thấy sự ức chế tăng trưởng khối u 100 % với liều 10 và 1 ug/con vật ngoại trừ GCDB35 cho thấy sự ức chế tăng trưởng khối u 80 % của vòng với liều 1 ug/con vật. Với liều thấp hơn gấp 10 lần (0,1 ug/con vật), các kháng thể đặc hiệu đôi này cho thấy mức độ hiệu quả ức chế tăng trưởng khối u thay đổi trong khoảng từ 10 đến 80 %.

Cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc tế bào T *trong ống nghiệm* khi có chất ức chế Fc.

Để hiểu rõ hơn tính đặc hiệu của nhánh nhắm đích GPRC5D, nhóm kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 được đánh giá trong xét nghiệm cơ chế gây độc tế bào chuyển hướng tế bào T khi có chất ức chế Fc. Đây là thí nghiệm quan trọng để hiểu tính đặc hiệu vì các tế bào đích cho kháng thể đặc hiệu đôi là các tế bào B biểu hiện các thụ thể Fcγ có khả năng tương tác với phần Fc của kháng thể đặc hiệu đôi trong xét nghiệm *trong ống nghiệm*. Quan sát thất sự thay đổi hiệu lực trong xét nghiệm cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T cho số lượng kháng thể đặc hiệu đôi, với sự thay đổi lớn nhất quan sát được đối với GCDB40 và GCDB34 (Hình 7A-7B).

Đo trực tiếp các tương tác liên kết giữa 4 kháng thể đặc hiệu đôi hiệu lực nhất (GCDB32, GCDB35, GCDB40, và GCDB43) và các thụ thể Fcγ được hoàn tất (Hình 8A-8D). Một vòng phân tích sàng lọc Alpha được thực hiện cho mỗi thụ thể Fcγ và các kháng thể đặc hiệu đôi nêu trên. Tất cả mẫu được xét nghiệm theo bộ hai mẫu. Trên FcγRI, 4 kháng thể đặc hiệu đôi hoạt động như B21M hIgG4 PAA. Nghĩa là chúng không cạnh tranh hơn đối chứng lớp kháng thể trùng khớp. Sự khác nhau tương tự cũng được quan sát giữa đối chứng hIgG1 WT và 4 kháng thể đặc hiệu đôi trên FcγRIIIa, với GCD43 giống với đối chứng lớp kháng thể IgG4PAA nhất và các kháng thể đặc hiệu đôi khác có ái lực cao hơn đôi chút đối với FcγRIIIa. Trên FcγRIIa và FcγRIIb, 4 kháng thể đặc hiệu đôi cạnh tranh theo trình tự sau: GCDB40 > GCDB32 > GCDB43 > GCDB35. GCDB40 có tính cạnh tranh cao nhất hoặc liên kết với ái lực cao nhất với FcγRIIa và FcγRIIb. Thực tế, GCDB40 cạnh tranh trên FcγRIIa và FcγRIIb với mức độ giống như hIgG1 WT, chứng minh rõ hơn sự thay đổi hiệu lực quan sát được trong xét nghiệm cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T khi chất ức chế Fc được sử dụng. Do các tương tác ngoài dự kiến với FcγRIIa và FcγRIIb, GCDB40 không tiến triển.

Xét nghiệm liên kết cạnh tranh

Các kháng thể đơn dòng kháng GPRC5D được đánh giá về liên kết cạnh tranh với nhau với các tế bào GPCR5D người. Tóm lại, các tế bào được đặt lên đĩa với mật độ 50.000 tế bào/lỗ trong 50 uL môi trường và được làm ổn định trong 90 phút ở 37 °C. Sau đó các lỗ được phủ với BSA 3 % trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các kháng thể đơn dòng được dán nhãn với ruthenium (II) tris-bipyriđin N-hyđroxysuxinimit (nhãn Ru) sau quy trình chuẩn. Trong đĩa 96 lỗ riêng biệt, 5 uM kháng thể đơn dòng cạnh tranh được ủ với 50 nM kháng thể đơn dòng được dán nhãn Ru. Dung dịch ức chế được loại khỏi đĩa tế bào và 25 uL dung dịch kháng thể đơn dòng được bổ sung. Các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và được lắc. Sau khi rửa các đĩa ba lần với PBS, 150 uL dung dịch đệm đọc MSD (không có chất hoạt động bề mặt) được thêm vào và sự liên kết kháng thể dán nhãn Ru được phát hiện bằng thiết bị đọc đĩa MSD.

Tất cả kháng thể đơn dòng thuộc cùng nhóm cạnh tranh, với chỉ GC5B420 và GC5B421 không cạnh tranh hoàn toàn theo GC5B81, GC5B285, và/hoặc

GC5B332 (ức chế < 70 %) (Bảng 12). Giả thuyết rằng sự liên kết đồng thời 2 kháng thể đơn dòng với GPRC5D có thể không khả thi trong không gian do kích thước nhỏ của miền ngoại bào của GPRC5D so với kích thước của kháng thể đơn dòng.

Bảng 12: Phân họ epitope liên kết cạnh tranh của các kháng thể đơn dòng kháng GPRC5D. Các kháng thể đơn dòng kháng GPRC5D được đánh giá về liên kết cạnh tranh với nhau với các tế bào GPCR5D người (+/- = ức chế < 70 %).

ID mAb (kháng thể đơn dòng)	GC5B81	GC5B164	GC5B285	GC5B332	GC5B420	GC5B421
GC5B81	+	+	+	+	+/-	+/-
GC5B164	+	+	+	+	+	+
GC5B285	+	+	+	+	+	+/-
GC5B332	+	+	+	+	+/-	+
GC5B420	+	+	+	+	+	+
GC5B421	+	+	+	+	+	+
GC5B243	+	+	+	+	+	+

VÍ DỤ 4: TẠO CÁC KHÁNG THỂ GPRC5D BẰNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO LAI

Ba con chuột Balb/c được tạo miễn dịch trong da ở đuôi với ADN plasmit pCMV6-neo (vùng khởi động CMV) biểu hiện GPRC5D đầy đủ chiều dài vào ngày 0, 10, và 20. Chuột được tạo miễn dịch trong tĩnh mạch và màng bụng vào ngày 59 với các tế bào bệnh bạch cầu tế bào ưa kiềm cấp tính ở chuột (RBL) biểu hiện quá mức GPRC5D người đầy đủ chiều dài. Vào ngày 63, các hạch bạch huyết và các lá lách được thu thập, thực hiện làm giàu tế bào B và các tế bào được sử dụng để tạo ~3500 tế bào lai tiết ra kháng thể đơn dòng.

VÍ DỤ 5: ĐẶC TRƯNG HÓA BAN ĐẦU CÁC KHÁNG THỂ GPRC5D ĐƯỢC THỰC HIỆN BẰNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO LAI

Liên kết GPRC5D

Các tế bào lai được sàng lọc bằng cách sử dụng FACS để liên kết với RBL và tế bào RBL biểu hiện GPRC5D người. Tỷ lệ MFI điều chỉnh nền của từng kháng thể

đơn dòng liên kết với các tế bào GPRC5D_RBL so với các tế bào RBL không chuyển nhiễm được tính và mẫu bất kỳ với tỷ lệ liên kết lớn hơn 3 có khả năng được xem là dương tính. 99 tế bào lai có tỷ lệ lớn hơn 3 và được phát triển để tách dòng vùng v. 31 trình tự kháng thể đơn dòng được xác định, tổng hợp, biểu hiện và tinh chế. Hai trong 31 kháng thể đơn dòng được biểu hiện liên kết với các tế bào RBL_GPRC5D trên nền (Hình 9A và 8B). GCDB390 và GCDB396 được chọn để biểu hiện, tinh chế và tạo kháng thể đặc hiệu đôi với CD3B219 nhánh kháng CD3 để lần lượt tạo kháng thể đặc hiệu đôi GCDB46 và GCDB47.

Cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc tế bào T

GCDB46 và GCDB47 được đánh giá trong xét nghiệm cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T (Hình 10A và 10B). Cả hai kháng thể đặc hiệu đôi quan sát được là có hiệu lực, với EC_{50} được báo cáo lần lượt là 0,67 và 0,1 nM. Dựa trên dữ liệu này, cả hai kháng thể đơn dòng được phát triển để tối ưu hóa dẫn đầu cùng với 3 kháng thể đơn dòng dẫn xuất từ thực khuẩn.

VÍ DỤ 6: ĐÁNH GIÁ, LỰA CHỌN VÀ TỐI ƯU HÓA KẾT QUẢ

5 kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D được chọn để tối ưu hóa dẫn đầu (GCDB32, GCDB43, GCDB35, GCDB46, GCDB47) dựa trên sự liên kết, chức năng, phản ứng chéo và dữ liệu chọn lọc được tóm tắt trong Bảng 13.

Bảng 13: Dữ liệu tối ưu hóa dẫn đầu cho các kháng thể GPRC5D x CD3. Các kháng thể đặc hiệu đôi được đánh giá về liên kết, chức năng, phản ứng chéo và chọn lọc.

GPRC5D x CD3 ID	Chọn lọc	Tiêu diệt tế bào đích qua trung gian tế bào T			
	Liên kết với GPRC5A, B, C	H929 EC50 ± SD (nM)	MM1R EC50 ± SD (nM)	H929 không chất ức chế Fc so với có chất ức chế Fc	EC50 GPRC5D khỉ (nM)
GCDB32	Không liên kết	0,43 ± 0,29	0,12 ± 0,01	2,4	0,19
GCDB43	Không liên kết	0,39 ± 0,07	0,54	2,8	0,95
GCDB40	Không liên kết	1,2 ± 0,83	0,52 ± 0,31	5,1	10,61
GCDB35	Thấp	1,39 ± 0,75	0,74 ± 0,26	2,7	4,65
GCDB34	Không liên kết	2,01 ± 0,74	0,77 ± 0,09	6,3	1,14
GCDB45	Không liên kết	2,36 ± 0,84	0,91 ± 0,76	2,2	2,82
GCDB33	Không liên kết	5,21 ± 1,21	0,8 ± 0,15	1,5	0,2

GCDB36	Thấp	5,57 ± 0,47	4,22 ± 0,29		3,35
GCDB46	Không liên kết	0,67			
GCDB47	Không liên kết	0,1			
GCDB48	Không liên kết	0,17			Không hoạt động

Tối ưu hóa dẫn đầu nhằm giải quyết rủi ro trình tự điều hòa sau dịch mã tiềm năng (PTM) cho GCDB32 (kháng thể đơn dòng mẹ GC5B81), GCDB43 (kháng thể đơn dòng mẹ GC5B285) và GCDB35 (kháng thể đơn dòng mẹ GC5B164) như đã nêu trong Bảng 14.

Bảng 14: Khả năng giải trình tự làm giảm PTM cho các kết quả dẫn xuất từ thực khuẩn. Các trình tự CDR chuỗi nặng được trình bày với khả năng giải trình tự PTM tiềm năng được gạch dưới.
(Các SỐ ID TRÌNH TỰ cho mỗi trình tự được cho trong dấu ngoặc)

ID GPCR5D	ID chuỗi nặng GPRC5D	CDR1 chuỗi nặng	CDR2 chuỗi nặng	HcCDR3
GC5B81	GC5H40	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRWRGYKLD (9)
GC5B285	GC5H14	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAWDFGRRAVRLDY (30)
GC5B164	GC5H36	SYWIG (27)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)

Tất cả biến thể PTM được xét nghiệm cho GC5B81 đã giảm đáng kể về ái lực liên kết, chứng minh mức độ rủi ro của đơn phân này (HC W102) đối với paratope (Bảng 15).

Bảng 15: Các trình tự CDR và dữ liệu liên kết của thư viện GC5B81 PTM. Vị trí đột biến được gạch dưới. Liên kết được phân loại như MFI >10.000 = ++; MFI >1.000 = +; MFI <1.000
(Các SỐ ID TRÌNH TỰ cho mỗi trình tự được cho trong dấu ngoặc)

ID GPRC5D	ID chuỗi nặng	Đột biến	CDR1 chuỗi nặng	CDR2 chuỗi nặng	CDR3 chuỗi nặng	GPRC5D người (FACS)
GC5B427	GC5H199	W102Y	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRYRGYKLDY (31)	-
GC5B428	GC5H198	W102V	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRVRGYKLDY (32)	-

GC5B430	GC5H196	W102G	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRGRGYKLDY (33)	-
GC5B431	GC5H195	W102A	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRARGYKLDY (34)	-
GC5B429	GC5H197	W102F	SYAIS (1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (5)	ESRFRGYKLDY (35)	-

Các nghiên cứu liên kết xác định số lượng đột biến cho cả GC5B285 và GC5B164 giữ liên kết với GPRC5D người (Bảng 16 và 17).

Bảng 16: Các trình tự CDR và dữ liệu liên kết của thư viện GC5B164 PTM. Vị trí đột biến được gạch dưới. Liên kết được phân loại như MFI >10.000 = ++; MFI >1.000 = +; MFI <1.000.

(Các SỐ ID TRÌNH TỰ cho mỗi trình tự được cho trong dấu ngoặc)

ID GPRC5D	ID chuỗi nặng	Đột biến	CDR1 chuỗi nặng	CDR2 chuỗi nặng	CDR3 chuỗi nặng	Liên kết GPR5D người (FACS)
GC5B471	GC5H278	D55A, W33Y	SYYIG (36)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B472	GC5H277	D55A, W33V	SYVIG (37)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B473	GC5H276	D55A, W33F	SYFIG (3)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B474	GC5H275	D55A, W33G	SYGIG (38)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B475	GC5H274	D55A, W33A	SYAIG (39)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B476	GC5H273	D55S, W33Y	SYYIG (36)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B477	GC5H272	D55S, W33V	SYVIG (37)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B478	GC5H271	D55S, W33F	SYFIG (3)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B479	GC5H270	D55S, W33G	SYGIG (38)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B480	GC5H269	D55S, W33A	SYAIG (39)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B481	GC5H268	D55K, W33Y	SYYIG (36)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B482	GC5H267	D55K, W33V	SYVIG (37)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B483	GC5H266	D55K, W33F	SYFIG (3)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B484	GC5H265	D55K, W33G	SYGIG (38)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B485	GC5H264	D55K, W33A	SYAIG (39)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B486	GC5H263	D55E, W33Y	SYYIG (36)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B487	GC5H262	D55E, W33V	SYVIG (37)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B488	GC5H261	D55E, W33F	SYFIG (3)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B489	GC5H260	D55E, W33G	SYGIG (38)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	-
GC5B490	GC5H259	D55E, W33A	SYAIG (39)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B491	GC5H258	D55Y, W33Y	SYYIG (36)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B492	GC5H257	D55Y, W33V	SYVIG (37)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B493	GC5H256	D55Y, W33F	SYFIG (3)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B494	GC5H255	D55Y, W33G	SYGIG (38)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+
GC5B495	GC5H254	D55Y, W33A	SYAIG (39)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	+

GC5B496	GC5H253	W33Y	SYYIG (36)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B497	GC5H252	W33V	SYVIG (37)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B498	GC5H251	W33F	SYFIG (3)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B499	GC5H250	W33G	SYGIG (38)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	-
GC5B500	GC5H249	W33A	SYAIG (39)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	-
GC5B501	GC5H248	D55A	SYWIG (27)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B502	GC5H247	D55S	SYWIG (27)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B503	GC5H246	D55K	SYWIG (27)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B504	GC5H245	D55E	SYWIG (27)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++
GC5B505	GC5H244	D55Y	SYWIG (27)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	++

Bảng 17: Các trình tự CDR và dữ liệu liên kết của thư viện GC5B285 PTM. Vị trí đột biến được gạch dưới. Liên kết được phân loại như MFI >10.000 = ++; MFI >1.000 = +; MFI <1.000.

(Các SỐ ID TRÌNH TỰ cho mỗi trình tự được cho trong dấu ngoặc)

ID GPRC5D	ID chuỗi nặng	Đột biến	CDR1 chuỗi nặng	CDR2 chuỗi nặng	CDR3 chuỗi nặng	GPRC5D người (FACS)
GC5B463	GC5H234	D62A,W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAASVKG (44)	AAYDFGRRAVRLDY (48)	++
GC5B432	GC5H228	D62S,W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYASSVKG (6)	AAVDFGRRAVRLDY (49)	++
GC5B465	GC5H227	D62S,W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYASSVKG (6)	AAFDFGRRAVRLDY (97)	++
GC5B433	GC5H223	D62K,W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAKSVKG (45)	AAVDFGRRAVRLDY (49)	++
GC5B434	GC5H222	D62K,W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAKSVKG (45)	AAFDFGRRAVRLDY (97)	++
GC5B435	GC5H219	D62E,W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AAYDFGRRAVRLDY (48)	+
GC5B436	GC5H217	D62E,W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AAFDFGRRAVRLDY (97)	+
GC5B461	GC5H216	D62E,W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AAGDFGRRAVRLDY (50)	-
GC5B462	GC5H215	D62E,W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AAADFGRRAVRLDY (51)	++
GC5B437	GC5H214	D62Y,W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAYDFGRRAVRLDY (48)	+
GC5B438	GC5H213	D62Y,W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAVDFGRRAVRLDY (49)	+
GC5B439	GC5H212	D62Y,W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAFDFGRRAVRLDY (97)	+
GC5B440	GC5H211	D62Y,W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAGDFGRRAVRLDY (50)	-
GC5B441	GC5H210	D62Y,W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAADFGRRAVRLDY (51)	+
GC5B442	GC5H209	W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAYDFGRRAVRLDY (48)	+
GC5B443	GC5H208	W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAVDFGRRAVRLDY (49)	+
GC5B444	GC5H207	W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAFDFGRRAVRLDY (97)	+
GC5B464	GC5H206	W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAGDFGRRAVRLDY (50)	+
GC5B445	GC5H205	W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAADFGRRAVRLDY (51)	+
GC5B446	GC5H204	D62A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAASVKG (44)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	+
GC5B447	GC5H203	D62S	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYASSVKG (6)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	+

GC5B448	GC5H202	D62K	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAKSVKG (45)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	+
GC5B449	GC5H201	D62E	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	+
GC5B450	GC5H200	D62Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	+

Dựa trên dữ liệu liên kết này, các kháng thể đơn dòng đã chọn được tạo dưới dạng kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 và được đánh giá về cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T của tế bào H929 (Bảng 18).

Bảng 18: Hoạt tính chức năng của biến thể GPRC5D PTM được chọn cho GCDB164 và GCDB285

ID kháng thể đơn dòng GPRC5D mẹ	ID AA protein GPRC5D	ID GPRC5D x CD3	H929 EC_{50} (nM)	Được chọn làm dẫn đầu
GC5B285	GC5B432	GCDB50	1,3	
	GC5B433	GCDB51	0,81	
	GC5B434	GCDB52	2,81	
	GC5B465	GCDB53	0,24	XX
	GC5B463	GCDB54	3,09	
GC5B164	GC5B471	GCDB57	3,87	
	GC5B476	GCDB58	1,24	
	GC5B478	GCDB59	1,54	
	GC5B481	GCDB60	2,94	
	GC5B483	GCDB61	1,51	XX
	GC5B493	GCDB62	3,1	

Khoảng hiệu lực được quan sát trong xét nghiệm cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T không cần thiết được dự đoán theo ái lực liên kết đã quan sát. Ví dụ, GC5B465 và GC5B463 liên kết với ái lực tương tự với GPRC5D người chỉ khác về trình tự của 2 axit amin (Bảng 17) và được quan sát là có sự chênh lệch gấp 12,5 lần về hiệu lực như kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 (Bảng 18). Dựa trên dữ liệu chức năng GC5B465 và GC5B483 được chọn làm các trình tự tối ưu hóa cho GC5B285 (GCDB43 như CD3 đặc hiệu đôi) và GC5B164 (GCDB35 như CD3 đặc hiệu đôi).

Thích ứng với khung của người cũng được hoàn tất cho các kháng thể đơn dòng GPCR5D được dẫn xuất từ tế bào lai chuột (lần lượt là GC5B390 và GC5B396, hoặc GCDB46 và 47 như CD3 đặc hiệu đôi). Các nghiên cứu liên kết xác định số

lượng khung cho GC5B396 và một khung cho GC5B390 giữ liên kết với GPRC5D người (Bảng 19).

Bảng 19: Dữ liệu chức năng và liên kết cho sự thích ứng khung người của thư viện kháng thể đơn dòng kháng GPRC5D dẫn xuất từ tế bào lai. Liên kết được phân loại như MFI >10.000 = +++; MFI >5.000 = ++; MFI > 1.000 = +; MFI <1.000.

ID kháng thể đơn dòng mẹ GPRC5D	ID AA kháng thể đơn dòng GPRC5D	ID chuỗi nặng	ID chuỗi nhẹ	GPRC5D người (FACS)	ID GPRC5D x CD3	H929 EC50 (nM)
GPRC5D B396	GC5B541	GC5H241	GC5L58	+		
	GC5B540	GC5H240	GC5L58	+++	GCDB69	0,58
	GC5B539	GC5H242	GC5L58	++		
	GC5B538	GC5H243	GC5L58	++		
	GC5B537	GC5H241	GC5L57	+		
	GC5B536	GC5H240	GC5L57	+++	GCDB68	2,51
	GC5B535	GC5H242	GC5L57	+		
	GC5B534	GC5H243	GC5L57	++		
	GC5B533	GC5H241	GC5L56	+		
	GC5B532	GC5H240	GC5L56	+++	GCDB67	0,61
	GC5B531	GC5H242	GC5L56	++		
	GC5B530	GC5H243	GC5L56	+++	GCDB66	1,41
	GC5B529	GC5H241	GC5L55	++		
	GC5B528	GC5H240	GC5L55	+++	GCDB65	1,01
	GC5B527	GC5H242	GC5L55	-		
	GC5B526	GC5H243	GC5L55	++	GCDB64	1,5
GPRC5D B390	GC5B525	GC5H279	GC5L53	-		
	GC5B524	GC5H237	GC5L53	-		
	GC5B523	GC5H238	GC5L53	-		
	GC5B522	GC5H236	GC5L53	-		
	GC5B521	GC5H279	GC5L52	-		
	GC5B520	GC5H237	GC5L52	-		
	GC5B519	GC5H238	GC5L52	-		
	GC5B518	GC5H236	GC5L52	-		
	GC5B517	GC5H279	GC5L51	+		
	GC5B516	GC5H237	GC5L51	+		
	GC5B515	GC5H238	GC5L51	++	GCDB63	0,52
	GC5B514	GC5H236	GC5L51	+		
	GC5B513	GC5H279	GC5L50	-		
	GC5B512	GC5H237	GC5L50	+		
	GC5B511	GC5H238	GC5L50	+		

	GC5B510	GC5H236	GC5L50	+		
	GC5B509	GC5H279	GC5L49	-		
	GC5B508	GC5H237	GC5L49	+		
	GC5B507	GC5H238	GC5L49	+		
	GC5B506	GC5H236	GC5L49	+		

Dựa trên dữ liệu liên kết, một số kháng thể đơn dòng kháng GPCR5D được tạo dưới dạng kháng thể đặc hiệu đôi CD3 và được đánh giá về cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T của tế bào H929 (Bảng 18). Phân tích chức năng xác định GCDB63, GCDB67, và GCDB69 như các kháng thể GPRC5D x CD3 đặc hiệu đôi được nhân hóa hoàn toàn có hiệu lực. Dựa trên các dữ liệu này, kháng thể đơn dòng kháng GPRC5D, GC5B515, GC5B532, và GC5B540 tương ứng được chọn làm trình tự được nhân hóa hoàn toàn cho GC5B390 và GC5B391.

Tối ưu hóa dẫn đầu bổ sung của trình tự được nhân hóa hoàn toàn được hoàn tất với mục đích giải quyết rủi ro trình tự điều hòa sau dịch mã tiềm năng cho GC5B515, GC5B532, và GCDB540. Đột biến G56S được tạo trong trình tự chuỗi nặng để loại bỏ rủi ro khử tiềm năng cho GC5B515 (Bảng 20).

Bảng 20: Hoạt tính chức năng và liên kết của biến thể GPRC5D PTM được chọn cho GC5B532, GC5B540 và GCDB515.

ID kháng thể đơn dòng mẹ GPRC5D	ID AA kháng thể đơn dòng GPRC5D	Đột biến	GPRC5D người (FACS)	ID GPRC5D x CD3	H929 EC50 (nM)
GC5B540	GC5B590	M64K	+++		
	GC5B592	G99A	+		
	GC5B594	M64K, G99A	+		
GC5 B532	GC5B591	M64K	+++		
	GC5B593	G99A	+		
	GC5B595	M64K, G99A	+		
GC5 B515	GC5B596	G56S	++	GCDB72	0,15

Các chuỗi nặng cho GC5B532 và GC5B540 chứa cả isome hóa tiềm năng và rủi ro oxy hóa. Đột biến M64K và G99A được tạo để cải thiện rủi ro này (Bảng 20).

Tất cả biến thể được thử nghiệm với đột biến G99A đã giảm đáng kể ái lực liên kết, trong khi các biến thể M64K và G56A không bị tác động. Dựa trên dữ liệu liên kết, mỗi mình GC5B596 được tiến hành để đánh giá chức năng và đã chứng minh hiệu lực như (GCDB72) đặc hiệu đôi CD3 trong xét nghiệm cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T.

Vì vậy, 4 kháng thể đơn dòng đặc hiệu đôi GPRC5D được chọn để đặc trưng hóa bổ sung: GCDB32, GCDB53, GCDB61, và GCDB72. Được minh họa sau đây trong Bảng 21 và 22 là CDR và trình tự chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể GPRC5D được sử dụng để tạo phân tử đặc hiệu đôi.

Bảng 21. Các trình tự CDR của 4 ứng viên kháng thể đơn dòng GPRC5D cho thấy sự liên kết kháng GPRC5D khỉ và người và hoạt động theo chức năng khi được tạo như các đặc hiệu đôi CD3.

