



(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)



1-0040941

(51)⁸ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2018-01077

(22) 16/08/2016

(86) PCT/US2016/047146 16/08/2016

(87) WO/2017/031104 23/02/2017

(30) 62/206,246 17/08/2015 US

(45) 26/08/2024 437

(43) 25/09/2018 366A

(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)

800/850 Ridgeview Drive, Horsham, Pennsylvania 19044, United States of America

(72) PILLARISSETTI, Kodandaram (US); BALDWIN, Eric Thomas (US); POWERS, Gordon D. (US); CARDOSO, Rosa Maria Fernandes (US); ATTAR, Ricardo (US); GAUDET, Francois (CA).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) KHÁNG THỂ TÁI TỔ HỢP, KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU ĐÔI BCMA X CD3 TÁI TỔ HỢP, TẾ BÀO TÁI TỔ HỢP BIỂU HIỆN KHÁNG THỂ, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA. Sáng chế cũng đề cập đến các polynucleotit liên quan có khả năng mã hóa các kháng thể đặc hiệu BCMA hoặc các mảnh gắn kháng nguyên được đề xuất, các tế bào biểu hiện các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên được đề xuất, các vector liên quan, các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên được gắn nhãn để có thể phát hiện được. Sáng chế cũng đề cập đến tế bào tái tổ hợp biểu hiện kháng thể, dược phẩm và phương pháp tạo ra kháng thể.

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 miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên trưởng thành tế bào B (BCMA), các kháng thể đa hiệu liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA 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

Kháng nguyên trưởng thành tế bào B, còn được gọi là BCMA, CD269, TNFRSF17 (UniProt Q02223), là một thành viên của siêu họ thụ thể hoại tử khối u, ưu tiên được biểu hiện trong các tương bào biệt hóa [Laabi và cộng sự (1992) EMBO J 11(11):3897-3904; Madry và cộng sự, (1998) J Immunol (Tập chí Miễn dịch học) 10(11):1693-1702]. BCMA là protein xuyên màng loại I không glycosyl hóa, có liên quan đến sự trưởng thành, tăng trưởng và sống sót của tế bào B. BCMA là thụ thể của hai phối tử của siêu họ TNF: APRIL (phối tử cảm ứng tăng sinh, CD256, TNFSF13), là phối tử ái lực cao với BCMA và yếu tố hoạt hóa tế bào B BAFF (THANK, BlyS, chất kích thích lympho bào B, TALL-1 và zTNF4), là phối tử ái lực thấp với BCMA. APRIL và BAFF thể hiện sự đồng dạng về cấu trúc và tính đặc hiệu liên kết với thụ thể chồng lấp nhưng khác nhau. Yếu tố điều hòa âm tính TACI còn liên kết với cả BAFF và APRIL. Tọa độ liên kết của APRIL và BAFF với BCMA và/hoặc TACI giúp hoạt hóa yếu tố phiên mã NF- κ B và làm tăng biểu hiện của các thành viên trong họ Bcl-2 hỗ trợ sự sống (ví dụ Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) và làm giảm biểu hiện của các yếu tố hỗ trợ sự chết theo chương trình của tế bào (ví dụ, Bid, Bad, Bik, Bim, v.v.), từ đó làm ức chế sự chết theo chương trình của tế bào và tăng cường sự sống sót của tế bào. Tác dụng kết hợp này làm tăng sự biệt hóa, sự tăng sinh, sự sống sót của tế bào B và sự sản xuất kháng thể (như được đánh giá trong Rickert RC và cộng sự, Immunol Rev ((Tập chí miễn dịch học) (2011) 244 (1): 115-133). Theo sự phát hiện này, BCMA còn hỗ trợ sự tăng trưởng và sống sót của các tế bào B người ác tính, bao gồm các tế bào

bệnh đa u tủy (MM). Novak và cộng sự phát hiện thấy các dòng tế bào MM và các tế bào MM mới được phân lập biểu hiện BCMA và protein TACI trên bề mặt tế bào của chúng và có các biểu hiện biến đổi protein BAFF-R trên bề mặt tế bào của chúng (Novak và cộng sự, (2004) Blood (Máu) 103(2):689-694).

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.