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B81	SYAIS (SỐ ID TRÌNH TỰ 1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 5)	ESRWRGYKLD (SỐ ID TRÌNH TỰ 9)	RASQSISSYLN (SỐ ID TRÌNH TỰ 13)	AASSLQS (SỐ ID TRÌNH TỰ 16)	QQSYSTPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 19)
GC5B465	NYWMS (SỐ ID TRÌNH TỰ 2)	GISYSGGSKYYASSVKG (SỐ ID TRÌNH TỰ 6)	AAFDFGRRAVRLD (SỐ ID TRÌNH TỰ 10)	RASQSISSYLN (SỐ ID TRÌNH TỰ 13)	AASSLQS (SỐ ID TRÌNH TỰ 16)	QQSYSTPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 19)
GC5B483	SYFIG (SỐ ID TRÌNH TỰ 3)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 7)	VYSFGGRHKALFDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 11)	RASQSVSSYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 14)	DASNRAT (SỐ ID TRÌNH TỰ 17)	QQRSNWPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 20)
GC5B596	GYTMN (SỐ ID TRÌNH TỰ 4)	LINPYNSDTNYAQKLQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 8)	VALRVALDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 12)	KASQNVATHVG (SỐ ID TRÌNH TỰ 15)	SASYRYS (SỐ ID TRÌNH TỰ 18)	QQYNRYPYT (SỐ ID TRÌNH TỰ 21)

Bảng 22: Các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của 4 ứng viên kháng thể đơn dòng GPRC5D cho thấy sự liên kết kháng GPRC5D khỉ và người và hoạt động theo chức năng khi được tạo như các đặc hiệu đôi CD3.

ID AA mAb	Trình tự axit amin VH	SỐ ID TRÌNH TỰ:	Trình tự axit amin VL	SỐ ID TRÌNH TỰ:
GC5B81	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADEST	52	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI	56

	STAYMELSSLRSEDTAVYYCARESR WRGYKLDYWGQGTLVTVSS		SSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQ GTKVEIK	
GC5B465	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVS GISYSGGSKYYASSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKA AFDFGRRAVRLDYWGQGTLVTVSS	53	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQ GTKVEIK	56
GC5B483	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS GYSFTSYFIGWVRQMPGKGLEWMG IIYPGKSDTRYSPSFQGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARVY SFGGRHKALFDYWGQGTLVTVSS	54	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIK	57
GC5B596	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEW MGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC ARVALRVALDYWGQGTLVTVSS	55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTEFTL TISNLQPEDFATYYCQQYNRYPYT FGQGTKLEIK	58

VÍ DỤ 7: ĐIỀU CHẾ KHÁNG THỂ GPRC5D VÀ CD3 THEO DẠNG ĐẶC HIỆU ĐÔI TRONG IGG4 S228P, L234A, L235A

4 kháng thể GPRC5D đơn đặc hiệu (xem bảng 21) được biểu hiện dưới dạng IgG4 có các thay thế S228P, L234A, và L235A hoặc S228P, L234A, L235A, F405L, và R409K (nhánh CD3) (đánh số theo chỉ mục EU). Kháng thể kháng CD3 đơn đặc hiệu CD3B219 cũng được tạo ra bao gồm các vùng VH và VL có chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 25 và chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 26 và vùng hằng định IgG4 với các thay thế S228P, L234A, L235A, F405L, và R409K.

Các kháng thể đơn đặc hiệu được tinh chế theo phương pháp tiêu chuẩn bằng cách sử dụng cột Protein A (cột HiTrap MabSelect SuRe). Sau khi rửa giải, các vùng lưu trữ được thẩm tách thành D-PBS, pH 7,2.

Các kháng thể GPRC5D x CD3 đặc hiệu đôi được tạo ra bằng cách kết hợp kháng thể đơn dòng CD3 đơn đặc hiệu và kháng thể đơn dòng GPRC5D đơn đặc hiệu bằng phương pháp trao đổi nhánh Fab *trong ống nghiệm* (theo mô tả trong WO2011/131746). Tóm lại, kháng thể kháng GPRC5D/kháng CD3 với nồng độ bằng khoảng 1-20 mg/mL với tỷ lệ mol 1,08:1 trong PBS, pH 7-7,4 và 2-mercaptoetanolamin (2-MEA) 75 mM được trộn với nhau và được ủ ở 25-37 °C trong 2-6 giờ, sau đó loại bỏ 2-MEA bằng thẩm tách, lọc tuần hoàn có pha loãng, lọc dòng tiếp tuyến và/hoặc lọc tế bào được quay bằng các phương pháp tiêu chuẩn.

Chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 được trình bày dưới đây trong Bảng 23.

Bảng 23. Trình tự chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể đặc hiệu đôi IgG4-PAA

Kháng thể		**Trình tự axit amin**
GCDB32	Chuỗi nặng 1 CD3B219 (SỐ ID TRÌNH TỰ:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
	Chuỗi nhẹ 1 CD3B219 (SỐ ID TRÌNH TỰ:26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	Chuỗi nặng 2 GC5B81 (SỐ ID TRÌNH TỰ:52)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARESRWRGYKLDYWGQGTLVTVSS
	Chuỗi nhẹ 2 GC5B81 (SỐ ID TRÌNH TỰ:56)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK
GCDB53	Chuỗi nặng 1 CD3B219 (SỐ ID TRÌNH TỰ:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
	Chuỗi nhẹ 1 CD3B219 (SỐ ID TRÌNH TỰ:26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	Chuỗi nặng 2 GC5B465 (SỐ ID TRÌNH TỰ:53)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGGSKYYASSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAFDFGRRAVRLDYWGQGTLVTVSS
	Chuỗi nhẹ 2 GC5B465 (SỐ ID TRÌNH TỰ:56)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK
GCDB61	Chuỗi nặng 1 CD3B219 (SỐ ID TRÌNH TỰ:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
	Chuỗi nhẹ 1 CD3B219 (SỐ ID TRÌNH TỰ:26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	Chuỗi nặng 2 GC5B483 (SỐ ID TRÌNH TỰ:54)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYFIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGKSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKALFDYWGQGTLVTVSS
	Chuỗi nhẹ 2 GC5B483 (SỐ ID TRÌNH TỰ:57)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK

GCDB72	Chuỗi nặng 1 CD3B219 (SỐ ID TRÌNH TỰ:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNF GNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
	Chuỗi nhẹ 1 CD3B219 (SỐ ID TRÌNH TỰ:26)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVL
	Chuỗi nặng 2 GC5B596 (SỐ ID TRÌNH TỰ:55)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLI NPYNSDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRV ALDYWGQGTLVTVSS
	Chuỗi nhẹ 2 GC5B596 (SỐ ID TRÌNH TỰ:58)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLIYSASY RYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNRYPYTFGQGTKLEIK

VÍ DỤ 8: ĐẶC TRƯNG HÓA CHỨC NĂNG CỦA GCDB32, GCDB53, GCDB61, VÀ GCDB72

GCDB32, GCDB53, GCDB61, và GCDB72 được đánh giá về liên kết với GPRC5D chuột (Bảng 24). Tất cả 4 kháng thể đặc hiệu đôi liên kết với GPRC5D chuột, với khoảng ái lực liên kết quan sát được.

Bảng 24: Liên kết kháng thể kháng GPCR5D x CD3 với GPCR5D chuột.

ID GPRC5D x CD3	Liên kết FACS GPRC5D chuột (MFI)
GCDB32	1151
GCDB53	2658
GCDB61	3552
GCDB72	481

Phản ứng chéo với GPRC5D khỉ cũng được đánh giá bằng xét nghiệm cơ chế gây độc tế bào chuyển hướng tế bào T của dòng tế bào GPRC5D khỉ và người được biểu hiện quá mức (Bảng 25). Một kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 là đẳng năng kháng GPRC5D người và khỉ (GCDB32), trong khi các đặc hiệu đôi khác được thử nghiệm ít hiệu lực hơn khi cảm ứng gây độc tế bào của GPRC5D khỉ so với GPRC5D người.

Bảng 25: Hoạt tính chức năng của kháng thể GPRC5D x CD3 dẫn đầu kháng tế bào HEK biểu hiện GPRC5D người và khỉ.

ID GPRC5D x CD3	Các tế bào HEK GPRC5D người (EC_{50} nM)	Các tế bào HEK GPRC5D (EC_{50} nM)
GCDB32	0,04	0,07
GCDB53	0,08	0,36
GCDB61	0,03	1,22
GCDB72	0,03	3,41

Đặc trưng hóa bổ sung với mục đích hiểu rõ hơn về liên kết trong ống nghiệm (Hình 11A-11E) và hiệu lực (Bảng 26).

Bảng 26: Cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T của một số dòng tế bào B biểu hiện GPRC5D bởi các kháng thể GPRC5D x CD3 dẫn đầu.

ID GPRC5D x CD3	Các tế bào H929 EC_{50} nM (Trình tự xếp hạng)	MM1R EC_{50} nM (Trình tự xếp hạng)	OPM2 EC_{50} nM (Trình tự xếp hạng)	LP-1 EC_{50} nM (Trình tự xếp hạng)
GCDB32	0,45 (3)	0,04 (1)	0,98 (2)	1,02 (2)
GCDB53	0,69 (4)	0,28 (4)	2,83 (4)	1,58 (3)
GCDB61	0,39 (2)	0,06 (3)	1,46 (3)	1,67 (4)
GCDB72	0,22 (1)	0,04 (1)	0,77 (1)	0,7 (1)

Khi khoảng ái lực liên kết quan sát được, với GCDB61 là chất kết dính mạnh nhất, và GCDB72 & GCDB32 là chất kết dính yếu nhất, các hiệu lực trong ống nghiệm rất giống nhau cho nhóm kháng thể đặc hiệu đôi. Tuy nhiên, dựa trên phân tích trình tự xếp hạng GCDB72 là hiệu lực nhất qua các dòng tế bào B khác nhau được phân tích. Các thí nghiệm liên kết và hiệu lực *ngoài cơ thể sống* sử dụng MNC dẫn xuất từ bệnh nhân đã thu được nhiều kết quả tương tự hơn xét nghiệm trong ống nghiệm (Bảng 27 và Hình 15A và 15B).

Bảng 27. Liên kết kháng thể đặc hiệu đôi GPCR5D x CD3, cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T, và hoạt hóa tế bào T của MNC dẫn xuất từ bệnh nhân MM.

Bệnh nhân	ID AA GPRC5D x CD3	Liên kết EC_{50} nM	Cơ chế gây độc tế bào EC_{50} nM	Hoạt hóa tế bào T EC_{50} nM

MM303BM	GCDB32	16,1	0,36	0,18
	GCDB53	3,98	0,42	0,17
	GCDB61	5,53	0,89	0,22
	GCDB72	27,5	0,30	0,12
MM305BM	GCDB32	70,4	0,26	0,16
	GCDB53	10,2	0,26	0,19
	GCDB61	6,93	0,6	0,22
	GCDB72	65,9	0,28	0,12

GCDB61 có ái lực liên kết cao nhất với MNC bệnh nhân trong khi GCDB72 & GCDB32 là chất kết dính yếu nhất. Một lần nữa, mặc dù sự chênh lệch ái lực liên kết được quan sát, tất cả kháng thể đặc hiệu đôi đã chứng minh hiệu quả nanomol con trong xét nghiệm cơ chế gây độc tế bào chuyển hướng tế bào T. Các phân tử hầu như không thể phân biệt dựa trên hiệu lực *trong ống nghiệm* và *ngoài cơ thể sống* tuy nhiên, dữ liệu *trong cơ thể sống* đã cung cấp sự khác biệt (Hình 12A-12D).

Các tế bào H929 được cấy vào chuột NSG, một tuần sau khi tiêm PBMC người. Điều trị bằng kháng thể đặc hiệu đôi được bắt đầu cùng lúc khi tế bào H929 được cấy và được tiếp tục 2 hoặc 3 ngày một lần (q2d hoặc q3d) với liều 10 ug, 1 ug, và 0,1 ug/con vật trong tổng số 5 liều điều trị. 10 con chuột được sử dụng trong mỗi nhóm và PBS được sử dụng làm đối chứng chất mang. Dừng điều trị vào ngày 11 và kết thúc nghiên cứu vào ngày 26 (Hình 12 A-D). Tất cả phân tử đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 được thử nghiệm trong mẫu phòng ngừa này cho thấy sự ức chế tăng trưởng khối u 100 % với liều 10 và 1 ug/con vật. Quan sát được sự khác biệt với liều thấp nhất, 0,1 ug/con vật, với GCDB72 chứng minh tính vượt trội so với các kháng thể đặc hiệu đôi khác được thử nghiệm với sự ức chế tăng trưởng khối u 80 % quan sát được.

VÍ DỤ 9: MỨC LIÊN KẾT KHÁNG THỂ GPRC5D TRÊN DÒNG TẾ BÀO MM1.R GPRC5D$^+$

Ái lực liên kết của các kháng thể GPRC5D trên dòng tế bào MM người GPRC5D$^+$ (MM1.R, mua từ ATCC (Tập hợp tế bào nuôi cấy Hoa Kỳ)) được đo bằng cách sử dụng FACS. Hình 13 cho thấy tất cả kháng thể dẫn đầu liên kết với tế bào MM.1R biểu hiện GPRC5D theo cơ chế phụ thuộc liều với các giá trị EC_{50} trong khoảng từ 0,10 nM đến 135 nm, tất cả ngoại trừ GC5B602 là thấp hơn đáng kể các giá trị của kháng thể thương

mại FAB6300 (R& D Systems Cat No. FAB6300A, Dòng số 571961) thu được giá trị EC_{50} là 121,7 nM.

Các dòng tế bào MM1.R GPRC5D$^+$ được nhuộm trong 60 phút với các nồng độ khác nhau của các kháng thể dẫn đầu để đo các mức liên kết bề mặt (n=3). IgG4Fc người được gắn nhãn phycoerythrin được sử dụng làm kháng thể thứ cấp để thu tín hiệu (Southern Biotech, dòng HP6025, Cat # 9200-09). Liên kết được biểu hiện như cường độ huỳnh quang trung bình hình học được chuẩn hóa như được xác định bằng FACS. Việc vẽ đồ thị và làm khớp dữ liệu được thực hiện trong GraphPad Prism 6 bằng cách sử dụng hồi quy phi tuyến tính với dốc biến thiên (bốn tham số) và phương pháp làm khớp bình phương tối thiểu.

Ngoài ra, mức liên kết GC5M481 kháng thể đơn dòng GPRC5D được đánh giá khi so sánh với kháng thể thương mại sử dụng ba dòng tế bào đa u tủy GPRC5D$^+$ (JIM3,OPM-2, và MM.1R; Các dòng tế bào được mua từ ATCC) (Hình 14A). Ngoài ra, kháng thể đơn dòng GPRC5D (GC5M481) được lập mức về phản ứng chép bằng cách sử dụng các tế bào Daudi biểu hiện GPRC5D khỉ cho thấy sự liên kết mạnh so với các tế bào mẹ (Hình 14A). Ngoài ra, 5 kháng thể đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 (GCDB32, GCDB48, GCDB53, GCDB61 và GCDB72) khi được đánh giá về khả năng liên kết bằng cách sử dụng các dòng tế bào (JIM3, OPM-2 và MM1.R) GPRC5D+ (Hình 14B) cho thấy sự liên kết đáng kể rõ ràng theo sự dịch chuyển trong biểu đồ (đường liền màu đen) so với đối chứng lớp kháng thể (đường chấm, đường liền màu xám).

VÍ DỤ 10: HIỆU QUẢ KHÁNG KHỐI U CỦA GCDB72 TRONG VIỆC NGĂN CHẶN SỰ TẠO U KHÁNG CÁC MẪU GHÉP NGOẠI LAI ĐA U TỦY NGƯỜI MM.1S DƯỚI DA Ở CHUỘT NSG NHÂN HÓA PBMC.

Nghiên cứu *trong cơ thể sống* này được thực hiện để xác định hiệu lực của GCDB72 kháng các mẫu ghép ngoại lai đa u tủy người (MM) MM.1S được thiết lập ở chuột NSG nhân hóa PBMC. Chuột NSG cái có cùng cân nặng và tuổi được cấy dưới da (sc) với các tế bào MM người MM.1S ($1x10^7$ tế bào trong 200 µL PBS mỗi con chuột) ở sườn sau bên phải vào ngày nghiên cứu 0. Vào ngày 7 sau khi cấy ghép khối u, $1x10^7$ PBMC người (trong 200 µL PBS) được tiêm qua đường tĩnh mạch qua mạch bên đuôi.

Việc điều trị được bắt đầu vào ngày 15 khi thể tích khối u trung bình khoảng 72 – 78 mm^3, mỗi con chuột được cho sử dụng PBS hoặc kháng thể GCDB72 DuoBody qua đường tĩnh mạch (iv) với liều 0,1 µg (0,005 mg/kg), 1 µg (0,05 mg/kg), 10 µg (0,5 mg/kg) và 50 µg (2,5 mg/kg). Đối chứng DuoBody bất hoạt, CD3 x bất hoạt và bất hoạt x GPRC5D, mỗi thuốc được cho liều 10 µg cho mỗi con chuột. Khi điều trị, các liều được cho sử dụng 3 ngày một lần (q3d) cho tổng số 7 liều. Hiệu quả kháng khối u mạnh mẽ quan sát được với 2 liều cao (10 µg and 50 µg) GCDB72, trong đó khối u sc MM.1S hoàn toàn thoái lui 100 % (10 trên 10 cho mỗi nhóm) ở các con vật khi kết thúc nghiên cứu (Hình 16). Ngoài ra, 1 µg cho mỗi con chuột đã ức chế đáng kể tăng trưởng khối u đến 65 % ($p \leq 0,0001$) so với khối u được điều trị PBS, trong khi liều 0,1 µg ít hiệu quả hơn (TGI=19,3 %, p=0,0023). Tác dụng của CD3 x bất hoạt không được xem là có hiệu quả (TGI=28 %, $p \leq 0,0001$) và bất hoạt x GPRC5D có tác dụng không đáng kể là 3,1 % TGI, p=0,9971. TGI được xác định vào ngày 36 khi có ít nhất 80 % con vật sống cho mỗi nhóm. Việc sụt cân nặng và/hoặc số lượng con vật chết đáng kể bắt đầu biểu hiện sau ngày 36 do GVHD (Hình 17). Nghiên cứu kết thúc vào ngày 43 khi có 60 % con vật hoặc ít hơn còn lại trong nhóm.

VÍ DỤ 11: CƠ CHẾ GÂY ĐỘC TẾ BÀO QUA TRUNG GIAN TẾ BÀO PHỤ THUỘC KHÁNG THỂ (ADCC) CỦA CÁC KHÁNG THỂ GPRC5D

Nhóm kháng thể kháng GPRC5D người được tạo như kháng thể đơn dòng IgG1. Ngoài ra, nhóm kháng thể đơn dòng kháng GPRC5D người mới được tạo như mô tả trong Ví dụ 2. Minh họa sau đây trong Bảng 28 và 29 là CDR và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể đơn dòng GPRC5D mới. Các kháng thể mới này được sử dụng để tạo phân tử CD3 đặc hiệu đôi như mô tả theo Ví dụ 7 và cũng được phối hợp như kháng thể đơn dòng IgG1 để đánh giá hoạt tính ADCC.

Bảng 28. Các trình tự CDR của nhóm kháng thể GPRC5D mới

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B382	DYGMH (SỐ ID TRÌNH TỰ 61)	AIKYSGGSTYY ADSVKG (SỐ ID TRÌNH TỰ 67)	RAESGPGLDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 72)	KSSQSVLYSSNN KNYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 98)	WASTRES (SỐ ID TRÌNH TỰ 78)	QQYYSTPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 80)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
GC5B379	NYWMS (SỐ ID TRÌNH TỰ 2)	GISYSGGSKYYADSVKG (SỐ ID TRÌNH TỰ 28)	AAWDFGRRAVRLDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 30)	RASQSISSYLN (SỐ ID TRÌNH TỰ 13)	AASSLQS (SỐ ID TRÌNH TỰ 16)	QQSYSTPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 19)
GC5B373	SYWIG (SỐ ID TRÌNH TỰ 27)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 29)	IGFYGRSFRIFDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 73)	RASQSVSSYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 14)	DASNRAT (SỐ ID TRÌNH TỰ 17)	QQRSNWPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 20)
GC5B376	SYWIG (SỐ ID TRÌNH TỰ 27)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 29)	VYSFGGRHKALFDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 11)	RASQSVSSYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 14)	DASNRAT (SỐ ID TRÌNH TỰ 17)	QQRSNWPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 20)
GC5B385	GYAMS (SỐ ID TRÌNH TỰ 62)	AISGSGGSTYYADSVKG (SỐ ID TRÌNH TỰ 68)	VDRSFGRSRYTLDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 74)	RASQSVSSYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 14)	DASNRAT (SỐ ID TRÌNH TỰ 17)	QQRSNWPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 20)
GC5B370 GC5B597	SYGIS (SỐ ID TRÌNH TỰ 63)	GIIPIFGNINYAQKFQG (SỐ ID TRÌNH TỰ 69)	VSRRFKRFAYYFDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 75)	KSSQSVLYSSNNKNYLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 98)	WASTRES (SỐ ID TRÌNH TỰ 78)	QQYYSTPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ 80)
GC5B602	GYSFTGYTMN (SỐ ID TRÌNH TỰ 64)	LINPYNGDTN (SỐ ID TRÌNH TỰ 70)	VALRVALDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 12)	KASQNVATHVG (SỐ ID TRÌNH TỰ 15)	SASYRYS (SỐ ID TRÌNH TỰ 18)	QQYNRYPYT (SỐ ID TRÌNH TỰ 21)
GC5B603	SYAMS (SỐ ID TRÌNH TỰ 65)	AISGSGGSTYYADSVKG (SỐ ID TRÌNH TỰ 68)	SNFLPVVFDY (SỐ ID TRÌNH TỰ 76)	RASQSVRKSLA (SỐ ID TRÌNH TỰ 95)	TASNRAT (SỐ ID TRÌNH TỰ 79)	QQYFRAPIT (SỐ ID TRÌNH TỰ 81)
GC5B601	GFSLTSYNVH (SỐ ID TRÌNH TỰ 66)	VIWAGGSTNYNSALMS (SỐ ID TRÌNH TỰ 71)	DGIRLRFAY (SỐ ID TRÌNH TỰ 77)	KASQNVATHVG (SỐ ID TRÌNH TỰ 15)	SASYRYS (SỐ ID TRÌNH TỰ 18)	QQYNRYPYT (SỐ ID TRÌNH TỰ 21)

Bảng 29. Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của nhóm kháng thể GPRC5D mới

ID AA mAb	Trình tự axit amin VH	SỐ ID TRÌNH TỰ:	Trình tự axit amin VL	SỐ ID TRÌNH TỰ:
GC5B382	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRAESGPGLDYWGQGTLVTVSS	82	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK	92
GC5B379	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGGSKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAWDFGRRAVRLDYWGQGTLVTVSS	83	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK	56

GC5B373	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG YSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARIGFYG RSFRIFDYWGQGTLVTVSS	84	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIK	57
GC5B376	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG YSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFG GRHKALFDYWGQGTLVTVSS	85	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIK	57
GC5B385	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDRS FGRSRYTLDYWGQGTLVTVSS	86	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIK	57
GC5B370 GC5B597	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGG IIPIFGNINYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARVSRRFK RFAYYFDYWGQGTLVTVSS	87	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS SQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQ PPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPLTFGQGTKVEIK	92
GC5B602	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMG LINPYNGDTNYAQKLQGRVTMTTDTS TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVA LRVALDYWGQGTLVTVSS	88	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTEFTL TISNLQPEDFATYYCQQYNRYPYT FGQGTKLEIK	58
GC5B603	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSNFLP VVFDYWGQGTLVTVSS	89	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVRKSLAWYQQKPGQAPRLLIYT ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQYFRAPITFGQG TKVEIKK	93
GC5B601	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGF SLTSYNVHWIRQPPGKALEWLAVIWA GGSTNYNSALMSRLTISKDTSKSQVV LTMTNMRAEDTATYYCARDGIRLRF AYWGQGTLVTVSS	91	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVATHVGWYQQKPGQAPRLLI YSASYRYSGIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYCQQYNRYPYTF GQGTKLEIK	94

Hoạt tính ADCC kháng tế bào H929 (Bảng 30 và 31). Tóm lại, các tế bào đa u tủy được dán nhãn với Calcein-AM trong 30 phút ở nhiệt độ phòng và tái huyền phù ở $0,2x10^6$/ml trong RPMI + 10 % HI FBS sau hai lần rửa PBS. PBMC's được rã đông và tái huyền phù sau khi rửa PBS với mật độ $3x10^6$ tế bào cho mỗi ml trong môi trường tăng trưởng RPMI. 10000 hoặc 50000 tế bào đích được trộn với 100000 hoặc 2500000 PBMC'S khi có kháng thể và được ủ trong 3 giờ trong thiết bị ủ CO2 ở 37 °C. Sau khi đĩa ủ được ly tâm với 200 g trong 4 phút và 100 ul lớp bề mặt được

chuyển sang đĩa 96 lỗ mới và cường độ huỳnh quang được đo ở 485/535 nM. Giá trị RFU được vẽ đồ thị để tính phần trăm ly giải

Bảng 30: Cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể của tế bào H929 bởi kháng thể đơn dòng kháng GPRC5D với Fc IgG1.

ID protein IgG4 GPRC5D	ID protein IgG1 GPRC5D	Cơ chế gây độc tế bào H929 EC_{50} (pM)	% ly giải
GC5B243	GC5B382	1346,5	29,14
GC5B285	GC5B379	87,4	17,3
GC5B332	GC5B373	244,2	32,94
GC5B164	GC5B376	22,0	32,21
GC5B320	GC5B385	944,0	29,73
GC5B251	GC5B370	24,2	8
GC5B515	GC5B602	27721,7	20
GC5B420	GC5B603	3,4	16
GC5B483	GC5B599	7,4	14
GC5B540	GC5B601	169,6	14
GC5B465	GC5B598	2,0	12
GC5B251	GC5B597	705,1	10

Bảng 31: So sánh cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể và gây độc tế bào qua trung gian tế bào T của tế bào H929.

		ADCC	Chuyển hướng CD3
ID protein IgG1 GPRC5D	ID DuoBody GPRC5D x CD3	Cơ chế gây độc tế bào H929 EC50 (pM)	Cơ chế gây độc tế bào H929 qua trung gian tế bào T EC50 (nM)
GC5B382	GCDB40	1346,5	1,2 ± 0,83
GC5B379	GCDB43	87,4	0,39 ± 0,07
GC5B373	GCDB45	244,2	2,36 ± 0,84
GC5B376	GCDB35	22,0	1,39 ± 0,75
GC5B385	GCDB44	944,0	>10
GC5B370	GCDB41	24,2	>10
GC5B602	GCDB72	27721,7	0,15
GC5B603	GCDB48	3,4	0,17
GC5B599	GCDB61	7,4	1,51
GC5B601	GCDB69	169,6	0,58
GC5B598	GCDB53	2,0	0,24

Khoảng hiệu lực quan sát được trong khoảng từ 2 pM đến 27,7 nM. Ái lực liên kết không nhất thiết là dự đoán về hiệu lực trong xét nghiệm ADCC. Ví dụ, GC5B382 và GC5B379 có ái lực liên kết tương tự với tế bào GPRC5D người nhưng chênh lệch 15 lần về gây độc tế bào kháng tế bào H929 trong xét nghiệm ADCC. Tương tự, cảm ứng gây độc tế bào như đặc hiệu đôi GPRC5D x CD3 không phải là dự đoán về hiệu lực trong xét nghiệm ADCC như được lấy làm ví dụ bởi GC5B370 và GC5B602. Khi được định dạng là GC5B602 đặc hiệu đôi CD3 (GCDB63) có hiệu lực nanomol con kháng tế bào H929 trong khi GC5B370 như đặc hiệu đôi CD3 (GCDB41) chủ yếu bất hoạt. Các khu vực v như nhau, khi được định dạng như kháng thể đơn dòng IgG1 dẫn đến quan sát đối lập trong xét nghiệm ADCC, với GC5B370 quan sát được có hiệu lực cao hơn (gấp ~1100 lần) qua GC5B602.

Mô tả vắn tắt danh sách liệt kê trình tự

SỐ ID TRÌNH TỰ:	Loại	Loài	Mô tả	Trình tự
1	PRT	người	GC5B81, GC5B427, GC5B428, GC5B430, GC5B431, VÀ GC5B429-HCDR1	SYAIS
2	PRT	người	GC5B379, GC5B598,GC5B465, GC5B285,GC5B463, GC5B432, GC5B433, GC5B434, GC5B435, GC5B436, GC5B461, GC5B462, GC5B437, GC5B438, GC5B439, GC5B440, GC5B441, GC5B442, GC5B443, GC5B444, GC5B464, GC5B445, GC5B446, GC5B447, GC5B448, GC5B449, và GC5B450 -HCDR1	NYWMS
3	PRT	người	GC5B483, GC5B473, GC5B478, GC5B488, GC5B493, và GC5B498 -HCDR1	SYFIG
4	PRT	người	GC5B596-HCDR1	GYTMN
5	PRT	người	GC5B81, GC5B427, GC5B428, GC5B430, GC5B431, và GC5B429-HCDR2	GIIPIFGTANYAQKFQG
6	PRT	người	GC5B598, GC5B465, GC5B432, VÀ GC5B447-HCDR2	GISYSGGSKYYASSVKG
7	PRT	người	GC5B599, GC5B483, GC5B481, GC5B482,	IIYPGKSDTRYSPSFQG

			GC5B484, GC5B485, VÀ GC5B503- HCDR2	
8	PRT	người	GC5B596-HCDR2	LINPYNSDTNYAQKLQG
9	PRT	người	GCB581-HCDR3	ESRWRGYKLD
10	PRT	người	GC5B598, GCB5465-HCDR3	AAFDFGRRAVRLD
11	PRT	người	GC5B376,GC5B599, GC5B483, GC5B164, GC5B471, GC5B472, GC5B473, GC5B474, GC5B475, GC5B476, GC5B477, GC5B478, GC5B479, GC5B480, GC5B481, GC5B482, GC5B484, GC5B485, GC5B486, GC5B487, GC5B488, GC5B489, GC5B490, GC5B491, GC5B492, GC5B493, GC5B494, GC5B495, GC5B496, GC5B497, GC5B498, GC5B499, GC5B500, GC5B501, GC5B502, GC5B503, GC5B504, VÀ GC5B505 –HCDR3	VYSFGGRHKALFDY
12	PRT	người	GC5B602,GCB596-HCDR3	VALRVALDY
13	PRT	người	GC5B382, GC5B379, GC5B370, GC5B598, GC5B597, GC5B81, GC5B465-LCDR1	RASQSISSYLN
14	PRT	người	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483-LCDR1	RASQSVSSYLA
15	PRT	người	GC5B605, GC5B601, GC5B596-LCDR1	KASQNVATHVG
16	PRT	người	GC5B81, GC5B465, GC5B379, GC5B598-LCDR2	AASSLQS
17	PRT	người	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483-LCDR2	DASNRAT
18	PRT	người	GC5B602, GC5B601, GC5B596-LCDR2	SASYRYS
19	PRT	người	GC5B379, GC5B598, GC5B81, GC5B465-LCDR3	QQSYSTPLT
20	PRT	người	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483-LCDR3	QQRSNWPLT
21	PRT	người	GC5B602, GC5B601, GC5B596-LCDR3	QQYNRYPYT
22	PRT	người	GPRC5D	MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIILESLAILGIVVTIL LLLAFLFLMRKIQDCSQWNVLPTQLLFLLSV LGLFGLAFAFIIELNQQTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLA HASNLVKLVRGCVSFSWTTILCIAIGCSLLQ

				IIIATEYVTLIMTRGMMFVNMTPCQLNVDFVVLLVYV LFLMALTFFVSKATFCGPCENWKQHGRLIFITV LFSIIIWVVWISMLLRGNPQFQRQPQWDDPVVCIALVT NAWVFLLLYIVPELCILYRSCRQECPLQGNAC PVTAYQHSFQVENQELSRARDSDGAEEDVALTSYGTP IQPQTVDPTQECFIPQAKLSPQQDAGGV
23	PRT	khỉ	GPRC5D	MYKDCIESTGDYFLPCDSEGPWGIVLESLAILGIVVTIL LLLAFLFLMRKIQDCSQWNVLPTQLLFLLSV LGLFGLAFAFIIQLNQQTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLA HASNLVKLVRGRVSFSWTTILCIAIGCSLLQVIIAIEYV TLIMTRGMMFVHMTPYQLNVDFVVLLVYVLFLMALT FFVSKATFCGPCENWKQHGRLIFITVLFSIIIWVVWISM LLRGNPQFQRQPQWDDPVVCIALVTNA WVFLLLYIVPELCILYRSCRQECPSQGHACPVTAYQRS FQVENQELSRARDSDGAEEDVALTSFGTPIQPQTVDPT QECFIPRAKLSPQQDAGV
24	PRT	chuột	GPRC5D	MYEDCVKSTEDYYLFCDNEGPWAIVLESLAVIGIVVTI LLLLAFLFLMRKVQDCSQWNVLPTQFLFLLAV LGLFGLTFAFIIQLNHQTAPVRYFLFGVLFAICFSCLLA HASNLVKLVRGRVSFCWTTILFIAIGVSLLQ TIIAIEYVTLIMTRGLMFEHMTPYQLNVDFVCLLIYVLF LMALTFFVSKATFCGPCENWKQHGRLIFATV LVSIIIWVVWISMLLRGNPQLQRQPHWDDAVICIGLVT NAWVFLLIYIIPELSILYRSCRQECPTQGNVC QVPVYQRSFRMDTQEPTRARDSDGAQEDVALTAYGT PIQLQSADPSREYLIPSATLSPQQDAGL
25	PRT	người	CHUỖI NẶNG CD3B219	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTIS RDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLVTVSS
26	PRT	người	PE NHẸ CD3B219	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
27	PRT	người	GC5B373, GC5B376, GC5B164, GC5B501, GC5B502, GC5B503, GC5B504, VÀ GC5B505 -HCDR1	SYWIG
28	PRT	người	GC5B379,GC5B285, GC5B442, GC5B443, GC5B444, GC5B464, VÀ GC5B445-HCDR2	GISYSGGSKYYADSVKG
29	PRT	người	GC5B373, GC5B376, GC5B164, GC5B496, GC5B497, GC5B498, GC5B499, VÀ GC5B500-HCDR2	IIYPGDSDTRYSPSFQG
30	PRT	người	GC5B379, GC5B285, GC5B446, GC5B447, GC5B448, GC5B449, VÀ GC5B450-HCDR3	AAWDFGRRAVRLDY
31	PRT	người	GC5B427-HCDR3	ESRYRGYKLDY
32	PRT	người	GC5B428-HCDR3	ESRVRGYKLDY
33	PRT	người	GC5B430-HCDR3	ESRGRGYKLDY
34	PRT	người	GC5B431-HCDR3	ESRARGYKLDY
35	PRT	người	GC5B429HCDR3-VH	ESRFRGYKLDY

36	PRT	người	GC5B471, GC5B476, GC5B486,GC5B481, GC5B491, và GC5B496, -HCDR1	SYYIG
37	PRT	người	GC5B497, GC5B472, GC5B477, GC5B482, GC5B487, VÀ GC5B492-HCDR1	SYVIG
38	PRT	người	GC5B474, GC5B479, GC5B484, GC5B489, GC5B494, VÀ GC5B499-HCDR1	SYGIG
39	PRT	người	GC5B475, GC5B480, GC5B485, GC5B490, GC5B495, VÀ GC5B500-HCDR1	SYAIG
40	PRT	người	GC5B471, GC5B472, GC5B473, GC5B474, GC5B475, VÀ GC5B501-HCDR2	IIYPGASDTRYSPSFQG
41	PRT	người	GC5B476, GC5B477, GC5B478, GC5B479, GC5B480, VÀ GC5B502 -HCDR2	IIYPGSSDTRYSPSFQG
42	PRT	người	GC5B486, GC5B487, GC5B488, GC5B489, GC5B490, VÀ GC5B504-HCDR2	IIYPGESDTRYSPSFQG
43	PRT	người	GC5B491, GC5B492, GC5B493, GC5B494, GC5B495, VÀ GC5B505-HCDR2	IIYPGYSDTRYSPSFQG
44	PRT	người	GC5B463 VÀ GC5B446-HCDR2	GISYSGGSKYYAASVKG
45	PRT	người	GC5B433, GC5B434, VÀ GC5B448-HCDR2	GISYSGGSKYYAKSVKG
46	PRT	người	GC5B435, GC5B436, GC5B461, GC5B462, VÀ GC5B449-HCDR2	GISYSGGSKYYAESVKG
47	PRT	người	GC5B437, GC5B438, GC5B439, GC5B440, GC5B441, VÀ GC5B450-HCDR2	GISYSGGSKYYAYSVKG
48	PRT	người	GC5B463, GC5B435, GC5B437, VÀ GC5B442-HCDR3	AAYDFGRRAVRLDY
49	PRT	người	GC5B432, GC5B433, GC5B438, VÀ GC5B443-HCDR3	AAVDFGRRAVRLDY
50	PRT	người	GC5B461, GC5B440, VÀ GC5B464-HCDR3	AAGDFGRRAVRLDY
51	PRT	người	GC5B462, GC5B441, VÀ GC5B445-HCDR3	AAADFGRRAVRLDY
52	PRT	người	GC5B81-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWV RQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADES

				TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARESRWRGYKLDYWG QGTLVTVSS
53	PRT	người	GC5B598,GC5B465-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSW VRQAPGKGLEWVSGISYSGGSKYYASSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAFDFGRRAVR LDYWGQGTLVTVSS
54	PRT	người	GC5B599, GC5B483-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYFIGWVR QMPGKGLEWMGIIYPGKSDTRYSPSFQGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKALFDY WGQGTLVTVSS
55	PRT	người	GC5B596-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTM TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALD YWGQGTLVTVSS
56	PRT	người	GC5B379, GC5B598, GC5B81 và GC5465-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK
57	PRT	người	GC5B373, GC5B376, GC5B385, GC5B599, GC5B483-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK
58	PRT	người	GC5B596, GC5B602-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHVGWYQ QKPGKAPKRLIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS NLQPEDFATYYCQQYNRYPYTFGQGTKLEIK
59	PRT	người	IgG4PAA	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
60	PRT	người	IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	PRT	người	GC5B382-HCDR1	DYGMH
62	PRT	người	GC5B385-HCDR1	GYAMS
63	PRT	người	GC5B370, GC5B597-HCDR1	SYGIS
64	PRT	người	GC5B602-HCDR1	GYSFTGYTMN
65	PRT	người	GC5B603-HCDR1	SYAMS
66	PRT	người	GC5B601-HCDR1	GFSLTSYNVH
67	PRT	người	GC5B382-HCDR2	AIKYSGGSTYYADSVKG
68	PRT	người	GC5B603, GC5B385-HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG

69	PRT	người	GC5B370, GC5B597-HCDR2	GIIPIFGNINYAQKFQG
70	PRT	người	GC5B602-HCDR2	LINPYNGDTN
71	PRT	người	GC5B601-HCDR2	VIWAGGSTNYNSALMS
72	PRT	người	GC5B382-HCDR3	RAESGPGLDY
73	PRT	người	GC5B373-HCDR3	IGFYGRSFRIFDY
74	PRT	người	GC5B385-HCDR3	VDRSFGRSRYTLDY
75	PRT	người	GC5B370, GC5B597-HCDR3	VSRRFKRFAYYFDY
76	PRT	người	GC5B603-HCDR3	SNFLPVVFDY
77	PRT	người	GC5B601-HCDR3	DGIRLRFAY
78	PRT	người	GC5B382, GC5B370, GC5B597-LCDR2	WASTRES
79	PRT	người	GC5B603-LCDR2	TASNRAT
80	PRT	người	GC5B382, GC5B370, GC5B597-LCDR3	QQYYSTPLT
81	PRT	người	GC5B603-LCDR3	QQYFRAPIT
82	PRT	người	GC5B382-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHW VRQAPGKGLEWVSAIKYSGGSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRAESGPGLDYW GQGTLVTVSS
83	PRT	người	GC5B379-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSW VRQAPGKGLEWVSGISYSGGSKYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAWDFGRRAV RLDYWGQGTLVTVSS
84	PRT	người	GC5B376-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARIGFYGRSFRIFDY WGQGTLVTVSS
85	PRT	người	GC5B376-VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKALFD YWGQGTLVTVSS
86	PRT	người	GC5B385-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDRSFGRSRYTL DYWGQGTLVTVSS
87	PRT	người	GC5B370, GC5B597-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYGISWV RQAPGQGLEWMGGIIPIFGNINYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVSRRFKRFAYYFDY WGQGTLVTVSS
88	PRT	người	GC5B602-VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMN WVRQAPGQGLEWMGLINPYNGDTNYAQKLQGRVTM TTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALD YWGQGTLVTVSS

89	PRT	người	GC5B603-VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSNFLPVVFDYWG QGTLVTVSS
90	ADN	người	Chuỗi nhẹ GC5B596	Atgcgggtgctggcccagctgctgggactgctgctgctgtgcttccctggcgccaga tgcgacatccagatgacccagagccccagcagcctgagcgccagcgtgggcgacc gggtgaccatcacctgcaaggccagccagaacgtggccacccacgtgggctggta ccagcagaagcccggcaaggcccccaagcggctgatctacagcgccagctaccgg tacagcggcgtgcccagccggttcagcggcagcggcagcggcaccgagttcaccc tgaccatcagcaacctgcagcccgaggacttcgccacctactactgccagcagtaca accggtacccctacaccttcggccagggcaccaagctggagatcaagcgtacggtg gctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcc tctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggt ggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagca aggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtca caaagagcttcaacaggggagagtgttga
91	PRT	người	GC5B601-VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTSYNVHWIR QPPGKALEWLAVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDTSK SQVVLTMTNMRAEDTATYYCARDGIRLRFAYWGQGT LVTVSS
92	PRT	người	GC5B382, GC5B597,GC5B370 - VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK
93	PRT	người	GC5B603-VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRKSLAWYQQ KPGQAPRLLIYTASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQYFRAPITFGQGTKVEIKK
94	PRT	người	GC5B601-VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVATHVGWYQ QKPGQAPRLLIYSASYRYSGIPARFSGSGSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYCQQYNRYPYTFGQGTKLEIK
95	PRT	người	GC5B603-LCDR1	RASQSVRKSLA
96	ADN	người	Chuỗi nặng GC5B596	atggcctgggtctggaccctgctgttcctgatggccgctgcccagagcatccaggcc caggtgcagctggtgcagagcggcgccgaggtgaagaagcccggcgccagcgtg aaggtgagctgcaaggccagcggctacagcttcaccggctacaccatgaactgggt gcggcaggcccccggccagggcctggagtggatgggcctgatcaacccctacaac agcgacaccaactacgcccagaagctgcagggccgggtgaccatgaccaccgaca ccagcaccagcaccgcctacatggagctgcggagcctgcggagcgacgacaccg ccgtgtactactgcgcccgggtggccctgcgggtggccctggactactggggccag ggcaccctggtgaccgtgagcagcgcctccaccaagggcccatccgtcttccccctg gcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgcctggtcaa ggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcg gcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgt ggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaaaacctacacctgcaacgtagatca caagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtccaaatatggtcccccat gcccaccatgcccagcacctgaggccgccgggggaccatcagtcttcctgttccccc caaaacccaaggacactctcatgatctcccggacccctgaggtcacgtgcgtggtgg tggacgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtg gaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtacc gtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtaca agtgcaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaag ccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgcccccatcccaggagga gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcga catcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg cctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaggctaaccgtggaca agagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgc acaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaatga

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với GPRC5D bao gồm chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 4, chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 8, chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 12, chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 15, chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 18, và chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 21.

2. Kháng thể phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng chuỗi nặng biến đổi (VH) có SỐ ID TRÌNH TỰ: 55 và vùng chuỗi nhẹ biến đổi (VL) có SỐ ID TRÌNH TỰ: 58.

3. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với polypeptit có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ: 22.

4. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 1 đến 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của người.

5. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là tái tổ hợp.

6. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 1 đến 5, trong đó mảnh gắn kháng nguyên là mảnh Fab, mảnh Fab2, hoặc kháng thể chuỗi đơn.

7. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 1 đến 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó là lớp kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

8. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 1 đến 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng nguyên của nó là lớp kháng thể IgG1 hoặc IgG4.

9. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo điểm 8, trong đó IgG1 có thay thế K409R trong vùng Fc của nó.

10. Kháng thể được phân lập. hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo điểm 8, trong đó IgG1 có thay thế F405L trong vùng Fc của nó.

11. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo điểm 8, trong đó IgG4 có thay thế F405L và thay thế R409K trong vùng Fc của nó.

12. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, còn bao gồm thay thế S228P, thay thế L234A, và thay thế L235A trong vùng Fc của nó.

13. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 1 đến điểm 12, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GPRC5D người và phản ứng chéo với GPRC5D khỉ đuôi dài.

14. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên cảm ứng ADCC *trong ống nghiệm* với EC_{50} thấp hơn khoảng 28 nM.

15. Tế bào phân lập biểu hiện kháng thể, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 14.

16. Tế bào phân lập theo điểm 15, trong đó tế bào là tế bào lai.

17. Tế bào phân lập theo điểm 15, trong đó kháng thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp.

18. Kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 phân lập bao gồm:

a) chuỗi nặng thứ nhất (HC1);

b) chuỗi nặng thứ hai (HC2);

c) chuỗi nhẹ thứ nhất (LC1); và

d) chuỗi nhẹ thứ hai (LC2),

trong đó HC1 và LC1 bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu với CD3, và HC2 và LC2 bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với GPRC5D, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 của nó, trong đó HC1 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 25 và LC1 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 26, và trong đó HC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 55 và LC2 bao gồm SỐ ID TRÌNH TỰ: 58.

19. Kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 được phân lập, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó theo điểm 18, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó là lớp kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4.

20. Kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 được phân lập, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó theo điểm 19, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó là IgG.

21. Kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 được phân lập, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 20, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó liên kết với GPRC5D trên bề mặt của các tế bào u tủy người.

22. Kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 được phân lập, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 21, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó liên kết với GPRC5D trên bề mặt của các tế bào đa u tủy người.

23. Kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 được phân lập, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 22, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó cảm ứng hoạt hóa tế bào T người trong ống nghiệm với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 0,22 nM.

24. Kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 được phân lập, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 23, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó cảm ứng cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc tế bào T đối với các tế bào biểu hiện GPRC5D trong ống nghiệm với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 0,89 nM.

25. Tế bào phân lập biểu hiện kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó, theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 18 đến 24.

26. Tế bào được phân lập theo điểm 25, trong đó tế bào là tế bào lai.

27. Tế bào được phân lập theo điểm 25, trong đó kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó được tạo ra bằng cách tái tổ hợp.

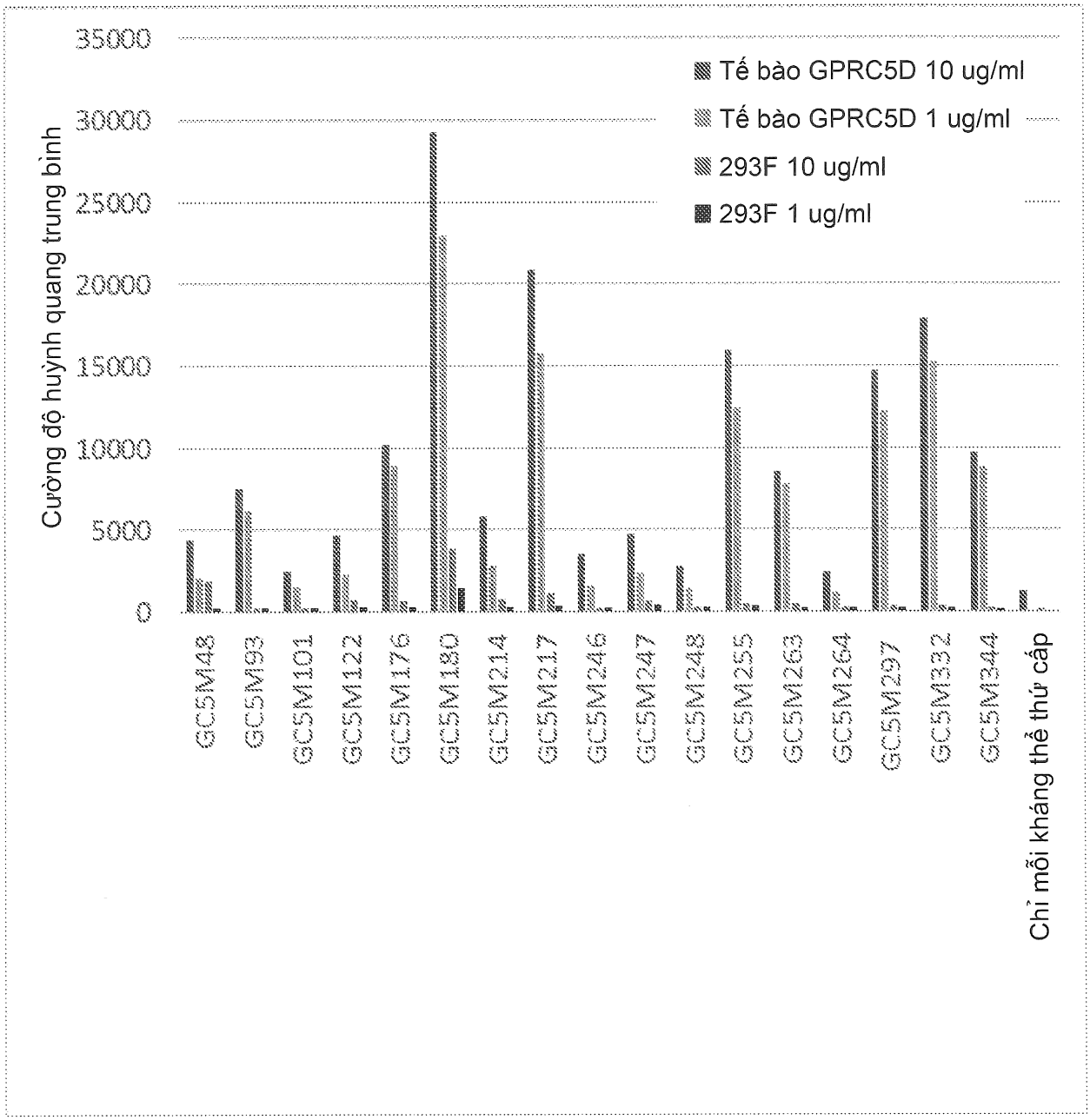
28. Dược phẩm bao gồm kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 được phân lập, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 24 và chất mang dược dụng.

29. Phương pháp tạo kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 được phân lập, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó, theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 18 đến điểm 24, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào được phân lập theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 25 đến 27.