Việc sử dụng các kháng thể kháng BCMA để điều trị bệnh ung thư hạch bạch huyết và đa u tủy được đề cập trong WO2002066516 và WO2010104949. Các kháng thể kháng BCMA được mô tả trong, ví dụ, Gras M-P. và cộng sự, Int Immunol. (Tạp chí miễn dịch học quốc tế) 7 (1995) 1093-1106, WO200124811, và WO200124812. Tuy nhiên, mặc dù đã có các liệu pháp chống ung thư được sử dụng để xử lý BCMA, BAFF-R và TACI, tức là, các thụ thể tế bào B thuộc siêu họ thụ thể TNF, và các phối tử của chúng BAFF và APRIL, vẫn cần có thêm các tùy chọn điều trị cho các tình trạng y khoa này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA 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 BCMA được đề xuất và các mảnh gắn kháng nguyên, các tế bào biểu hiện các kháng thể và các mảnh gắn kháng nguyên được đề xuất, các vector 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 BCMA 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 BCMA; 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 BCMA hay không và do đó có thể phải tuân thủ theo điều trị bằng thuốc kháng ung thư đặc hiệu BCMA, như các kháng thể đa hiệu kháng BCMA 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 BCMA 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 BCMA x CD3 được đề xuất, các tế bào biểu hiện các kháng thể được đề xuất, các vector 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 BCMA 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 BCMA; 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 BCMA hay không và do đó có thể phải tuân thủ theo điều trị bằng thuốc kháng ung thư đặc hiệu BCMA, như các kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 được mô tả trong bản mô tả này.

Các kháng thể đặc hiệu BCMA

Bản mô tả này mô tả các kháng thể tái tổ hợp và các mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đối với BCMA. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên liên kết với BCMA người. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên liên kết với BCMA người và BCMA khỉ đuôi dài. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên liên kết với một epitope bao gồm một hoặc nhiều đơn phân từ miền ngoại bào (ECD) BCMA. Kháng thể đặc hiệu BCMA hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể ức chế liên kết APRIL bằng IC₅₀ bằng ít nhất 5,9 nM như được đo bằng ELISA.

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

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

(Các SEQ ID NO cho mỗi trình tự được cho trong dấu ngoặc)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
BCMB69	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB117	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB123	SSSYFWG (7)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB128	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB129	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB176	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB177	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSLKS (8)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)

Một số phương án đề xuất kháng thể đặc hiệu BCMA, 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 BCMA, 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.

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 (FcγR) 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 FcγR hoặc các yếu tố bổ thể. Sự liên kết của IgG với FcγR hoạt hóa (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa và FcγRIIIb) và ức chế (FcγRIIb) hoặc thành phần thứ nhất của bổ thể (C1q) phụ thuộc vào các góc 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 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb và/hoặc FcγRIIIa giảm, (c) ái lực với FcγRI giảm (d) ái lực với FcγRIIa giảm (e) ái lực với FcγRIIb giảm, (f) ái lực với FcγRIIIb giảm hoặc (g) ái lực với FcγRIIIa 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 IgG4, kháng thể bao gồm các thay thế K409R, 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.

Trong một số phương án, các kháng thể được mô tả có khả năng ức chế liên kết APRIL bằng IC₅₀ bằng 5,9 nM như được đo bằng phương pháp ELISA.

Trong một số phương án, các kháng thể được mô tả liên kết với các dòng tế bào đa u tủy dương tính với BCMA.

Ngoài các kháng thể đặc hiệu BCMA 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 vector chứa các polynucleotit được mô tả, các tế bào biểu hiện các kháng thể đặc hiệu BCMA 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 bọc 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 BCMA

Bản mô tả cũng bọc lộ các phương pháp sử dụng các kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA-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 BCMA. Ngoài ra, các kháng thể này hoặc các mảnh gắn kháng nguyên có thể hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt của BCMA trong mẫu sinh học, như mẫu máu hoặc huyết thanh; trong việc định lượng BCMA trong mẫu sinh học, như mẫu máu hoặc huyết thanh; trong việc chẩn đoán bệnh ung thư biểu hiện BCMA; 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 BCMA ở đối tượng. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện BCMA 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 BCMA, như điều trị bằng kháng thể đa hiệu kháng BCMA và CD3. Ngoài ra, có thể thực hiện các phương pháp này sau khi đối tượng được điều trị ung thư biểu hiện BCMA, như điều trị bằng kháng thể đa hiệu kháng BCMA và CD3 được mô tả trong bản mô tả này.

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

Các phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư biểu hiện BCMA trong đối tượng cũng liên quan đến bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với một hoặc nhiều kháng thể đặc hiệu BCMA hoặc mảnh gắn kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này; tuy nhiên, các phương pháp cũng bao gồm bước định lượng BCMA có mặt trong mẫu; bước so sánh lượng BCMA có trong mẫu với một mẫu đã biết hoặc mẫu tham chiếu; và bước

xác định liệu mức BCMA của đối tượng có rơi vào trong phạm vi các mức BCMA 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 BCMA 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 BCMA hoặc mảnh gắn kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này; bước định lượng BCMA có trong mẫu liên kết với kháng thể, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của kháng thể; bước so sánh lượng BCMA có trong mẫu với một mẫu đã biết hoặc mẫu tham chiếu hoặc lượng BCMA trong mẫu tương tự lấy từ đối tượng từ trước; và bước xác định liệu mức BCMA 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 BCMA 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 BCMA 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 những người có trình độ 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), peroxydaza ở cây cải ngựa, phosphataza kiềm và beta-galactosidaza, hoặc poly-histidin hoặc các nhãn tương tự đã biết trong ngành.