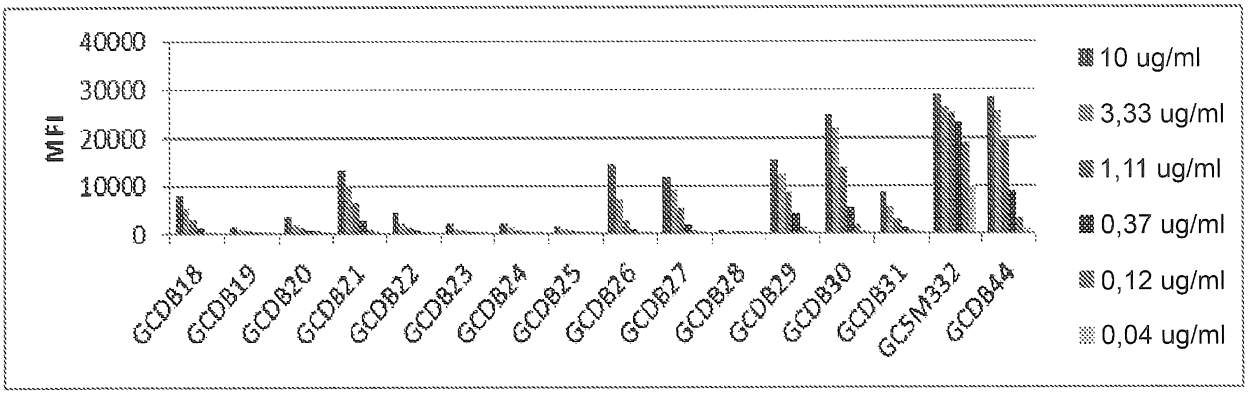
30. Polynucleotit tổng hợp được phân lập mã hóa HC1, HC2, LC1 và LC2 của kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 được phân lập, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 18 đến 24.

31. Kit bao gồm kháng thể đặc hiệu kép GPRC5D x CD3 được phân lập, hoặc mảnh gắn đặc hiệu kép của nó theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 18 đến 24 và/hoặc polynucleotit theo điểm 30 và bao bì đóng gói chúng.

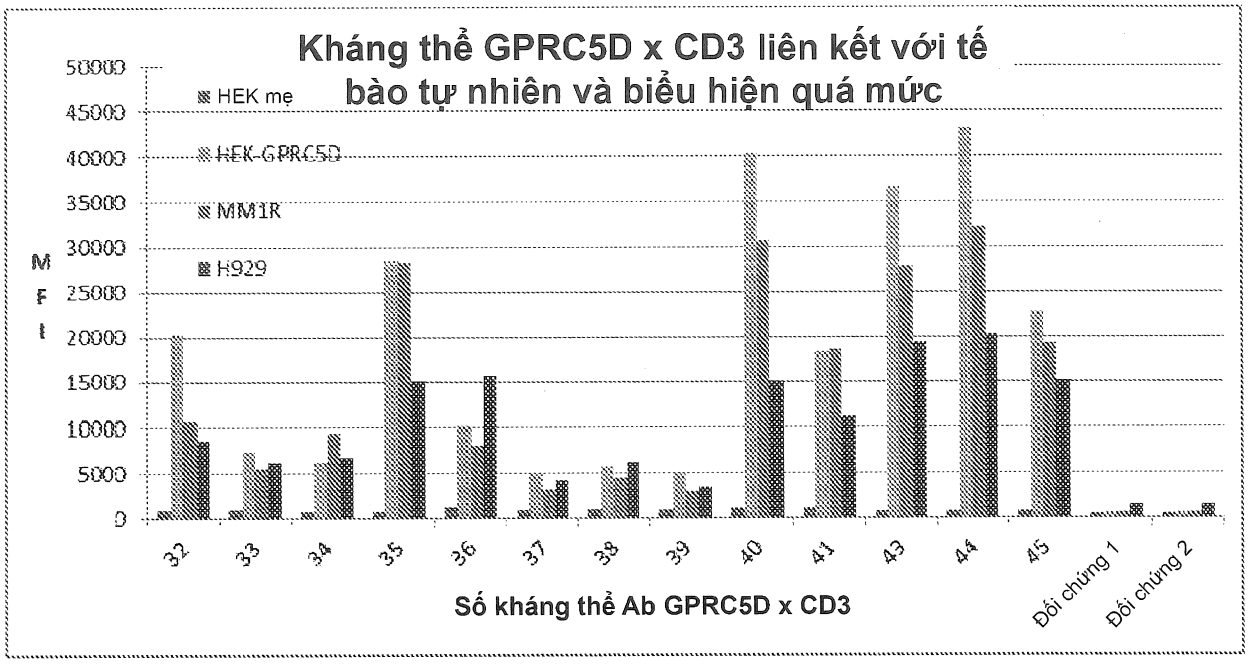
Hình 1


Cường độ huỳnh quang trung bình
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Tế bào GPRC5D 10 ug/ml
Tế bào GPRC5D 1 ug/ml
293F 10 ug/ml
293F 1 ug/ml
GC5M48
GC5M93
GC5M101
GC5M122
GC5M176
GC5M180
GC5M214
GC5M217
GC5M246
GC5M247
GC5M248
GC5M255
GC5M263
GC5M264
GC5M297
GC5M332
GC5M344
Chỉ mỗi kháng thể thứ cấp

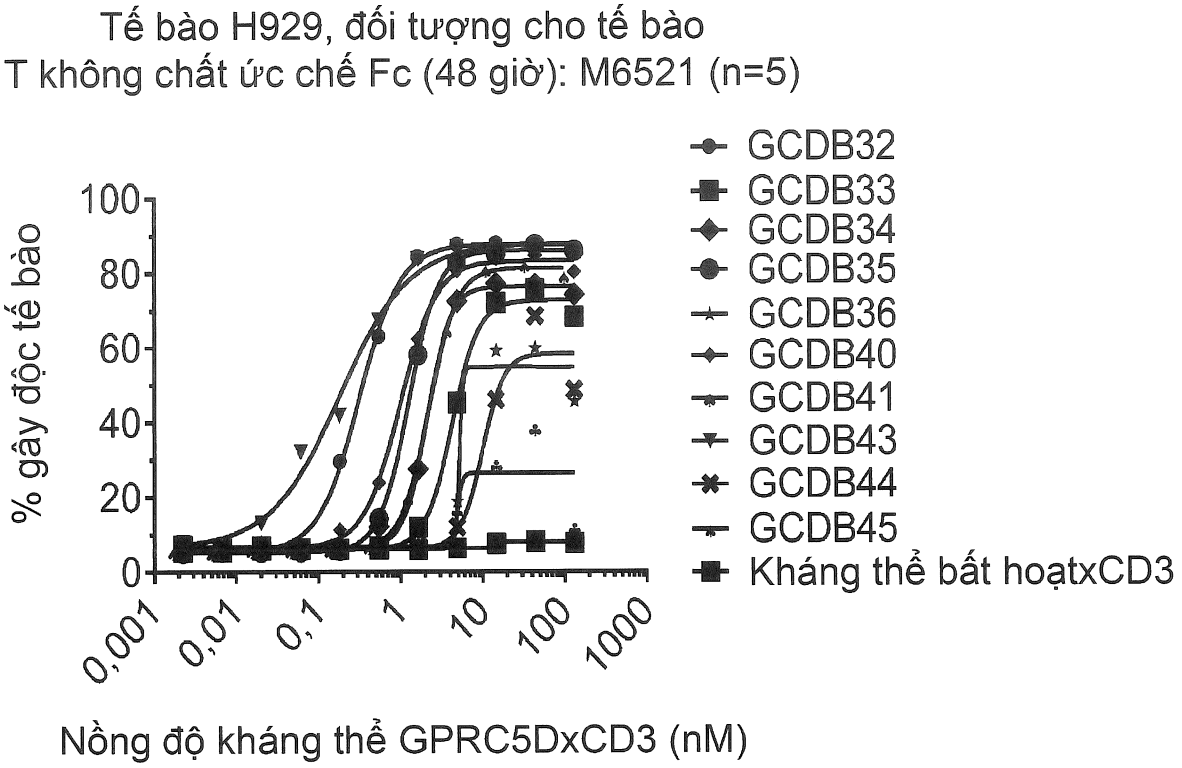
Hình 2


40000
30000
20000
10000
0
MFI
GCDB18
GCDB19
GCDB20
GCDB21
GCDB22
GCDB23
GCDB24
GCDB25
GCDB26
GCDB27
GCDB28
GCDB29
GCDB30
GCDB31
GCSM332
GCDB44
10 ug/ml
3,33 ug/ml
1,11 ug/ml
0,37 ug/ml
0,12 ug/ml
0,04 ug/ml

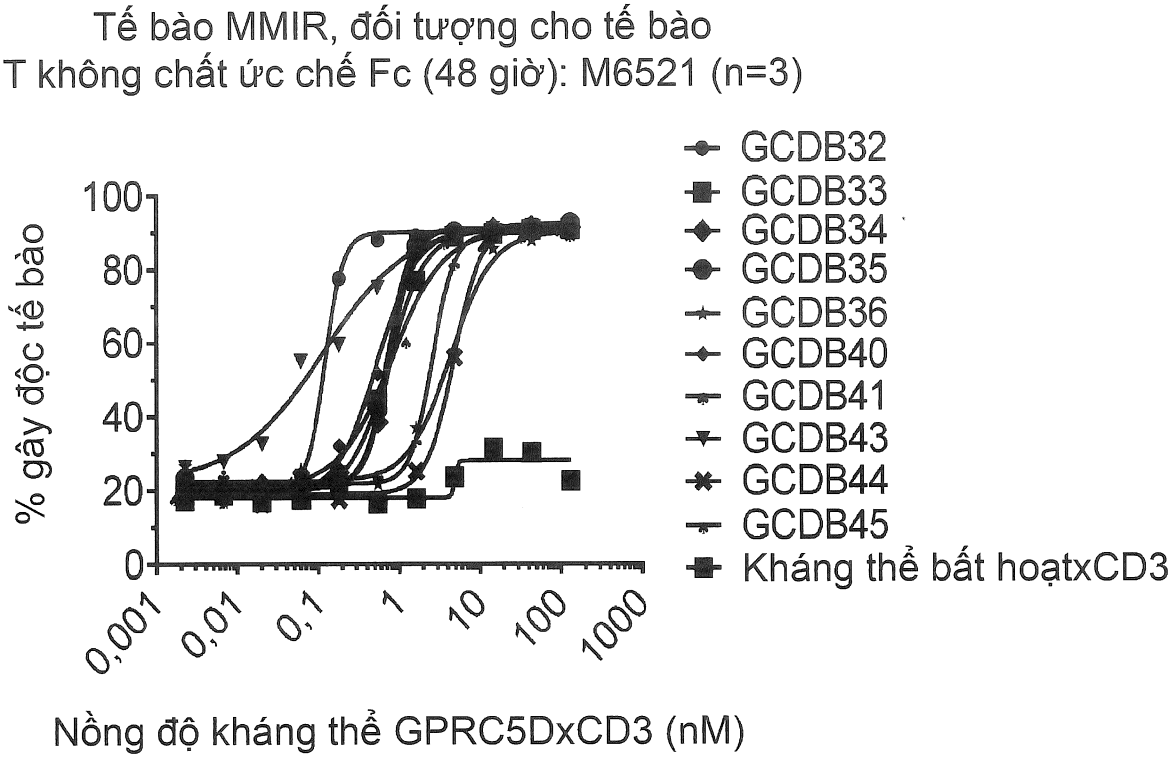
Hình 3


Kháng thể GPRC5D x CD3 liên kết với tế bào tự nhiên và biểu hiện quá mức
HEK mẹ
HEK-GPRC5D
MM1R
H929
MFI
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
43
44
45
Đối chứng 1
Đối chứng 2
Số kháng thể Ab GPRC5D x CD3

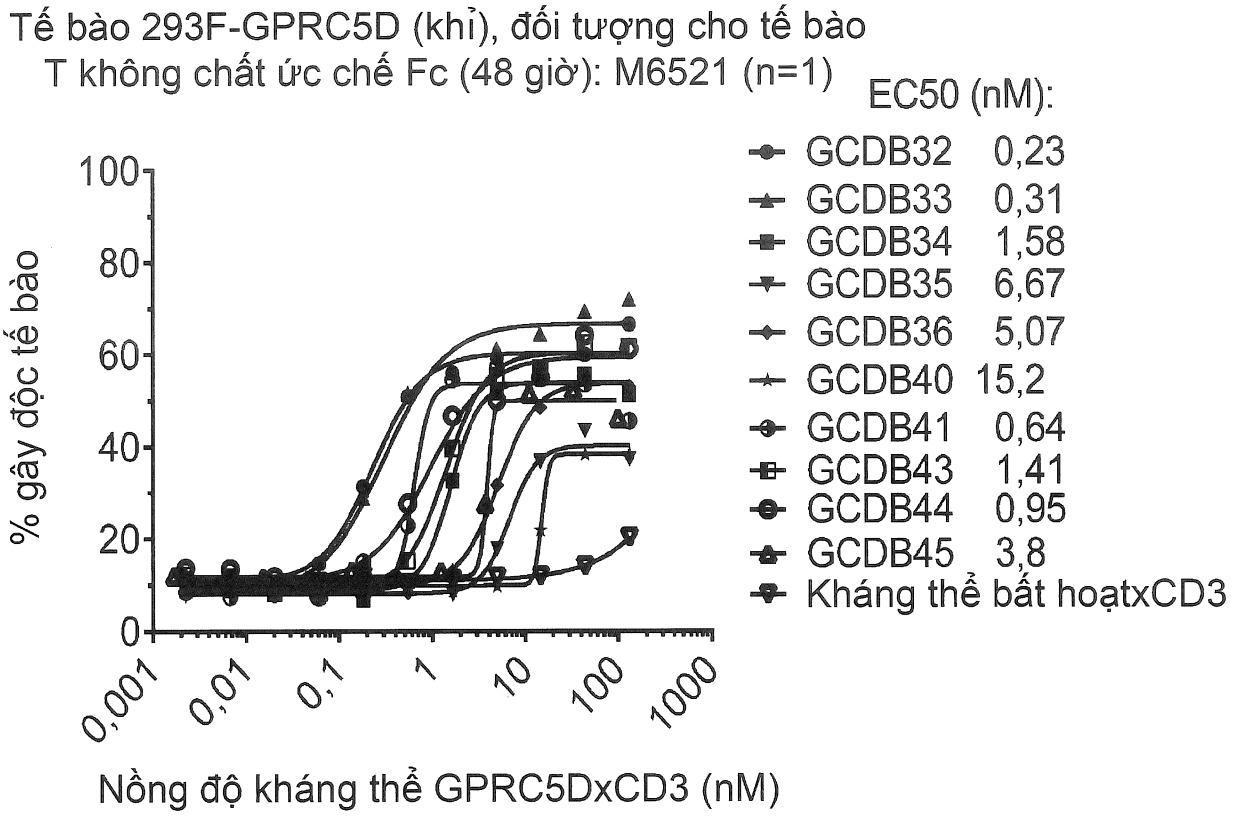
Hình 4A


Tế bào H929, đối tượng cho tế bào
T không chất ức chế Fc (48 giờ): M6521 (n=5)
% gây độc tế bào
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể GPRC5DxCD3 (nM)
GCDB32
GCDB33
GCDB34
GCDB35
GCDB36
GCDB40
GCDB41
GCDB43
GCDB44
GCDB45
Kháng thể bất hoạtxCD3

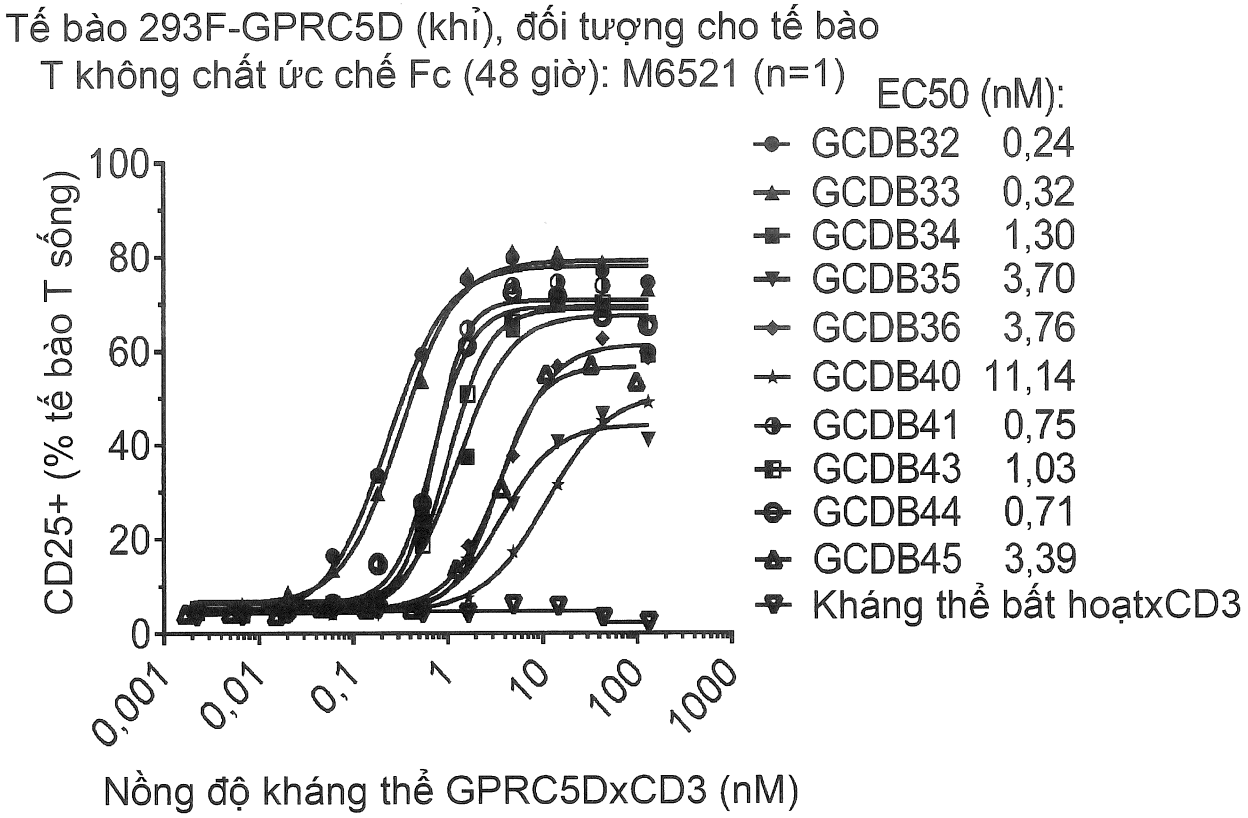
Hình 4B


Tế bào MMIR, đối tượng cho tế bào
T không chất ức chế Fc (48 giờ): M6521 (n=3)
% gây độc tế bào
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể GPRC5DxCD3 (nM)
GCDB32
GCDB33
GCDB34
GCDB35
GCDB36
GCDB40
GCDB41
GCDB43
GCDB44
GCDB45
Kháng thể bất hoạtxCD3

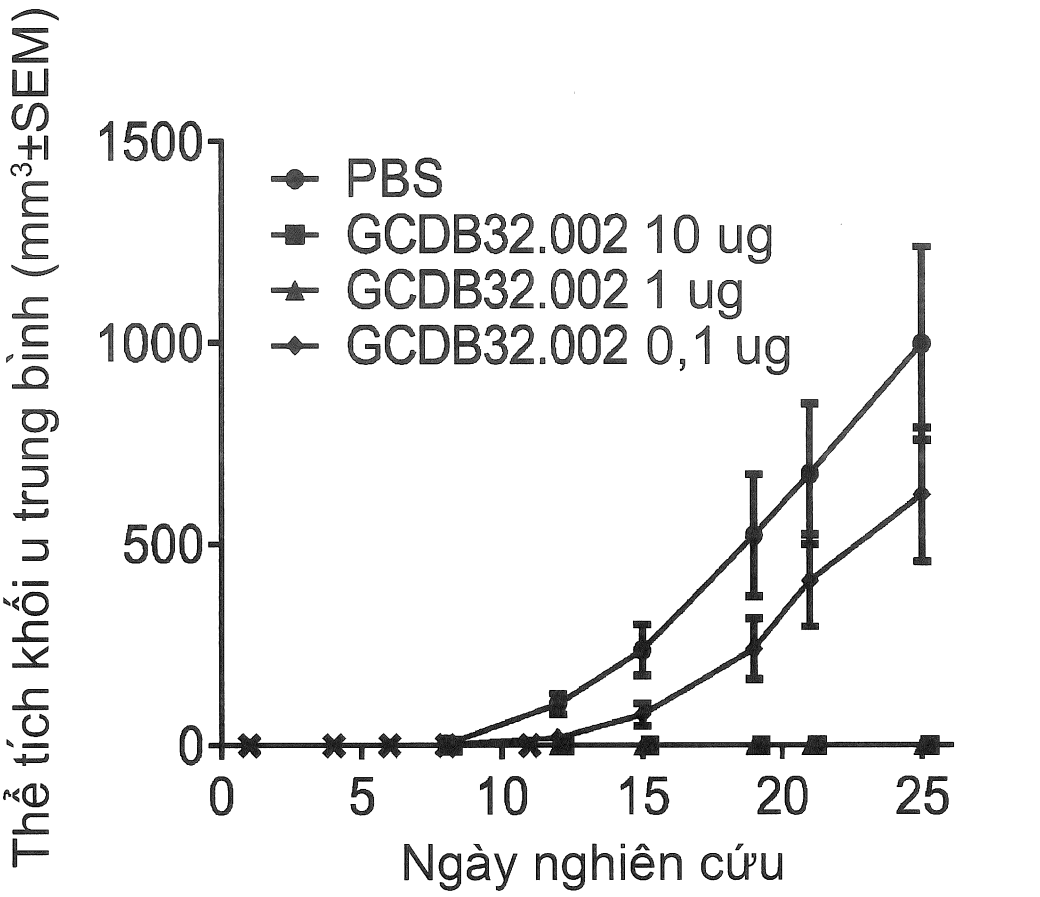
Hình 5A


Tế bào 293F-GPRC5D (khỉ), đối tượng cho tế bào
T không chất ức chế Fc (48 giờ): M6521 (n=1)
EC50 (nM):
GCDB32 0,23
GCDB33 0,31
GCDB34 1,58
GCDB35 6,67
GCDB36 5,07
GCDB40 15,2
GCDB41 0,64
GCDB43 1,41
GCDB44 0,95
GCDB45 3,8
Kháng thể bất hoạtxCD3
% gây độc tế bào
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể GPRC5DxCD3 (nM)

Hình 5B

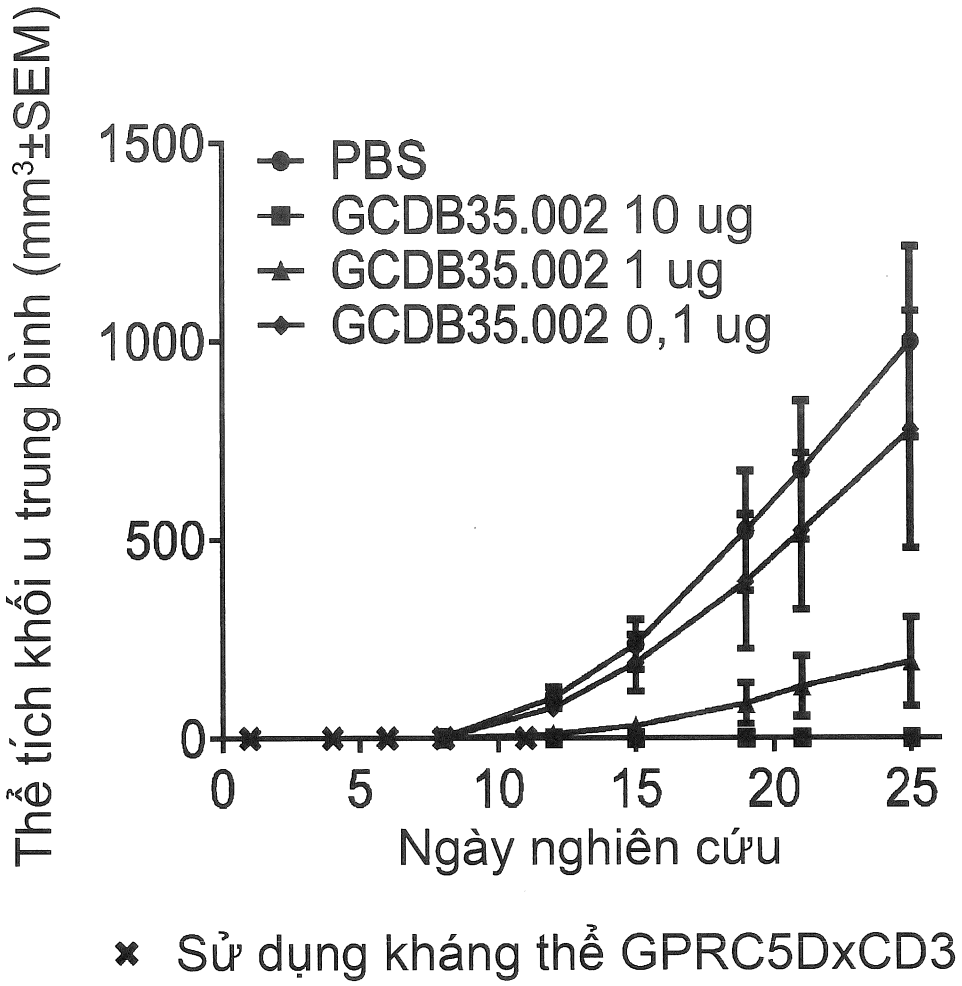

Tế bào 293F-GPRC5D (khỉ), đối tượng cho tế bào
T không chất ức chế Fc (48 giờ): M6521 (n=1)
EC50 (nM):
GCDB32 0,24
GCDB33 0,32
GCDB34 1,30
GCDB35 3,70
GCDB36 3,76
GCDB40 11,14
GCDB41 0,75
GCDB43 1,03
GCDB44 0,71
GCDB45 3,39
Kháng thể bất hoạtxCD3
CD25+ (% tế bào T sống)
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể GPRC5DxCD3 (nM)

Hình 6A

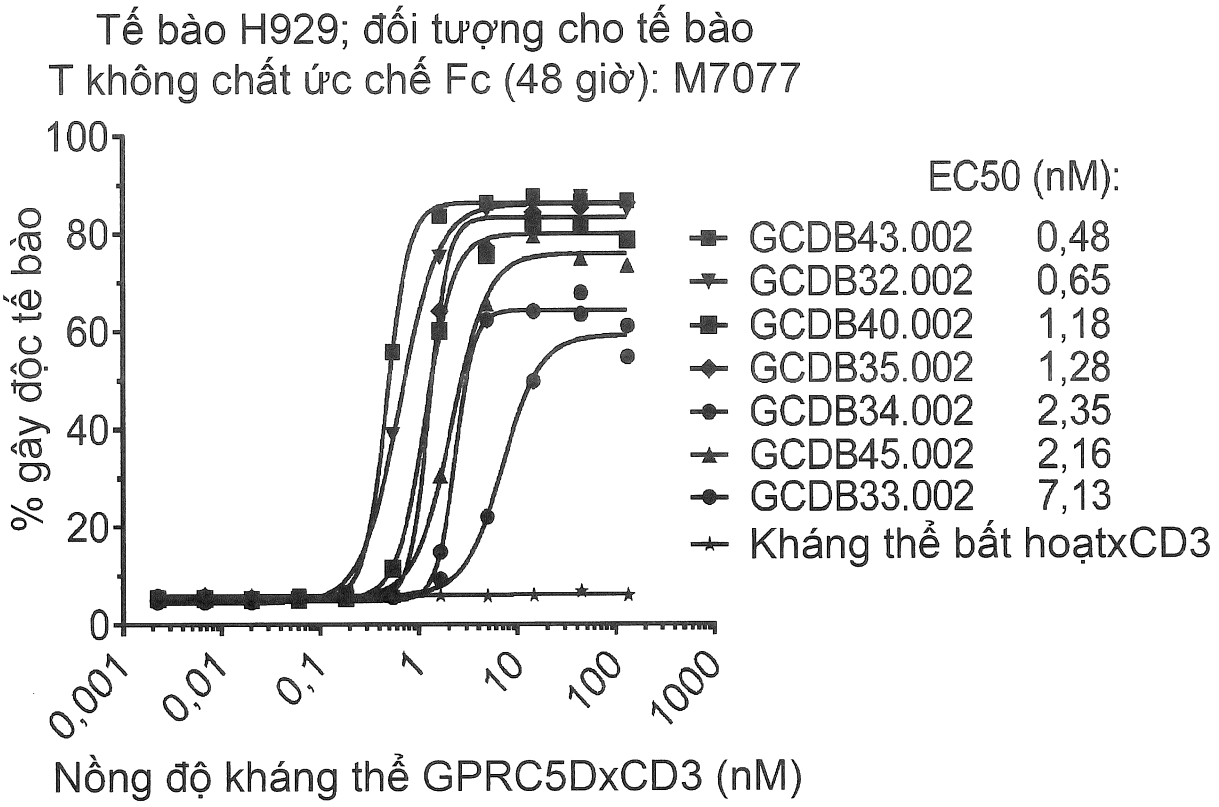


✖ Sử dụng kháng thể GPRC5DxCD3

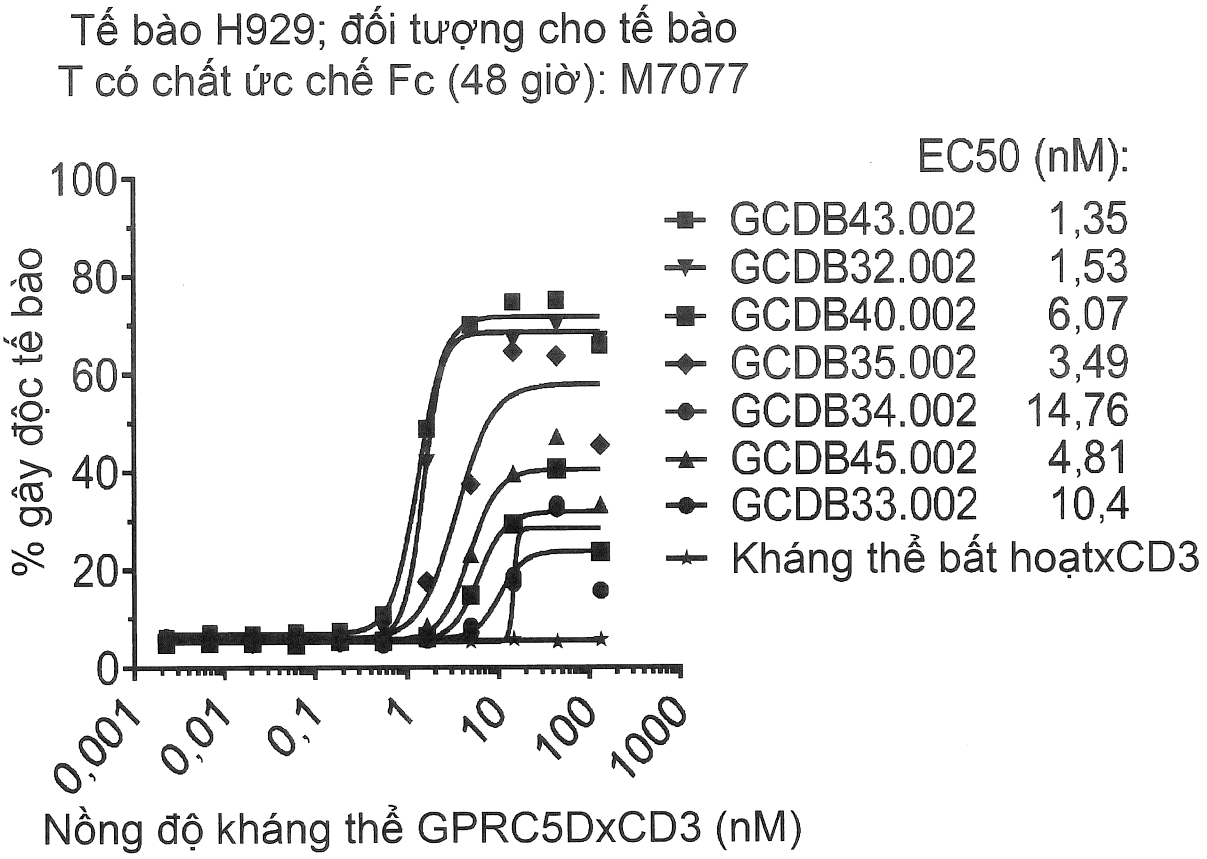
Hình 6B


Thể tích khối u trung bình (mm³±SEM)
1500
1000
500
0
PBS
GCDB35.002 10 ug
GCDB35.002 1 ug
GCDB35.002 0,1 ug
0
5
10
15
20
25
Ngày nghiên cứu
Sử dụng kháng thể GPRC5DxCD3

Hình 7A

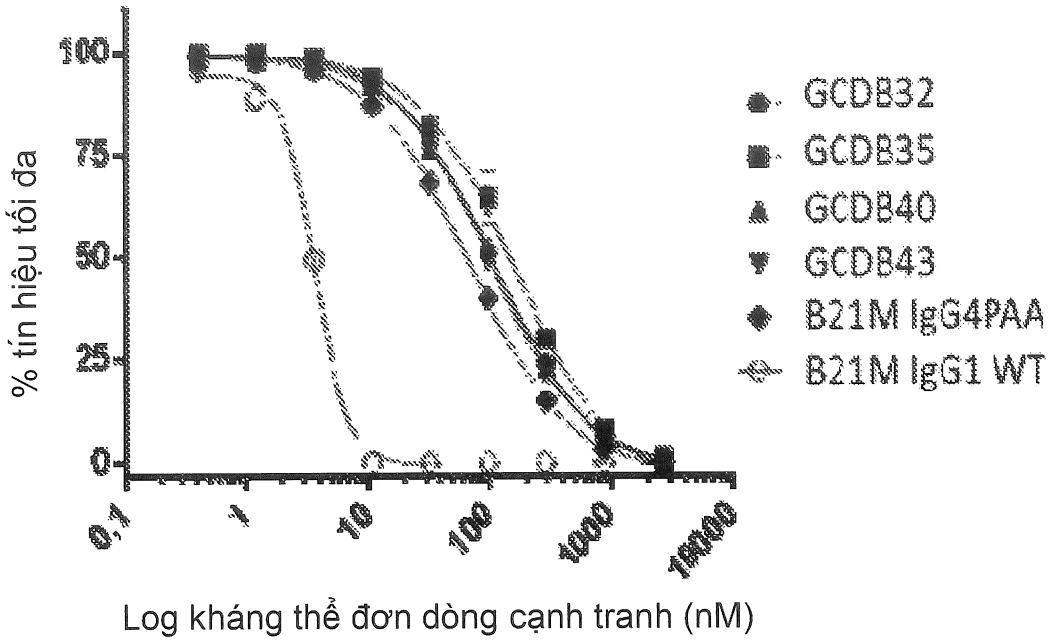

Tế bào H929; đối tượng cho tế bào
T không chất ức chế Fc (48 giờ): M7077
% gây độc tế bào
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể GPRC5DxCD3 (nM)
EC50 (nM):
GCDB43.002 0,48
GCDB32.002 0,65
GCDB40.002 1,18
GCDB35.002 1,28
GCDB34.002 2,35
GCDB45.002 2,16
GCDB33.002 7,13
Kháng thể bất hoạtxCD3

Hình 7B


Tế bào H929; đối tượng cho tế bào
T có chất ức chế Fc (48 giờ): M7077
EC50 (nM):
GCDB43.002 1,35
GCDB32.002 1,53
GCDB40.002 6,07
GCDB35.002 3,49
GCDB34.002 14,76
GCDB45.002 4,81
GCDB33.002 10,4
Kháng thể bất hoạtxCD3
% gây độc tế bào
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể GPRC5DxCD3 (nM)

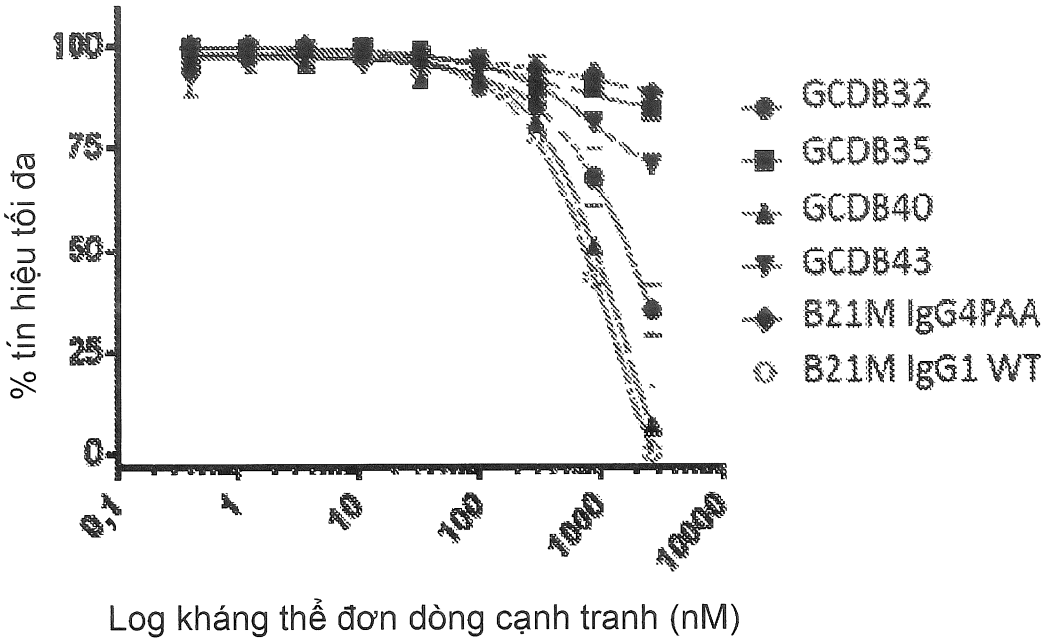
Hình 8A

FcγRI người



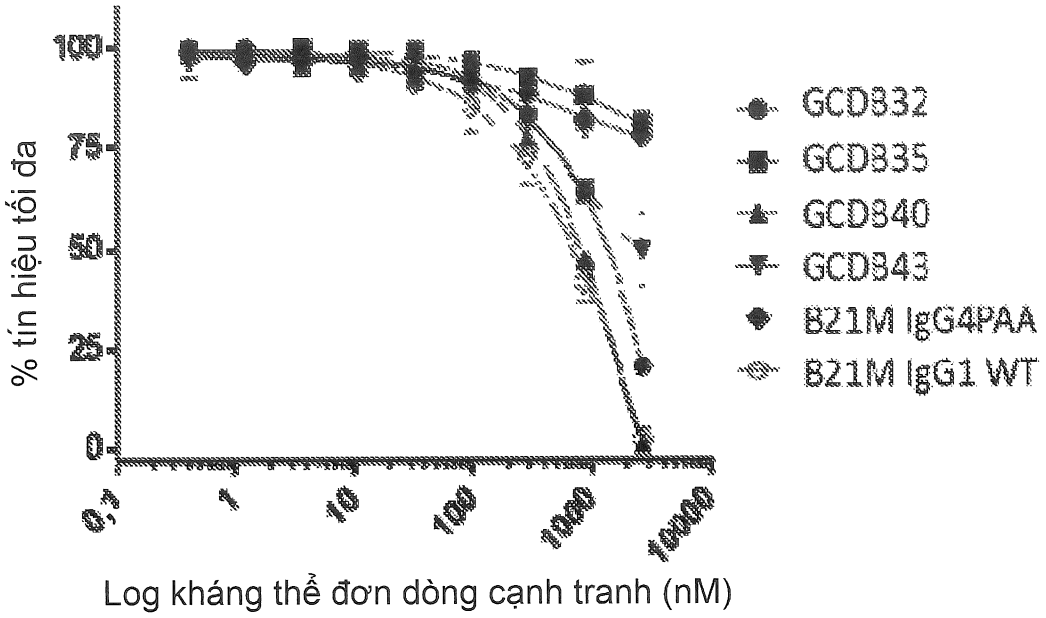
Hình 8B

FcγRIIa người



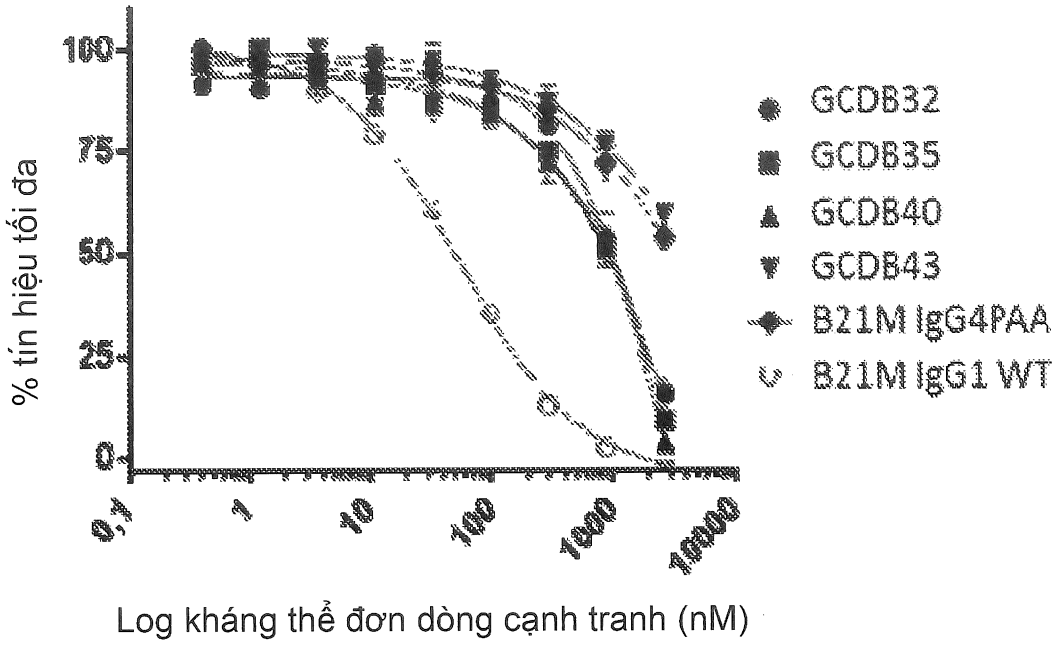
Hình 8C

FcγRIIb người

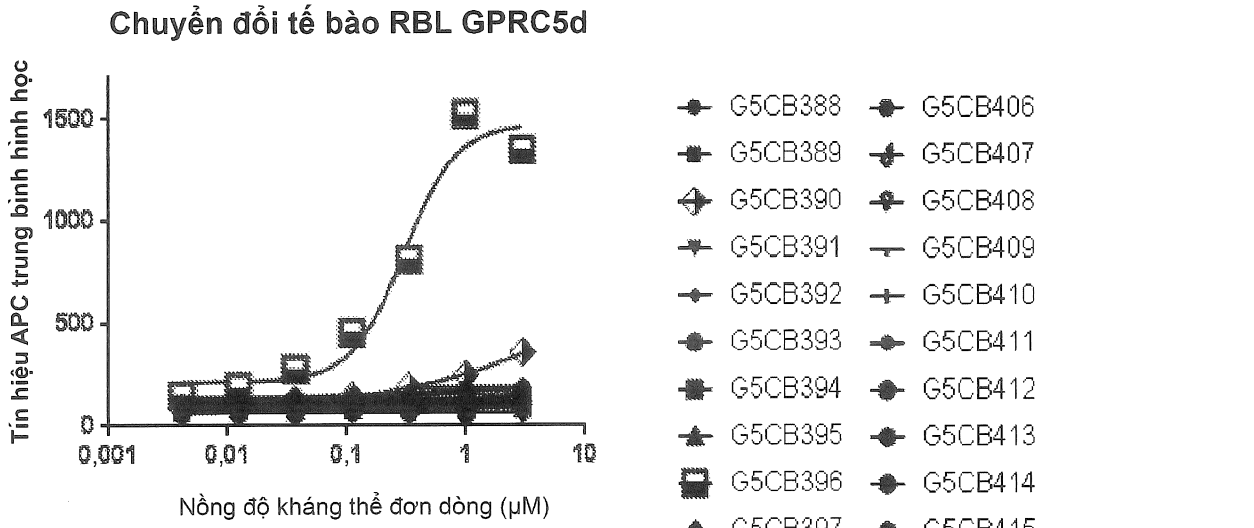


Hình 8D

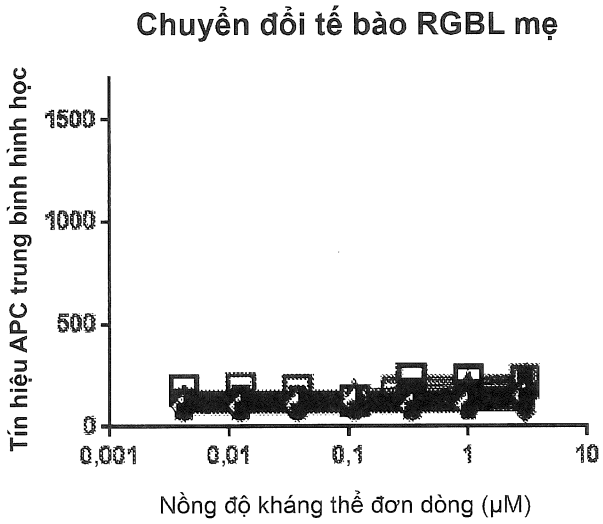
FcγRIIIa người



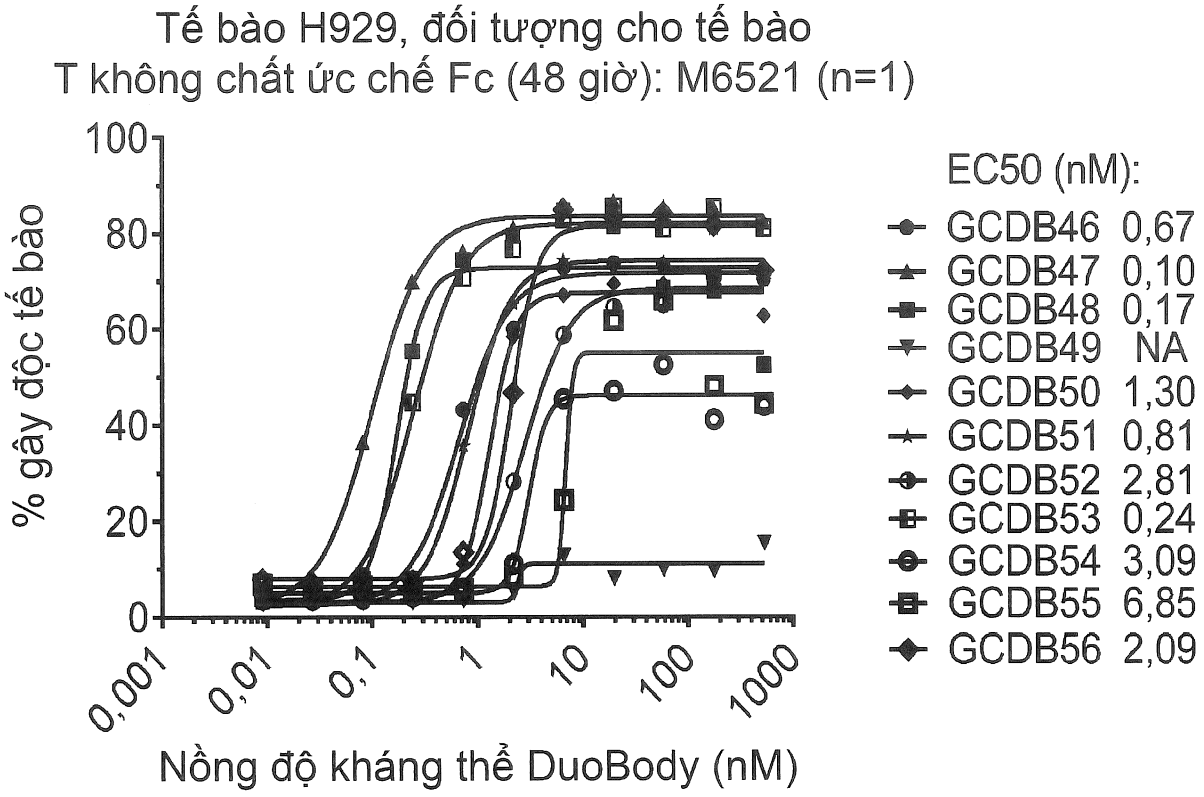
Hình 9A



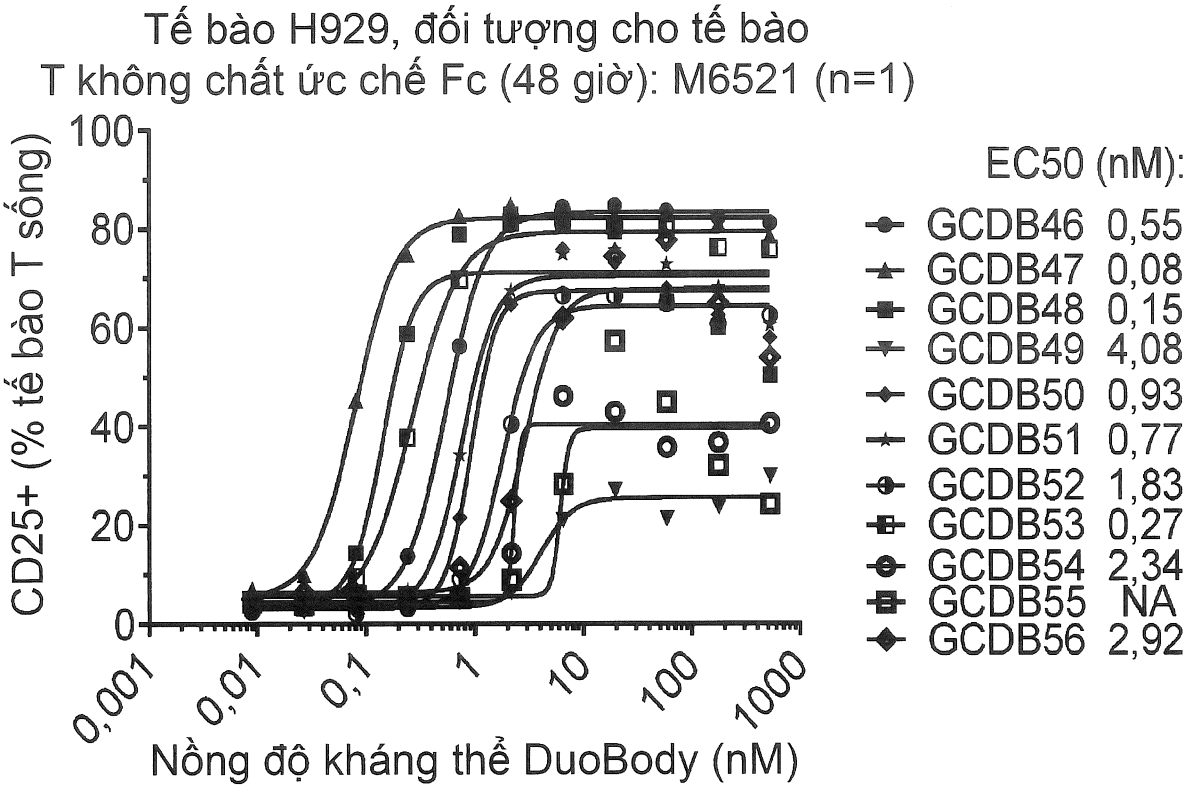
Hình 9B



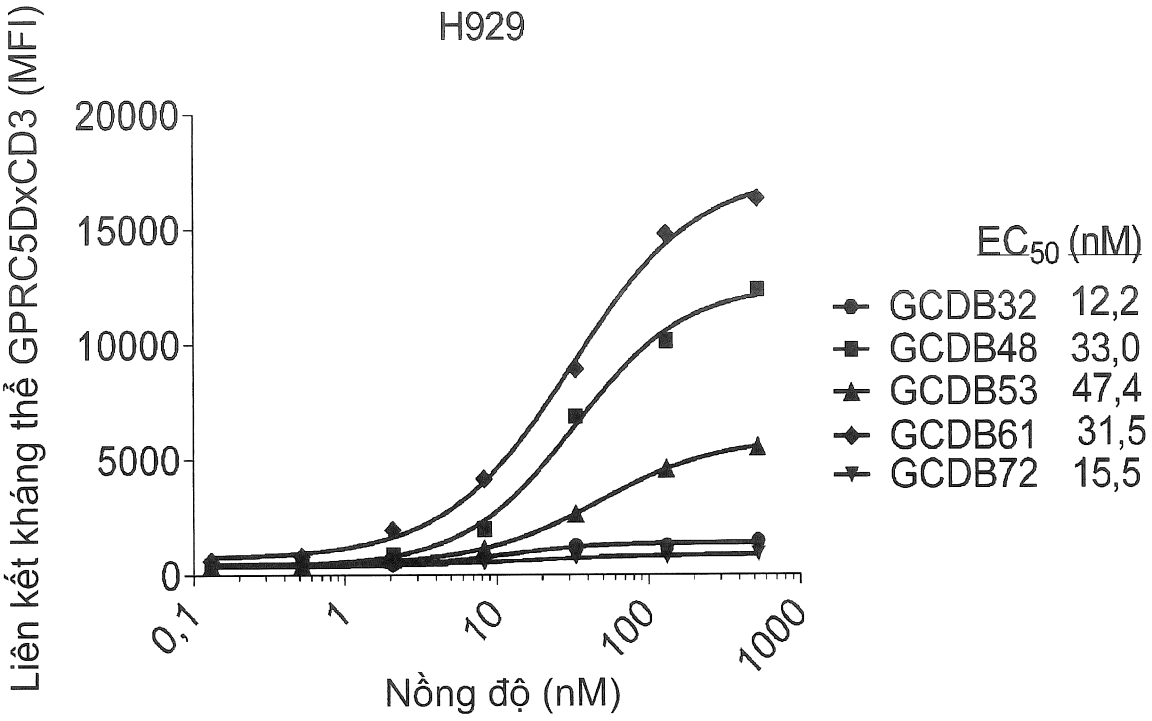
Hình 10A


Tế bào H929, đối tượng cho tế bào
T không chất ức chế Fc (48 giờ): M6521 (n=1)
% gây độc tế bào
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể DuoBody (nM)
EC50 (nM):
GCDB46 0,67
GCDB47 0,10
GCDB48 0,17
GCDB49 NA
GCDB50 1,30
GCDB51 0,81
GCDB52 2,81
GCDB53 0,24
GCDB54 3,09
GCDB55 6,85
GCDB56 2,09