Kit kháng thể đặc hiệu BCMA

Bản mô tả cũng mô tả các kit bao gồm các kháng thể đặc hiệu BCMA được bọc 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 BCMA hoặc các mảnh gắn kháng nguyên được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc các phương pháp khác mà những người có trình độ 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 BCMA 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 BCMA x CD3

Việc chuyển hướng lympho bào T đến các tế bào MM biểu hiện BCMA 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. CD3 ϵ người được mô tả trong UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Kháng thể kháng CD3 ϵ được mô tả trong ngành là SP34 (Yang SJ, The Journal of Immunology (Tập 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. (Tập 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 miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể SP34 được đề cập trong US8236308 (WO2007042261).

Các loại kháng thể đặc hiệu đôi kháng CD3 và BCMA được đề cập trong WO2007117600, WO2009132058, WO2012066058, WO2012143498, WO2013072406, WO2013072415, và WO2014122144. Tuy nhiên, hiện không có dữ liệu mô tả sự tiến triển trong phạm vi lâm sàng.

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

Trong một số phương án, nhánh đặc hiệu BCMA của kháng thể đa hiệu liên kết với BCMA người và BCMA khỉ đuôi dài. Trong một số phương án, nhánh đặc hiệu BCMA của các kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 hoặc các mảnh gắn kháng nguyên liên kết với miền ngoại bào của BCMA người. Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu BCMA 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 BCMA x CD3 tái tổ hợp 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 BCMA, 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 BCMA x CD3 của nó. Trong phương án khác, tế bào tái tổ hợp biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi được đề xuất. Trong một số phương án, nhánh liên kết BCMA (hay “nhánh đặc hiệu BCMA”) của kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 được dẫn xuất từ kháng thể BCMA 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 BCMA của các kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 hoặc các mảnh gắn kháng nguyên là IgG, hoặc các dẫn xuất của nó. Trong một số phương án, các kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 được mô tả có khả năng liên kết với BCMA bằng hằng số phân ly ít nhất bằng 0,18 nM như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt. Trong một số phương án, kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 được mô tả không phải là chất chủ vận. Trong một số phương án, kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 được mô tả không làm thay đổi việc hoạt hóa NF- κ B ở các nồng độ dưới 10 nM.

Trong một số phương án, nhánh liên kết CD3 (hay “nhánh đặc hiệu CD3”) của kháng thể đa hiệu BCMA 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 BCMA x CD3 bao gồm một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ được chọn từ Bảng 2.

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

Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ
CD3B219 (SEQ ID NO:55): EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK NSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNF GNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	CD3B219 (SEQ ID NO:56): QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTG AVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLPSPSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
CDR 1: TYAMN (SEQ ID NO: 59)	CDR 1: RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 62)
CDR 2: RIRSKYNNYATYYAASVKG (SEQ ID NO: 60)	CDR 2: GTNKRAP (SEQ ID NO: 63)
CDR 3: HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 61)	CDR 3: ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 64)

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 (FcγR) 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 FcγR hoặc các yếu tố bổ thể. Sự liên kết của IgG với FcγR hoạt hóa (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa và FcγRIIIb) và ức chế (FcγRIIb) 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 Fcγ RI, Fcγ RIIa, Fcγ RIIb, Fcγ RIIB và/hoặc Fcγ RIIa giảm, (c) ái lực với FcγRI giảm (d) ái lực với FcγRIIa giảm (e) ái lực với FcγRIIb giảm, (f) ái lực với Fcγ RIIB giảm hoặc (g) ái lực với FcγRIIIa 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 BCMA x CD3 được mô tả, sáng chế cũng đề xuất các trình tự polynucleotit có khả năng mã hóa các kháng thể đa hiệu BCMA 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 BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi. Bản mô tả còn cung cấp các vector chứa các polynucleotit được mô tả, các tế bào biểu hiện các kháng thể đa hiệu BCMA 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 vector 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 BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi bằng cách nuôi cấy tế bào.

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

Các phương pháp sử dụng kháng thể đa hiệu BCMA x CD3

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

Các phương pháp điều trị bệnh ung thư biểu hiện BCMA ở đối tượng cần điều trị bao gồm bước cho đối tượng sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đa hiệu BCMA 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 BCMA 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 BCMA 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 BCMA bằng cách cho sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi để chuyển hướng tế bào T đến tế bào ung thư.