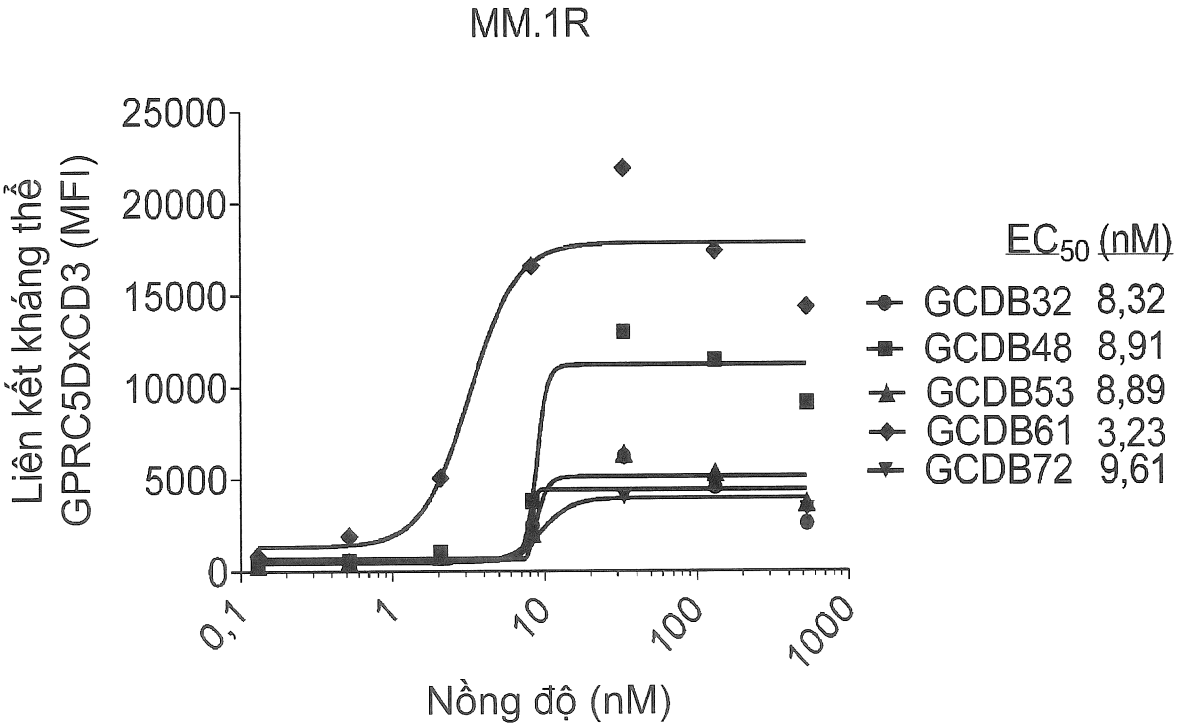
Hình 10B


Tế bào H929, đối tượng cho tế bào
T không chất ức chế Fc (48 giờ): M6521 (n=1)
CD25+ (% tế bào T sống)
100
80
60
40
20
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể DuoBody (nM)
EC50 (nM):
GCDB46 0,55
GCDB47 0,08
GCDB48 0,15
GCDB49 4,08
GCDB50 0,93
GCDB51 0,77
GCDB52 1,83
GCDB53 0,27
GCDB54 2,34
GCDB55 NA
GCDB56 2,92

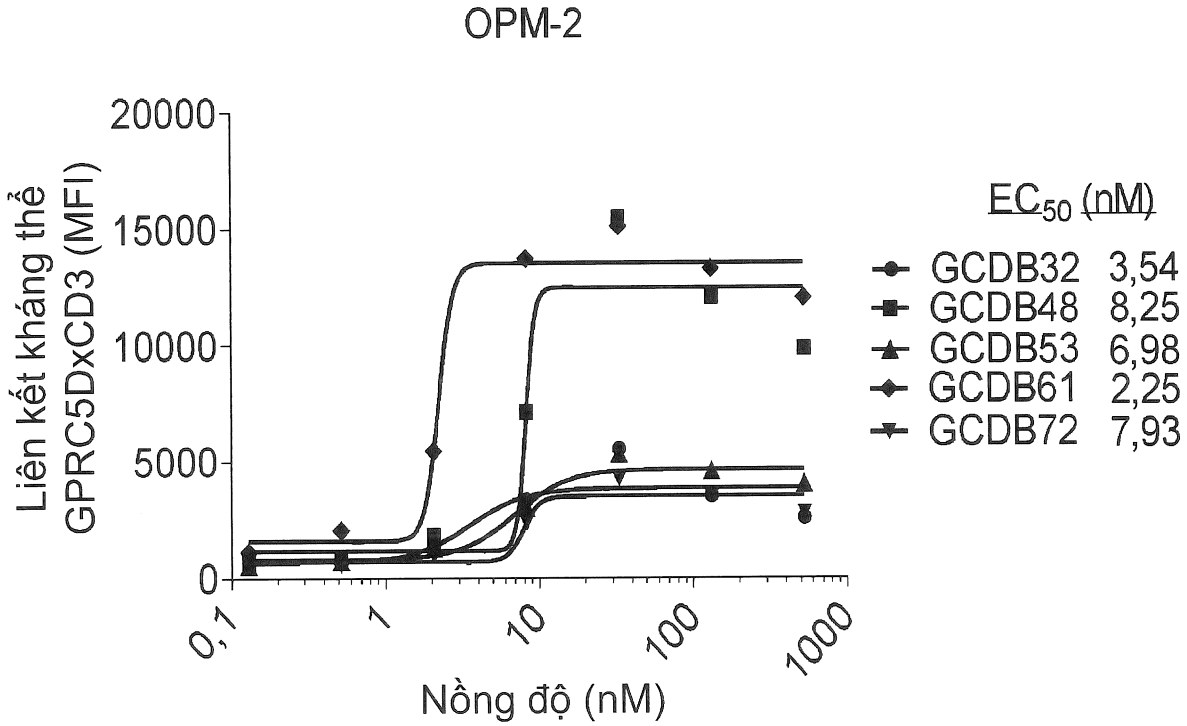
Hình 11A


H929
Liên kết kháng thể GPRC5DxCD3 (MFI)
20000
15000
10000
5000
0
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ (nM)
EC50 (nM)
GCDB32 12,2
GCDB48 33,0
GCDB53 47,4
GCDB61 31,5
GCDB72 15,5

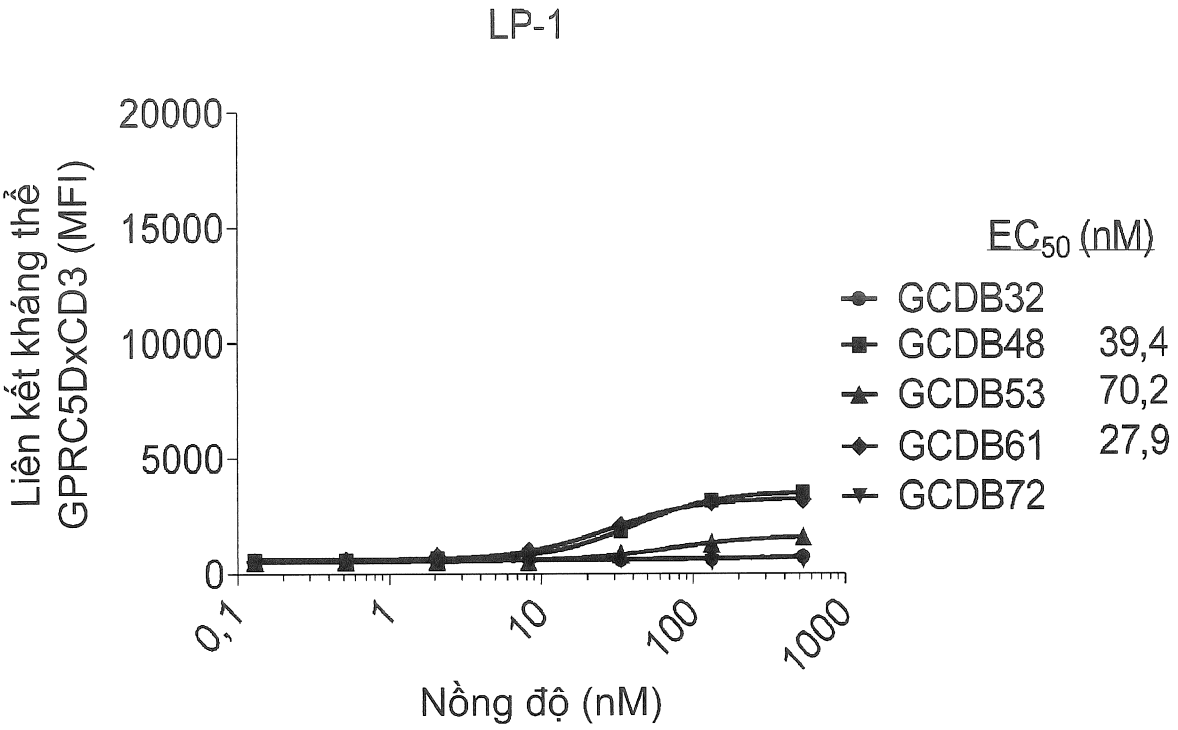
Hình 11B



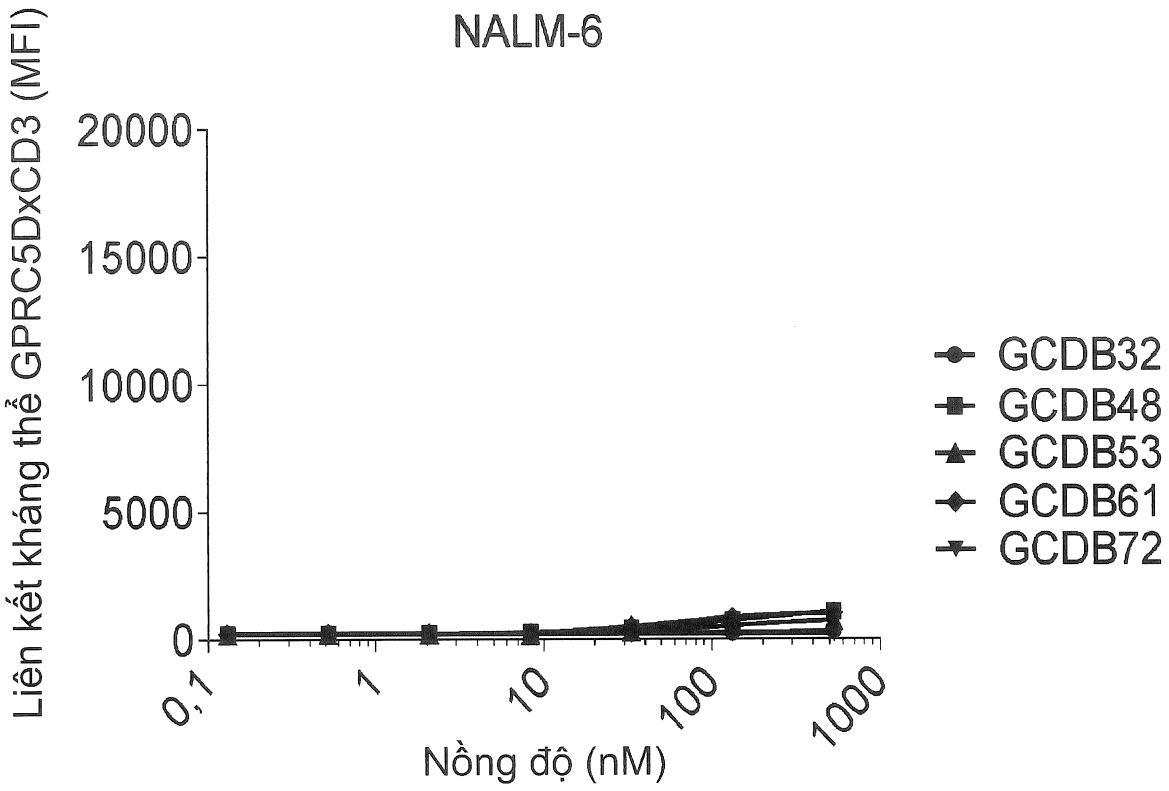
Hình 11C



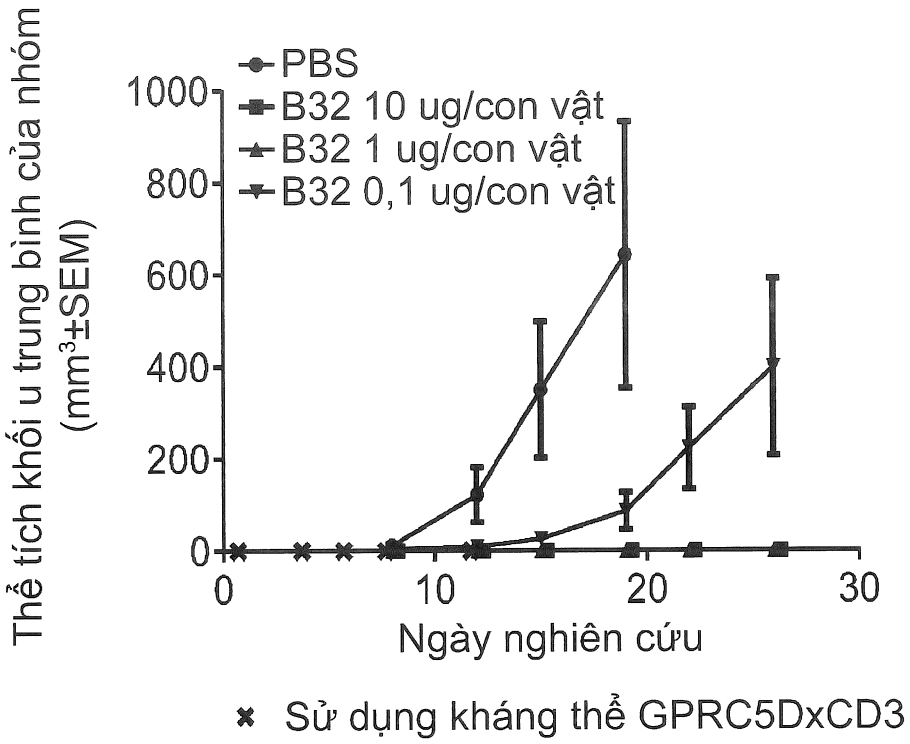
Hình 11D


LP-1
Liên kết kháng thể GPRC5DxCD3 (MFI)
20000
15000
10000
5000
0
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ (nM)
EC50 (nM)
GCDB32
GCDB48 39,4
GCDB53 70,2
GCDB61 27,9
GCDB72

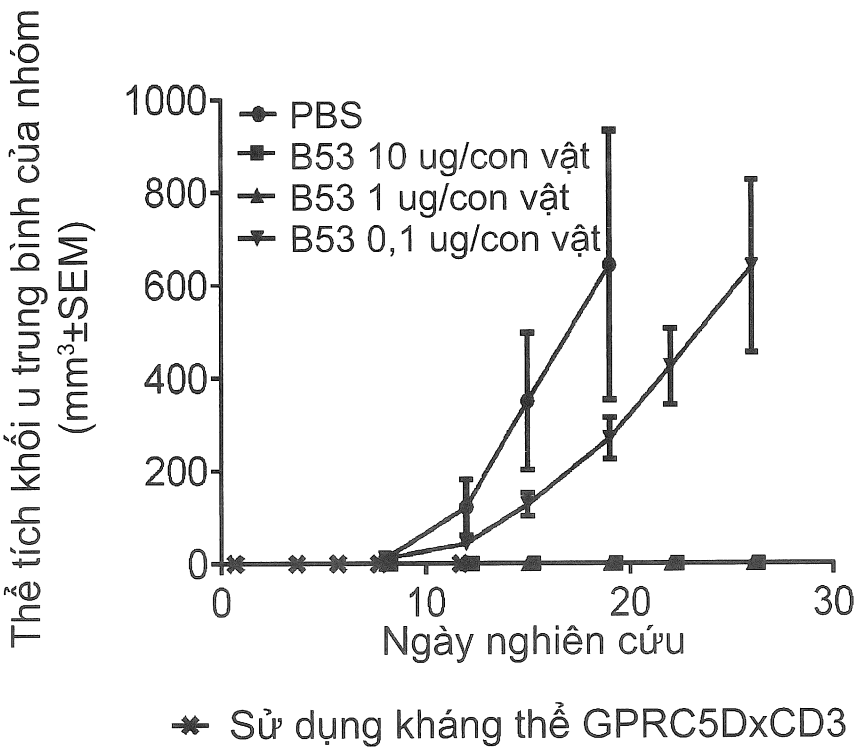
Hình 11E


NALM-6
Liên kết kháng thể GPRC5DxCD3 (MFI)
20000
15000
10000
5000
0
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ (nM)
GCDB32
GCDB48
GCDB53
GCDB61
GCDB72

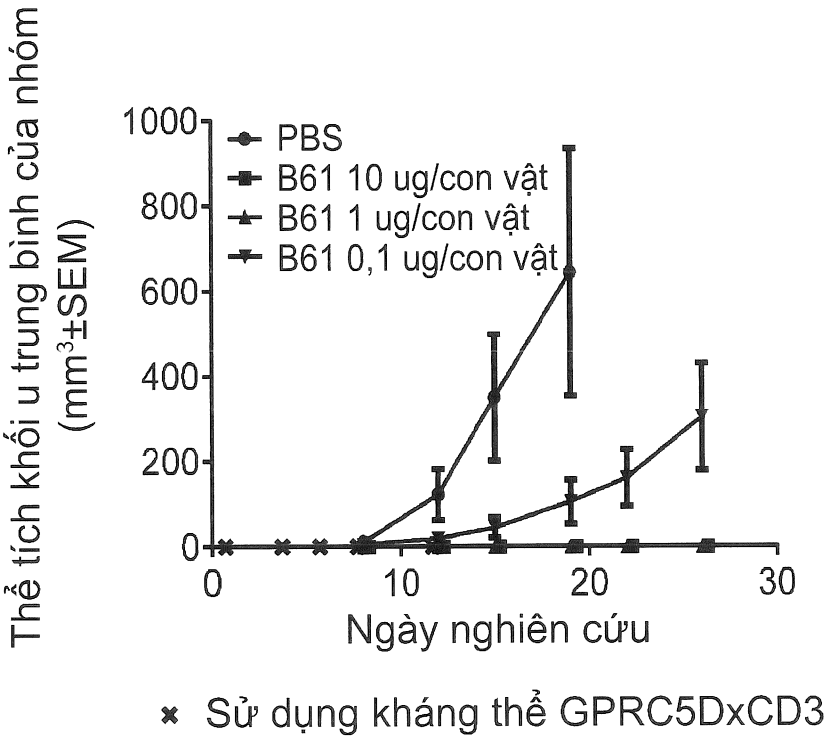
Hình 12A


Thể tích khối u trung bình của nhóm (mm³±SEM)
PBS
B32 10 ug/con vật
B32 1 ug/con vật
B32 0,1 ug/con vật
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
Ngày nghiên cứu
Sử dụng kháng thể GPRC5DxCD3

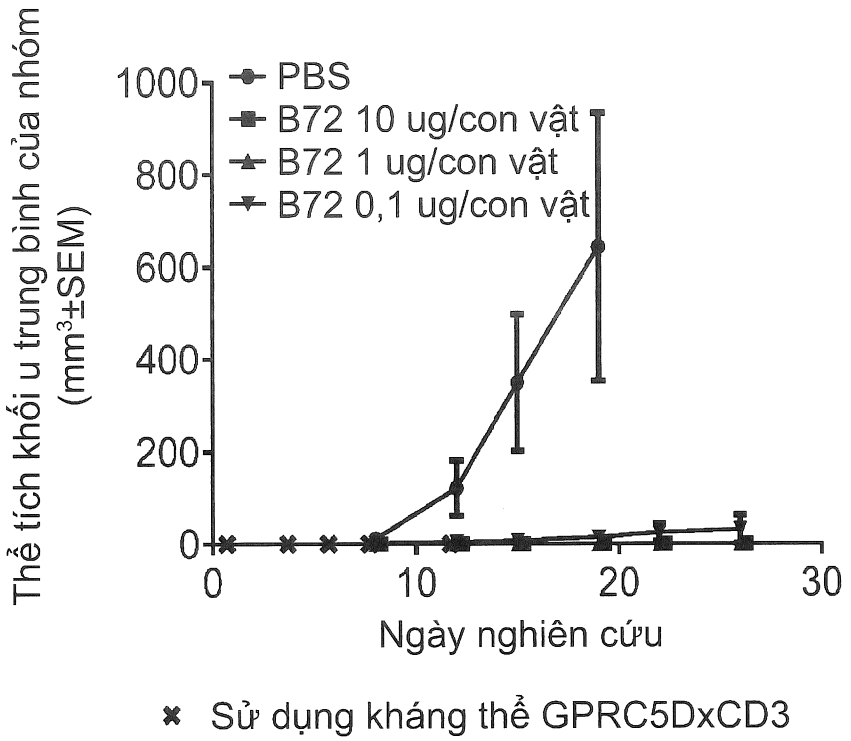
Hình 12B



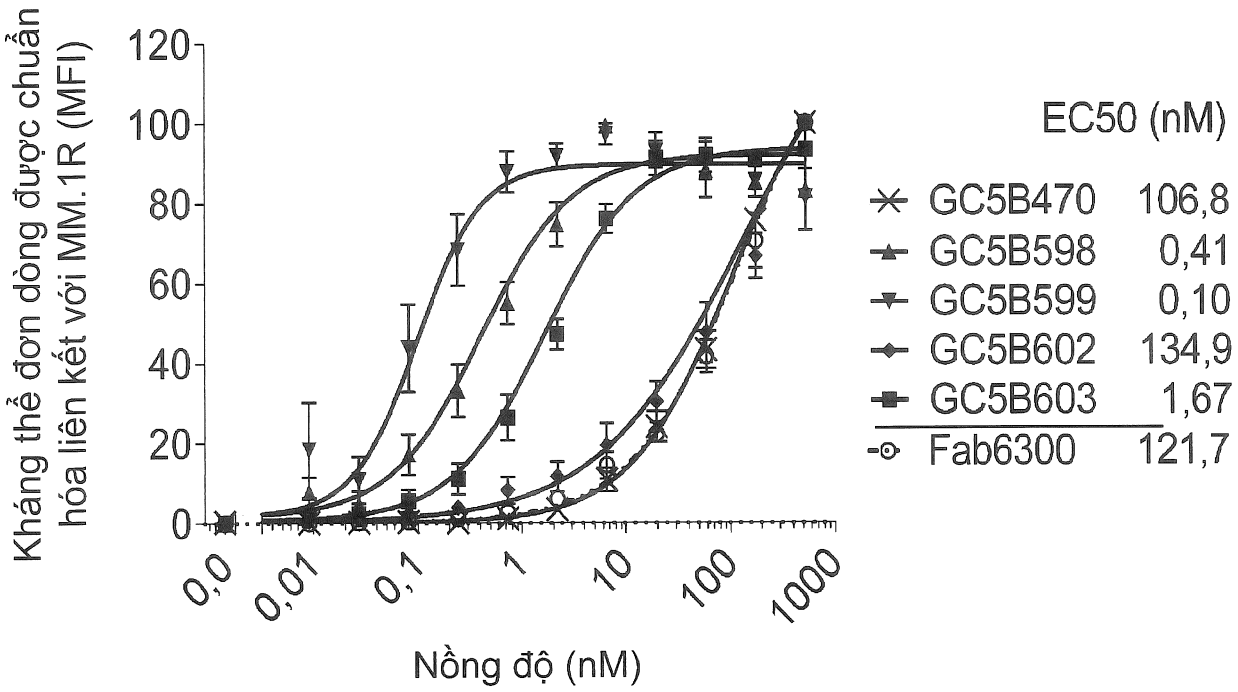
Hình 12C



Hình 12D


Thể tích khối u trung bình của nhóm (mm³±SEM)
1000
800
600
400
200
0
PBS
B72 10 ug/con vật
B72 1 ug/con vật
B72 0,1 ug/con vật
0
10
20
30
Ngày nghiên cứu
Sử dụng kháng thể GPRC5DxCD3

Hình 13

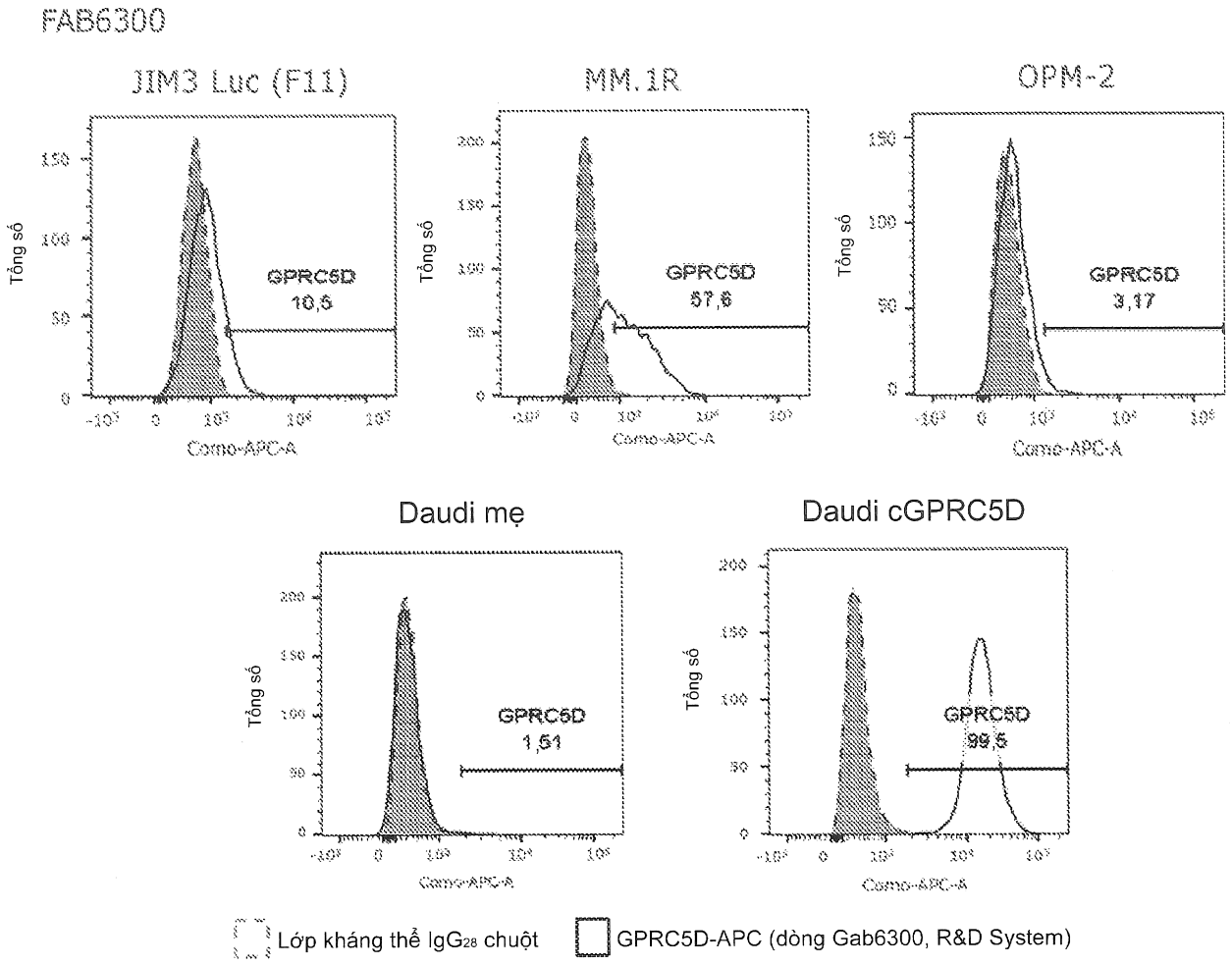


470 GC5M470.GC5B470.002
610 GC5B598 (GC5M610)
611 GC5B599 (GC5M611)
614 GC5B602 (GC5M614)
615 GC5B603 (GC5M615)

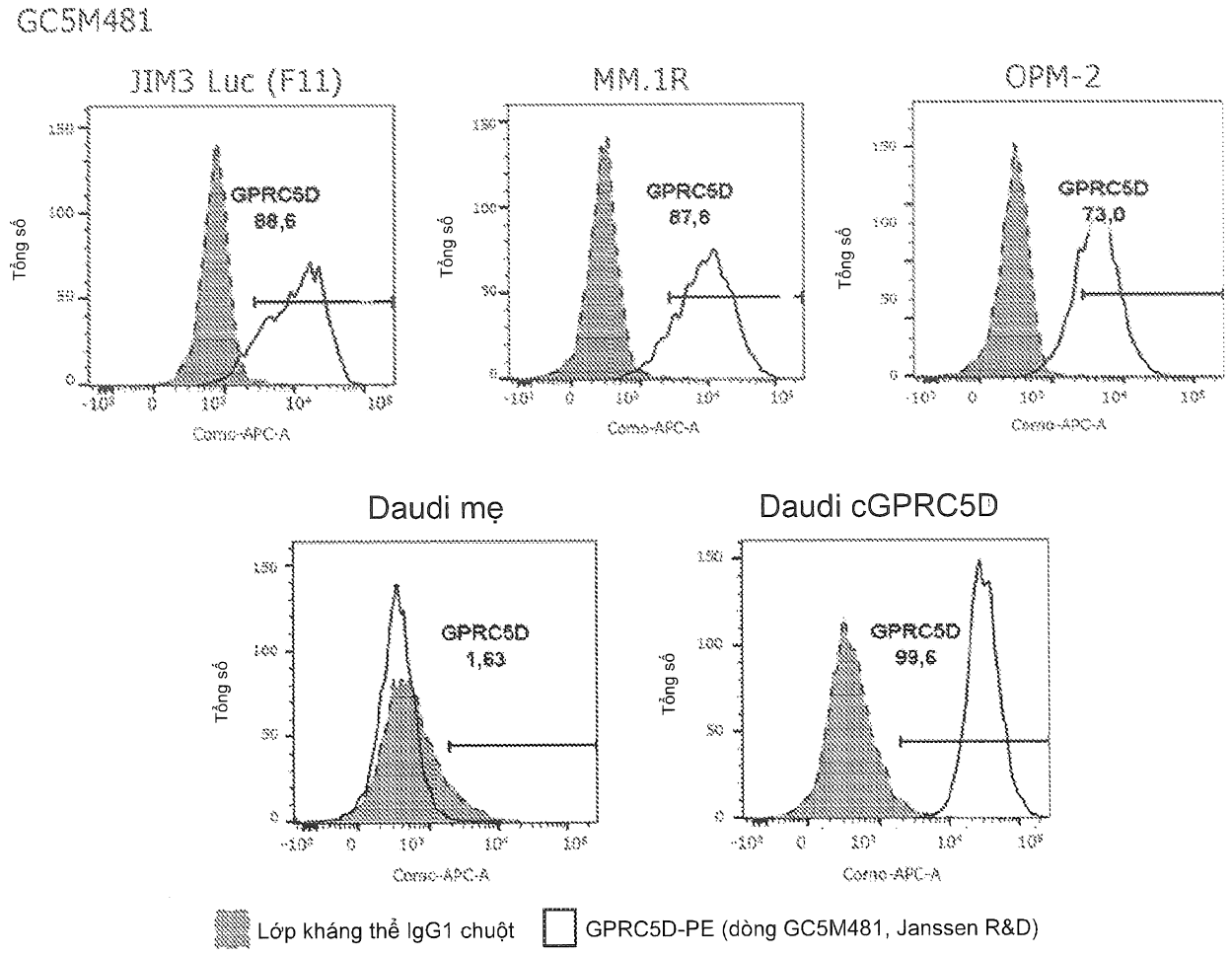
Nồng độ kháng thể:

µg/mL	0	0,0003	0,001	0,005	0,020	0,078	0,313	1,250	5,000	20,000	80,000
nM	0	0,0020	0,008	0,032	0,130	0,520	2,078	8,313	33,250	133,000	532,000

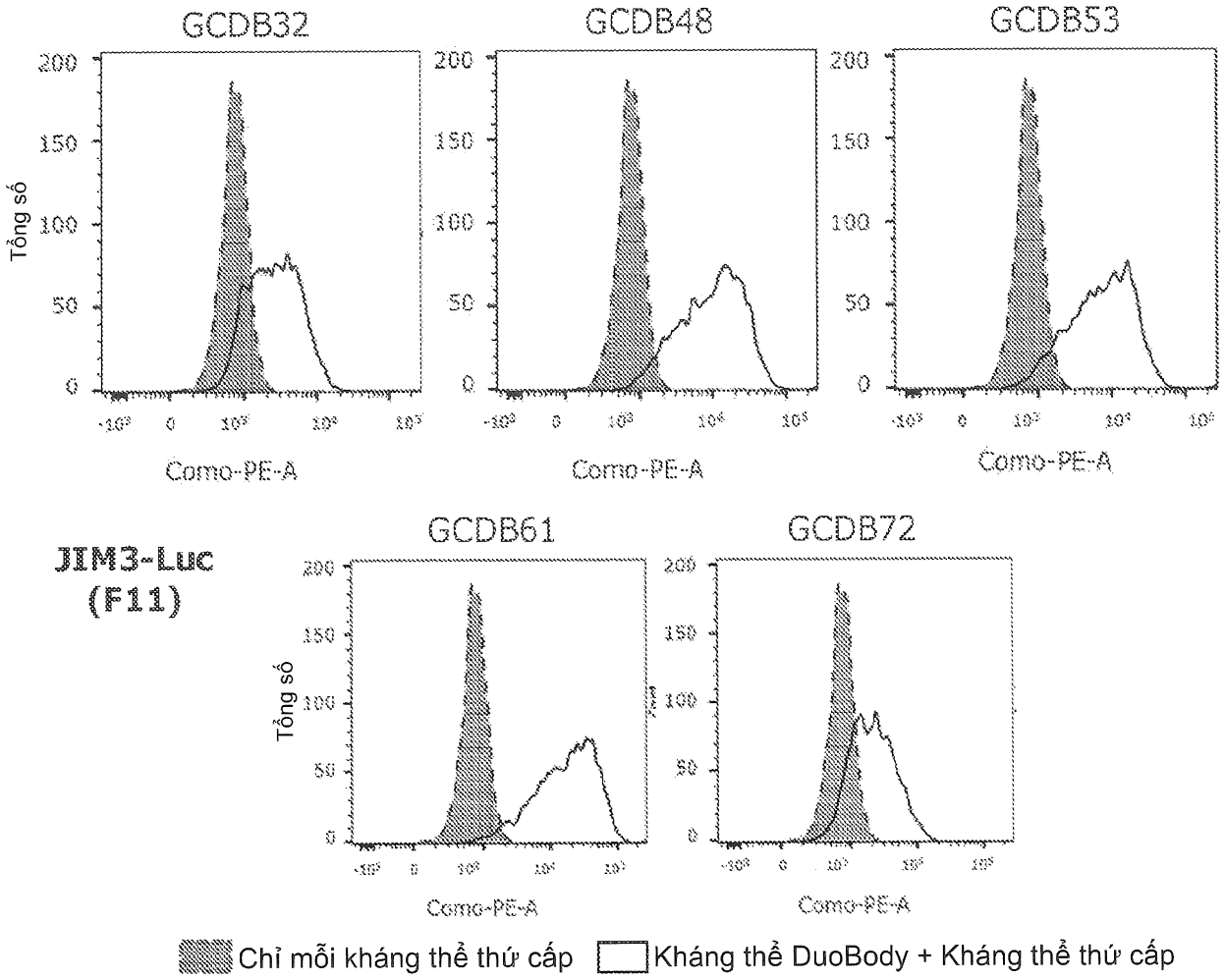
Hình 14A


FAB6300
JIM3 Luc (F11)
MM.1R
OPM-2
Tổng số
GPRC5D
10,5
GPRC5D
57,6
GPRC5D
3,17
Como-APC-A
Daudi mẹ
Daudi cGPRC5D
GPRC5D
1,51
GPRC5D
99,5
Lớp kháng thể IgG28 chuột
GPRC5D-APC (dòng Gab6300, R&D System)

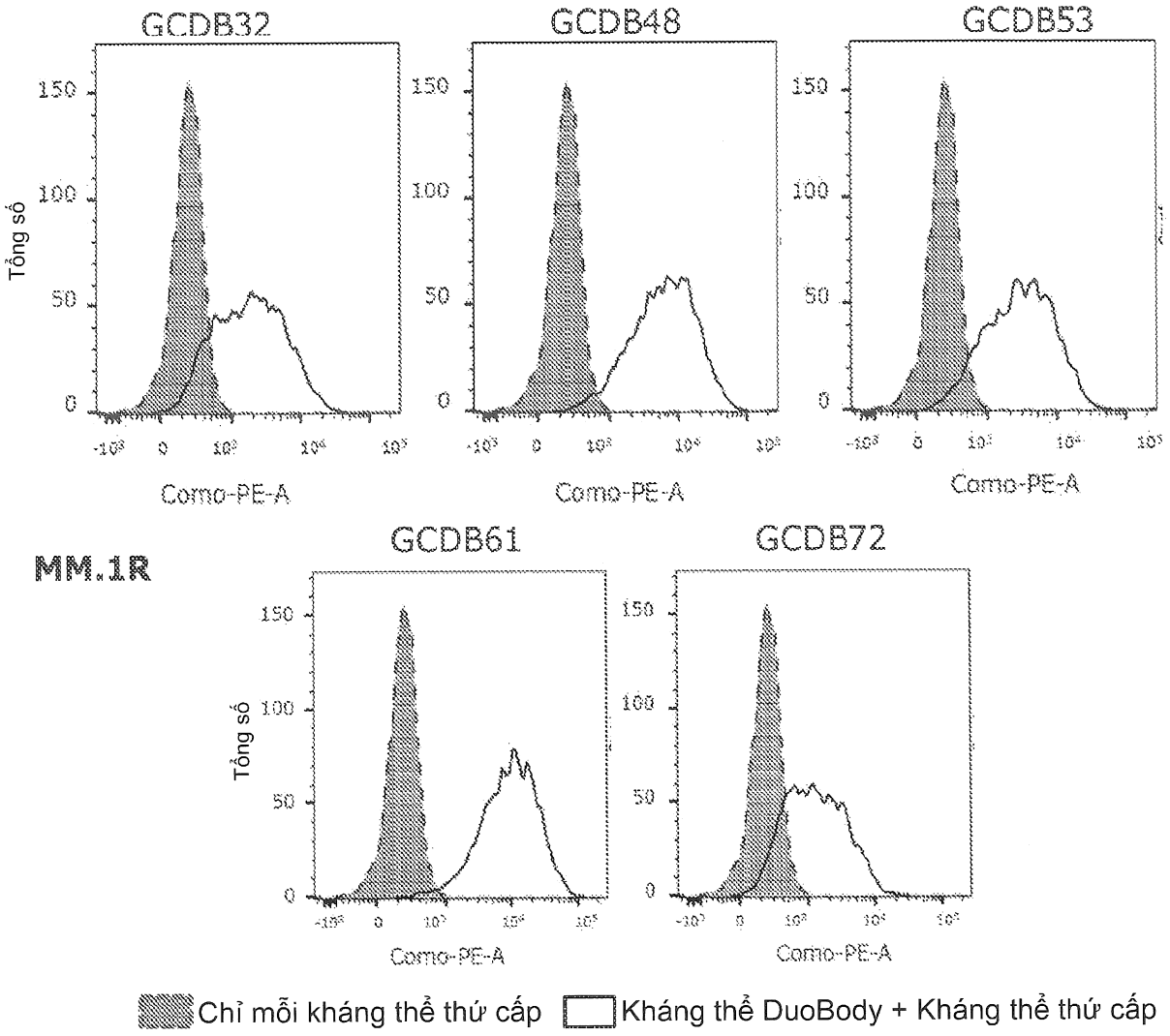
Hình 14A (tiếp tục)



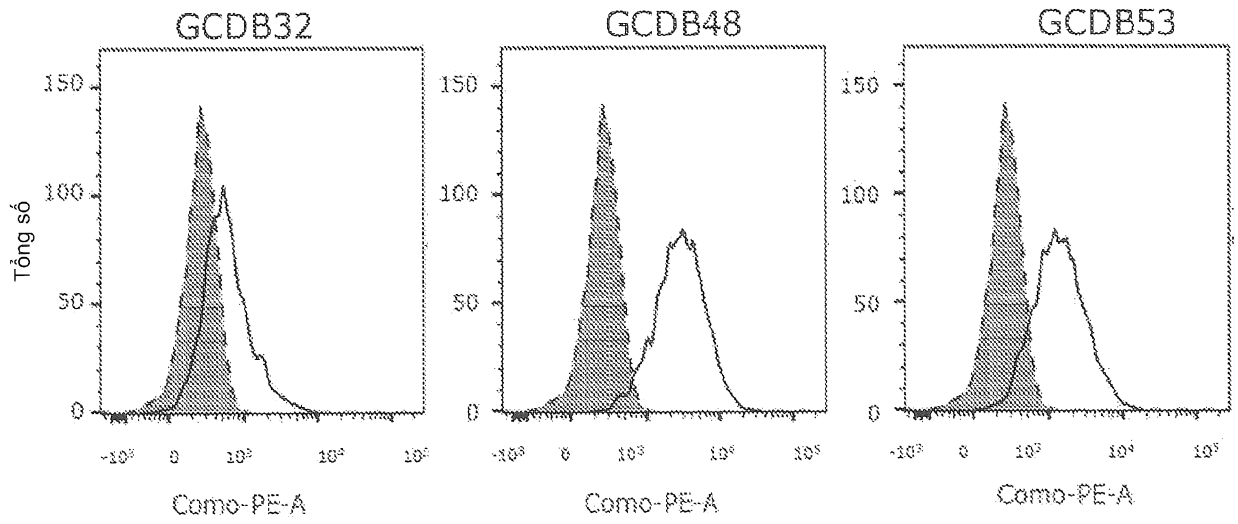
Hình 14B

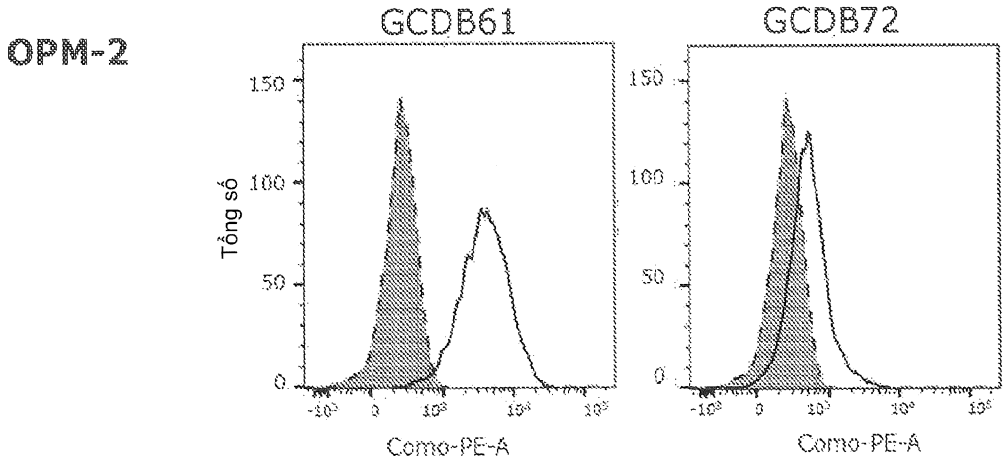

GCDB32
GCDB48
GCDB53
GCDB61
GCDB72
JIM3-Luc
(F11)
Tổng số
Como-PE-A
Chỉ mỗi kháng thể thứ cấp
Kháng thể DuoBody + Kháng thể thứ cấp

Hình 14B (tiếp tục)



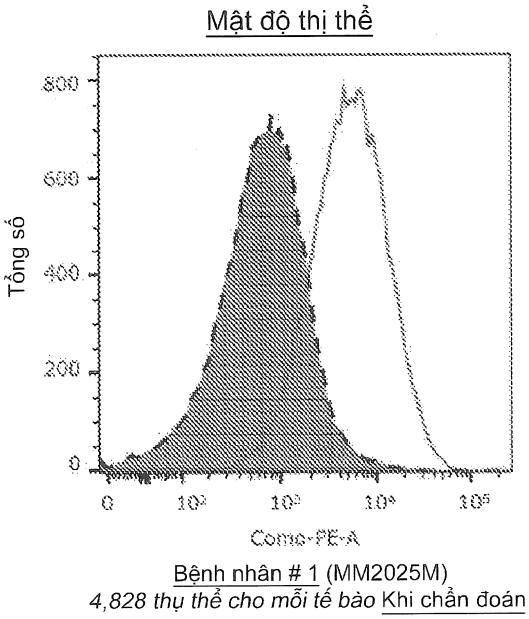
Hình 14B (tiếp tục)

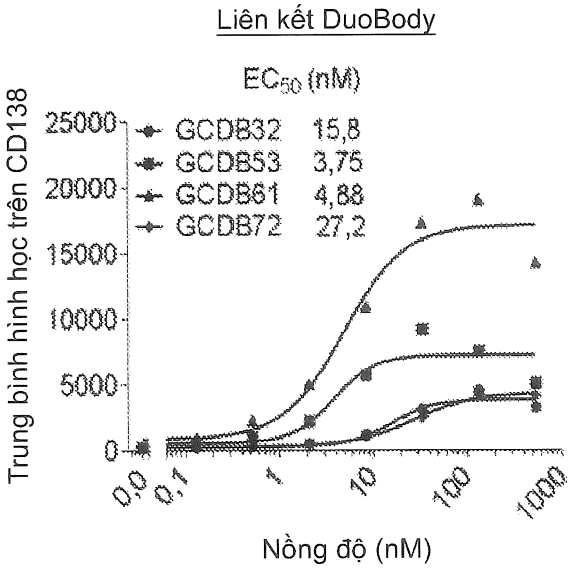


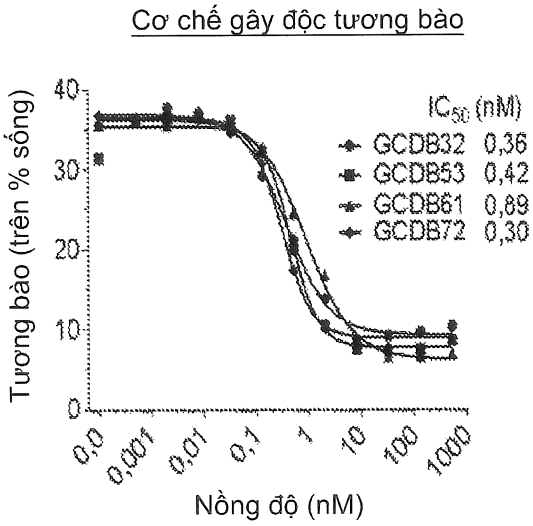


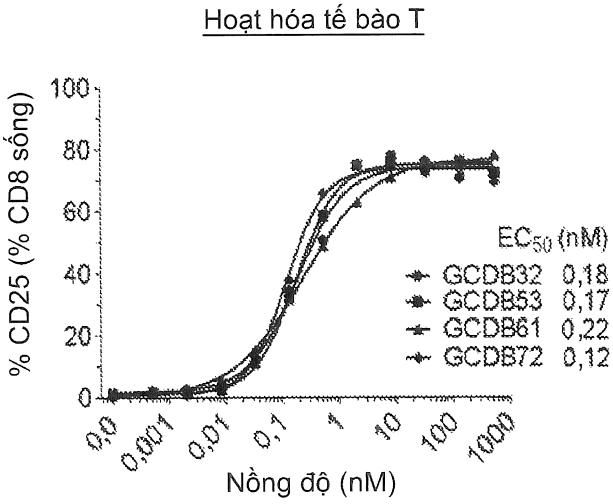
Chỉ mỗi kháng thể thứ cấp Kháng thể DuoBody + Kháng thể thứ cấp

Hình 15A

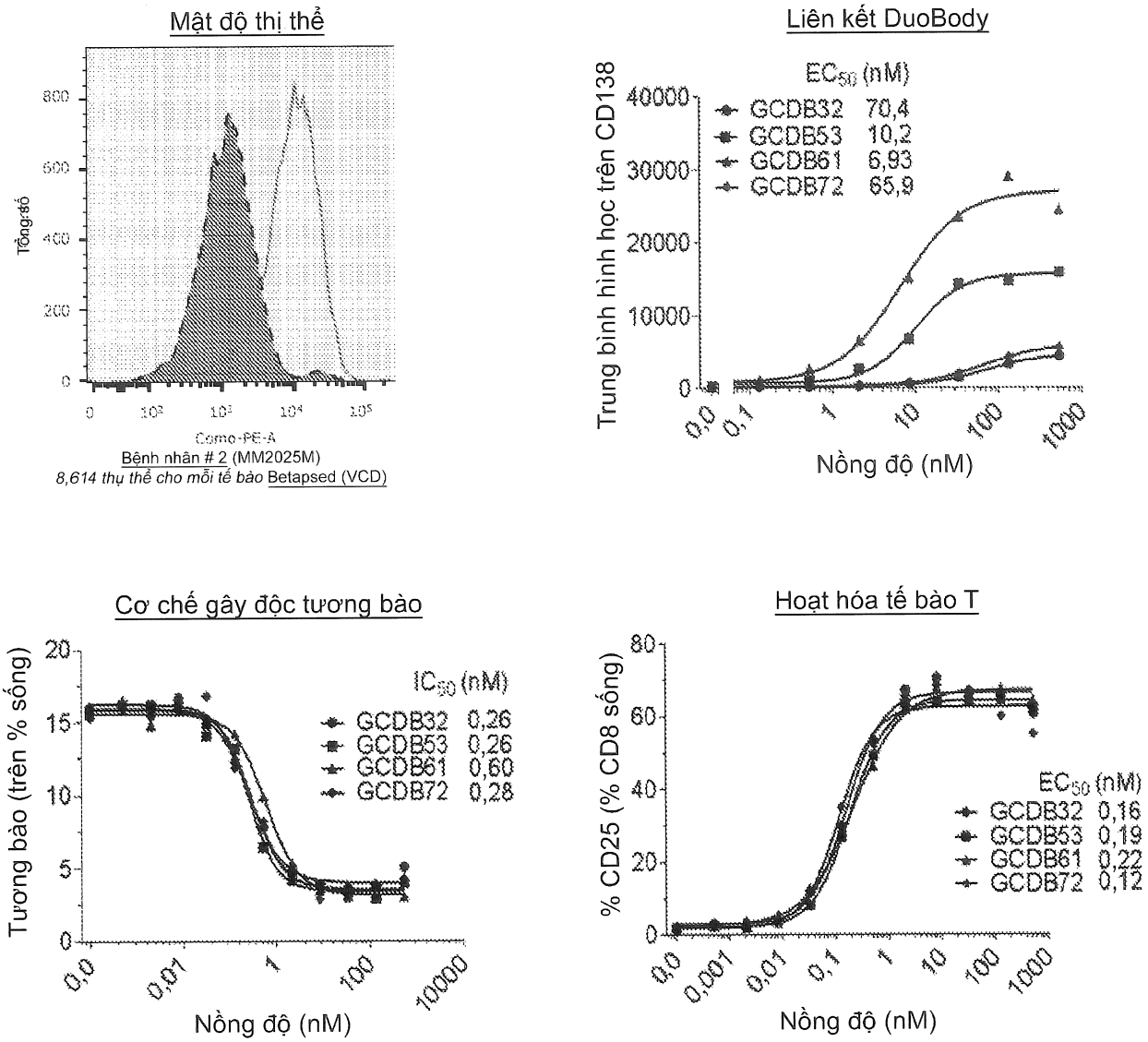

Mật độ thị thể
Tổng số
800
600
400
200
0
0
10²
10³
10⁴
10⁵
Comc-PE-A
Bệnh nhân # 1 (MM2025M)
4,828 thụ thể cho mỗi tế bào Khi chẩn đoán


Liên kết DuoBody
EC50 (nM)
GCDB32 15,8
GCDB53 3,75
GCDB61 4,88
GCDB72 27,2
Trung bình hình học trên CD138
25000
20000
15000
10000
5000
0
0,0
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ (nM)

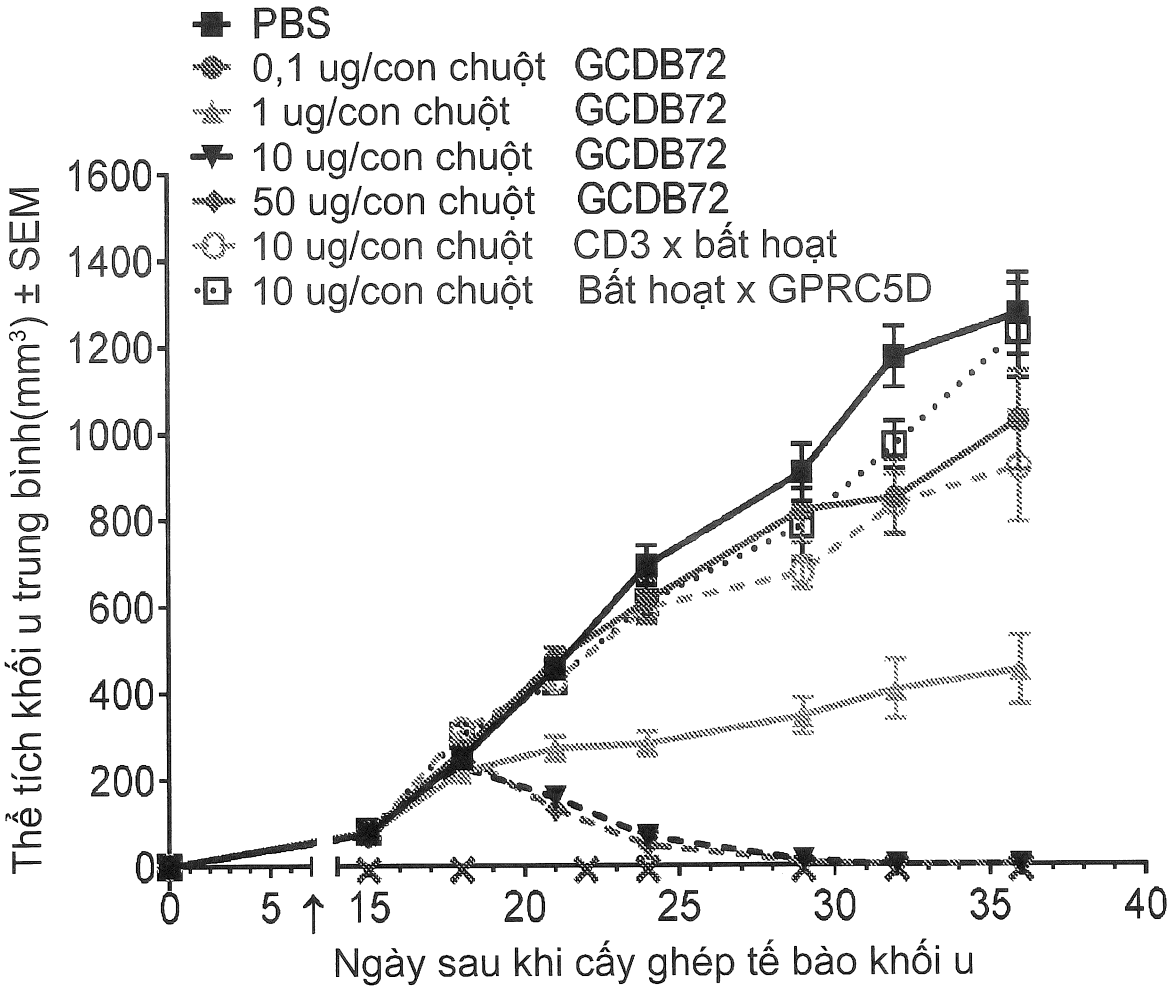

Cơ chế gây độc tương bào
IC50 (nM)
GCDB32 0,36
GCDB53 0,42
GCDB61 0,89
GCDB72 0,30
Tương bào (trên % sống)
40
30
20
10
0
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ (nM)


Hoạt hóa tế bào T
EC50 (nM)
GCDB32 0,18
GCDB53 0,17
GCDB61 0,22
GCDB72 0,12
% CD25 (% CD8 sống)
100
80
60
40
20
0
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ (nM)

Hình 15B

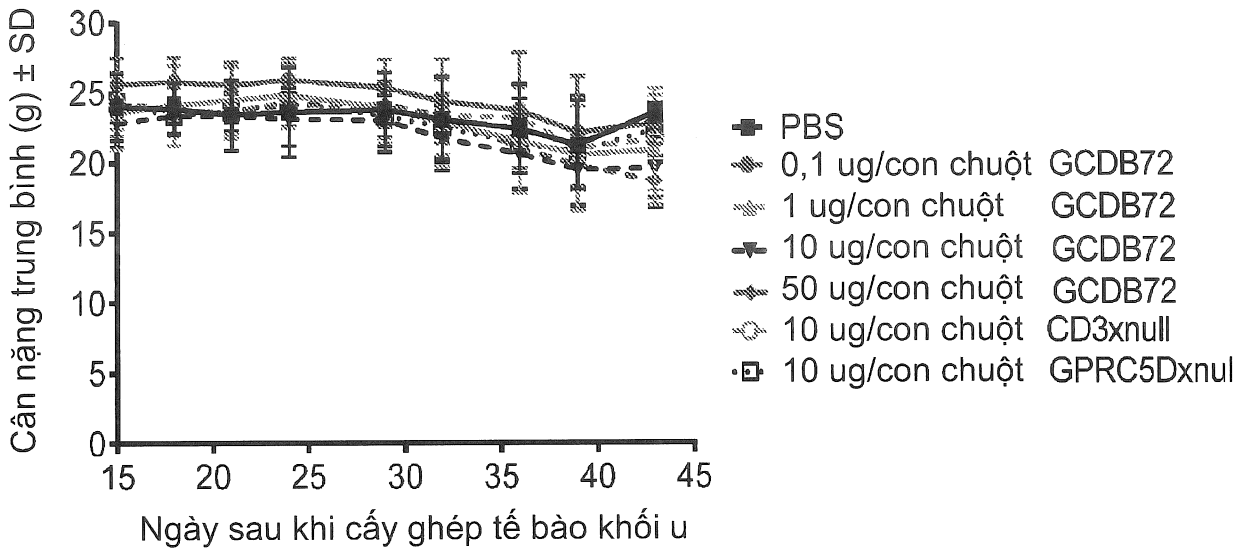

Mật độ thị thể
Tổng số
800
600
400
200
0
0
10^2
10^3
10^4
10^5
Como-PE-A
Bệnh nhân # 2 (MM2025M)
8,614 thụ thể cho mỗi tế bào Betapsed (VCD)
Liên kết DuoBody
Trung bình hình học trên CD138
EC_{50} (nM)
GCDB32 70,4
GCDB53 10,2
GCDB61 6,93
GCDB72 65,9
40000
30000
20000
10000
0
0,0
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ (nM)
Cơ chế gây độc tương bào
Tương bào (trên % sống)
IC_{50} (nM)
GCDB32 0,26
GCDB53 0,26
GCDB61 0,60
GCDB72 0,28
20
15
10
5
0
0,0
0,01
1
100
10000
Nồng độ (nM)
Hoạt hóa tế bào T
% CD25 (% CD8 sống)
EC_{50} (nM)
GCDB32 0,16
GCDB53 0,19
GCDB61 0,22
GCDB72 0,12
80
60
40
20
0
0,0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ (nM)

Hình 16



× *Ngày điều trị*
↑ *Cấy ghép PBMC*

Hình 17


Cân nặng trung bình (g) ± SD
30
25
20
15
10
5
0
15
20
25
30
35
40
45
Ngày sau khi cấy ghép tế bào khối u
PBS
0,1 ug/con chuột GCDB72
1 ug/con chuột GCDB72
10 ug/con chuột GCDB72
50 ug/con chuột GCDB72
10 ug/con chuột CD3xnull
10 ug/con chuột GPRC5Dxnul

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JANSSEN PHARMACEUTICA NV

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG GPRC5D VÀ KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP GPRC5D X CD3

<130> PRD3422WOPCT

<140>
<141>

<150> 62/364,811
<151> 2016-07-20

<160> 100

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 1
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Asn Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 3
Ser Tyr Phe Ile Gly
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 4
Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 5
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 6
Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Ser Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 7
Ile Ile Tyr Pro Gly Lys Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 8
Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 9
Glu Ser Arg Trp Arg Gly Tyr Lys Leu Asp
1 5 10

<210> 10
<211> 13
<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 10
Ala Ala Phe Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp
1 5 10

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 11
Val Tyr Ser Phe Gly Gly Arg His Lys Ala Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 12
Val Ala Leu Arg Val Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 13
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 14

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 15
Lys Ala Ser Gln Asn Val Ala Thr His Val Gly
1 5 10

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 16
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 17
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 18
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 19
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 20
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 21
Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 22
<211> 345
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 22
Met Tyr Lys Asp Cys Ile Glu Ser Thr Gly Asp Tyr Phe Leu Leu Cys
1 5 10 15

Asp Ala Glu Gly Pro Trp Gly Ile Ile Leu Glu Ser Leu Ala Ile Leu
20 25 30

Gly Ile Val Val Thr Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Phe Leu Met
35 40 45

Arg Lys Ile Gln Asp Cys Ser Gln Trp Asn Val Leu Pro Thr Gln Leu
50 55 60

Leu Phe Leu Leu Ser Val Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Phe Ala Phe
65 70 75 80

Ile Ile Glu Leu Asn Gln Gln Thr Ala Pro Val Arg Tyr Phe Leu Phe
85 90 95

Gly Val Leu Phe Ala Leu Cys Phe Ser Cys Leu Leu Ala His Ala Ser
100 105 110

Asn Leu Val Lys Leu Val Arg Gly Cys Val Ser Phe Ser Trp Thr Thr
115 120 125

Ile Leu Cys Ile Ala Ile Gly Cys Ser Leu Leu Gln Ile Ile Ile Ala
130 135 140

Thr Glu Tyr Val Thr Leu Ile Met Thr Arg Gly Met Met Phe Val Asn
145 150 155 160

Met Thr Pro Cys Gln Leu Asn Val Asp Phe Val Val Leu Leu Val Tyr
165 170 175

Val Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Phe Phe Val Ser Lys Ala Thr Phe
180 185 190

Cys Gly Pro Cys Glu Asn Trp Lys Gln His Gly Arg Leu Ile Phe Ile

195 200 205

Thr Val Leu Phe Ser Ile Ile Ile Trp Val Val Trp Ile Ser Met Leu
210 215 220

Leu Arg Gly Asn Pro Gln Phe Gln Arg Gln Pro Gln Trp Asp Asp Pro
225 230 235 240

Val Val Cys Ile Ala Leu Val Thr Asn Ala Trp Val Phe Leu Leu Leu
245 250 255

Tyr Ile Val Pro Glu Leu Cys Ile Leu Tyr Arg Ser Cys Arg Gln Glu
260 265 270

Cys Pro Leu Gln Gly Asn Ala Cys Pro Val Thr Ala Tyr Gln His Ser
275 280 285

Phe Gln Val Glu Asn Gln Glu Leu Ser Arg Ala Arg Asp Ser Asp Gly
290 295 300

Ala Glu Glu Asp Val Ala Leu Thr Ser Tyr Gly Thr Pro Ile Gln Pro
305 310 315 320

Gln Thr Val Asp Pro Thr Gln Glu Cys Phe Ile Pro Gln Ala Lys Leu
325 330 335

Ser Pro Gln Gln Asp Ala Gly Gly Val
340 345

<210> 23
<211> 344
<212> PRT
<213> Khỉ đuôi dài Macaca fascicularis

<400> 23
Met Tyr Lys Asp Cys Ile Glu Ser Thr Gly Asp Tyr Phe Leu Pro Cys
1 5 10 15

Asp Ser Glu Gly Pro Trp Gly Ile Val Leu Glu Ser Leu Ala Ile Leu
20 25 30

Gly Ile Val Val Thr Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Phe Leu Met
35 40 45

Arg Lys Ile Gln Asp Cys Ser Gln Trp Asn Val Leu Pro Thr Gln Leu
50 55 60

Leu Phe Leu Leu Ser Val Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Phe Ala Phe
65 70 75 80

Ile Ile Gln Leu Asn Gln Gln Thr Ala Pro Val Arg Tyr Phe Leu Phe
85 90 95

Gly Val Leu Phe Ala Leu Cys Phe Ser Cys Leu Leu Ala His Ala Ser
100 105 110

Asn Leu Val Lys Leu Val Arg Gly Arg Val Ser Phe Ser Trp Thr Thr
115 120 125

Ile Leu Cys Ile Ala Ile Gly Cys Ser Leu Leu Gln Val Ile Ile Ala
130 135 140

Ile Glu Tyr Val Thr Leu Ile Met Thr Arg Gly Met Met Phe Val His
145 150 155 160

Met Thr Pro Tyr Gln Leu Asn Val Asp Phe Val Val Leu Leu Val Tyr

165 170 175

Val Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Phe Phe Val Ser Lys Ala Thr Phe
180 185 190

Cys Gly Pro Cys Glu Asn Trp Lys Gln His Gly Arg Leu Ile Phe Ile
195 200 205

Thr Val Leu Phe Ser Ile Ile Ile Trp Val Val Trp Ile Ser Met Leu
210 215 220

Leu Arg Gly Asn Pro Gln Phe Gln Arg Gln Pro Gln Trp Asp Asp Pro
225 230 235 240

Val Val Cys Ile Ala Leu Val Thr Asn Ala Trp Val Phe Leu Leu Leu
245 250 255

Tyr Ile Val Pro Glu Leu Cys Ile Leu Tyr Arg Ser Cys Arg Gln Glu
260 265 270

Cys Pro Ser Gln Gly His Ala Cys Pro Val Thr Ala Tyr Gln Arg Ser
275 280 285

Phe Gln Val Glu Asn Gln Glu Leu Ser Arg Ala Arg Asp Ser Asp Gly
290 295 300

Ala Glu Glu Asp Val Ala Leu Thr Ser Phe Gly Thr Pro Ile Gln Pro
305 310 315 320

Gln Thr Val Asp Pro Thr Gln Glu Cys Phe Ile Pro Arg Ala Lys Leu
325 330 335

Ser Pro Gln Gln Asp Ala Gly Val
340

<210> 24
<211> 344
<212> PRT
<213> Mus sp. (chuột)

<400> 24
Met Tyr Glu Asp Cys Val Lys Ser Thr Glu Asp Tyr Tyr Leu Phe Cys
1 5 10 15

Asp Asn Glu Gly Pro Trp Ala Ile Val Leu Glu Ser Leu Ala Val Ile
20 25 30

Gly Ile Val Val Thr Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Phe Leu Met
35 40 45

Arg Lys Val Gln Asp Cys Ser Gln Trp Asn Val Leu Pro Thr Gln Phe
50 55 60

Leu Phe Leu Leu Ala Val Leu Gly Leu Phe Gly Leu Thr Phe Ala Phe
65 70 75 80

Ile Ile Gln Leu Asn His Gln Thr Ala Pro Val Arg Tyr Phe Leu Phe
85 90 95

Gly Val Leu Phe Ala Ile Cys Phe Ser Cys Leu Leu Ala His Ala Ser
100 105 110

Asn Leu Val Lys Leu Val Arg Gly Arg Val Ser Phe Cys Trp Thr Thr
115 120 125

Ile Leu Phe Ile Ala Ile Gly Val Ser Leu Leu Gln Thr Ile Ile Ala

130 135 140

Ile Glu Tyr Val Thr Leu Ile Met Thr Arg Gly Leu Met Phe Glu His
145 150 155 160

Met Thr Pro Tyr Gln Leu Asn Val Asp Phe Val Cys Leu Leu Ile Tyr
165 170 175

Val Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Phe Phe Val Ser Lys Ala Thr Phe
180 185 190

Cys Gly Pro Cys Glu Asn Trp Lys Gln His Gly Arg Leu Ile Phe Ala
195 200 205

Thr Val Leu Val Ser Ile Ile Ile Trp Val Val Trp Ile Ser Met Leu
210 215 220

Leu Arg Gly Asn Pro Gln Leu Gln Arg Gln Pro His Trp Asp Asp Ala
225 230 235 240

Val Ile Cys Ile Gly Leu Val Thr Asn Ala Trp Val Phe Leu Leu Ile
245 250 255

Tyr Ile Ile Pro Glu Leu Ser Ile Leu Tyr Arg Ser Cys Arg Gln Glu
260 265 270

Cys Pro Thr Gln Gly Asn Val Cys Gln Val Pro Val Tyr Gln Arg Ser
275 280 285

Phe Arg Met Asp Thr Gln Glu Pro Thr Arg Ala Arg Asp Ser Asp Gly
290 295 300

Ala Gln Glu Asp Val Ala Leu Thr Ala Tyr Gly Thr Pro Ile Gln Leu
305 310 315 320

Gln Ser Ala Asp Pro Ser Arg Glu Tyr Leu Ile Pro Ser Ala Thr Leu
325 330 335

Ser Pro Gln Gln Asp Ala Gly Leu
340

<210> 25
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 26
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 26
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 27
<211> 5

<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 27
Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 28
Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 29
Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 30
Ala Ala Trp Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 31
Glu Ser Arg Tyr Arg Gly Tyr Lys Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 32
Glu Ser Arg Val Arg Gly Tyr Lys Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 33
Glu Ser Arg Gly Arg Gly Tyr Lys Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 34
Glu Ser Arg Ala Arg Gly Tyr Lys Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 35
Glu Ser Arg Phe Arg Gly Tyr Lys Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 36
Ser Tyr Tyr Ile Gly
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 37
Ser Tyr Val Ile Gly
1 5

<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 38
Ser Tyr Gly Ile Gly
1 5

<210> 39
<211> 5
<212> PRT

<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 39
Ser Tyr Ala Ile Gly
1 5

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 40
Ile Ile Tyr Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 41
Ile Ile Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 42
Ile Ile Tyr Pro Gly Glu Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 43
Ile Ile Tyr Pro Gly Tyr Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 44
Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Ala Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 45
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 45
Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Lys Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 46
Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 47
Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Tyr Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 48
Ala Ala Tyr Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 49
Ala Ala Val Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 50
Ala Ala Gly Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 51
Ala Ala Ala Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 52
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 52
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ser Arg Trp Arg Gly Tyr Lys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 53
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Ser Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Ala Ala Phe Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 54
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Phe Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Tyr Ser Phe Gly Gly Arg His Lys Ala Leu Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 55
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 55
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 Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 56
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 56
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 57
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 57
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

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

<210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 58
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Ala Thr His
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 59
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 59
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 60
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 60
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 61
Asp Tyr Gly Met His
1 5

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 62
Gly Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 63
Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 64
Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn
1 5 10

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 65
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 66
<211> 10

<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 66
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asn Val His
1 5 10

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 67
Ala Ile Lys Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 68
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 69
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 69
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Asn Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 70
Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn
1 5 10

<210> 71
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 71
Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
1 5 10 15

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 72
Arg Ala Glu Ser Gly Pro Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 73
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 73

Ile Gly Phe Tyr Gly Arg Ser Phe Arg Ile Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 74
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 74
Val Asp Arg Ser Phe Gly Arg Ser Arg Tyr Thr Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 75
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 75
Val Ser Arg Arg Phe Lys Arg Phe Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 76
Ser Asn Phe Leu Pro Val Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 77
Asp Gly Ile Arg Leu Arg Phe Ala Tyr
1 5

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 78
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 79
Thr Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 80
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 81
Gln Gln Tyr Phe Arg Ala Pro Ile Thr
1 5

<210> 82
<211> 119

<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 82
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Lys Arg Ala Glu Ser Gly Pro Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 83
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 83
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 84
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 84
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Gly Phe Tyr Gly Arg Ser Phe Arg Ile Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 85
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 85
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Tyr Ser Phe Gly Gly Arg His Lys Ala Leu Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 86
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 86
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

<210> 87
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 87
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Asn Ile Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

85 90 95

Ala Arg Val Ser Arg Arg Phe Lys Arg Phe Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 88
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 88
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 Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 89
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 89
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Ser Asn Phe Leu Pro Val Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 90
<211> 705
<212> ADN
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 90
atgcgggtgc tggcccagct gctgggactg ctgctgctgt gcttccctgg cgccagatgc 60

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga ccgggtgacc 120

atcacctgca aggccagcca gaacgtggcc acccacgtgg gctggtacca gcagaagccc 180

ggcaaggccc ccaagcggct gatctacagc gccagctacc ggtacagcgg cgtgcccagc 240

cggttcagcg gcagcggcag cggcaccgag ttcaccctga ccatcagcaa cctgcagccc 300

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaaccggt acccctacac cttcggccag 360

ggcaccaagc tggagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 420

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttga 705

<210> 91
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 91
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 92
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 92
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

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

Lys

<210> 93
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 93
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Lys Ser
20 25 30

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

Tyr Thr Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Arg Ala Pro Ile
85 90 95

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

<210> 94
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 94
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Ala Thr His
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 95
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 95
Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Lys Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 96
<211> 1395
<212> ADN
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 96
atggcctggg tctggaccct gctgttcctg atggccgctg cccagagcat ccaggcccag 60

gtgcagctgg tgcagagcgg cgccgaggtg aagaagcccg gcgccagcgt gaaggtgagc 120

tgcaaggcca gcggctacag cttcaccggc tacaccatga actgggtgcg gcaggccccc 180

ggccagggcc tggagtggat gggcctgatc aacccctaca acagcgacac caactacgcc 240

cagaagctgc agggccgggt gaccatgacc accgacacca gcaccagcac cgcctacatg 300

gagctgcgga gcctgcggag cgacgacacc gccgtgtact actgcgcccg ggtggccctg 360

cgggtggccc tggactactg gggccagggc accctggtga ccgtgagcag cgcctccacc 420

aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 480

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaaaac ctacacctgc 660

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 720

cccccatgcc caccatgccc agcacctgag gccgccgggg gaccatcagt cttcctgttc 780

cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 840

gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 900

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 960

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020

tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080

cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260

ttcttcctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1320

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1380

tctctgggta aatga 1395

<210> 97
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 97
Ala Ala Phe Asp Phe Gly Arg Arg Ala Val Arg Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 98
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens (Người thông minh)

<400> 98
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 99
<211> 452
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit
tổng hợp"

<400> 99
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

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

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
195 200 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
210 215 220

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

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

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

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

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Gly Lys
    450

<210> 100
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit
      tổng hợp"

<400> 100
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1   5   10   15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
            20   25   30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
        35   40   45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
    50   55   60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65   70   75   80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
                85   90   95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
            100   105   110

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

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
180 185 190

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

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215