Kit kháng thể đặc hiệu BCMA x CD3

Bản mô tả này trình bày các kit bao gồm các kháng thể đa hiệu BCMA 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 BCMA x CD3 được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc các phương pháp khác mà những người có trình độ 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 BCMA. 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 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 $\pm 10\%$ 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 BCMA về căn bản được tách khỏi các kháng thể liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác ngoài BCMA). Tuy nhiên, kháng thể phân lập liên kết đặc hiệu với một epitope, thể đồng dạng hoặc biến thể của BCMA có thể có phản ứng chéo với các kháng nguyên liên quan khác, ví dụ từ các loài khác (như đồng đẳng loài của BCMA).

“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 BCMA 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.

“Vecto” 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 BCMA 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 dimer chuỗi nặng, monome hoặc dimer chuỗi nhẹ, dimer 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 disulfua 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 “epitope” có nghĩa là yếu tố quyết định của protein có khả năng liên kết đặc hiệu với một kháng thể. Các epitope thường bao gồm các nhóm phân tử bề mặt như các axit amin hoặc các mạch bên đường và thường có các đặc trưng cấu trúc ba chiều đặc hiệu, cũng như các đặc trưng điện tích đặc hiệu. Các epitope cấu hình và không cấu hình khác biệt ở chỗ liên kết với epitope cấu hình bị mất khi có mặt dung môi làm biến chất, còn liên kết với epitope không cấu hình thì không bị mất. Epitope có thể bao gồm các gốc axit amin liên quan trực tiếp đến liên kết và các gốc axit amin khác không liên quan trực tiếp đến liên kết, như các gốc axit amin được ngăn chặn hiệu quả hoặc được bao phủ bởi peptit liên kết kháng nguyên đặc hiệu (nói cách khác, gốc axit amin nằm trong tầm ảnh hưởng của peptit liên kết kháng nguyên đặc hiệu).

“Liên kết đặc hiệu” hay “liên kết miễn dịch 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, một kháng thể liên kết với một kháng nguyên cùng nguồn gốc bằng K_d nhỏ hơn khoảng 1×10^{-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 BCMA) có nghĩa là kháng thể đã nêu liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đã nêu.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “ K_D ” chỉ hằng số cân bằng phân ly của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

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 “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 thực 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 “mẫu đã biết” có thể là một dung dịch có lượng hoặc nồng độ BCMA 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 BCMA được pha loãng trong đó. Mẫu đã biết trong bản mô tả này có thể bao gồm BCMA được phân lập từ đối tượng, protein BCMA được tinh chế hoặc tái tổ hợp hoặc một giá trị nồng độ BCMA liên quan đến tình trạng bệnh.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “BCMA” đề cập đến kháng nguyên trưởng thành tế bào B người, còn được gọi là BCMA, CD269, và TNFRSF17 (UniProt Q02223), là một thành viên của siêu họ thụ thể hoại tử khối u, ưu tiên được biểu hiện trong các tương bào biệt hóa. Miền ngoại bào của BCMA người bao gồm, theo UniProt, các axit amin 1 - 54 (hoặc 5-51). Trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể kháng BCMA, kháng thể kháng lại BCMA” đề cập đến kháng thể liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA.

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 CD3 γ (SwissProt P09693), chuỗi CD3 δ (SwissProt P04234), hai chuỗi CD3 ϵ (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 BCMA 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 BCMA 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 kháng thể tương tự có thể liên kết với đích phù hợp bất kỳ ngoài phần của BCMA. 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 BCMA chỉ báo đối tượng mắc bệnh 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 BCMA 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 BCMA, nhưng có mức BCMA chưa xác định.

Thuật ngữ “tiến triển”, được sử dụng trong ngữ cảnh bệnh ung thư biểu hiện BCMA 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 BCMA 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 BCMA 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 BCMA và mảnh gắn kháng nguyên

Bản mô tả này mô tả các kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc các mảnh gắn kháng nguyên liên kết đặc hiệu với BCMA. 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 BCMA 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 multimer 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 BCMA 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 tái tổ hợp và các mảnh gắn kháng nguyên liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA hoặc các mảnh gắn kháng nguyên là IgG người hoặc các dẫn xuất của nó. Mặc dù các kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA, 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 BCMA, 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 BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 4, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 5, và CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 6. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 4, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 5, CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 6, CDR1 của chuỗi nhẹ có SEQ ID

NO: 7, CDR2 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 8, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 9. Kháng thể đặc hiệu BCMA hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể bao gồm các trình tự khung của người. Kháng thể đặc hiệu BCMA hoặc mảnh gắn kháng nguyên này có thể ức chế liên kết APRIL bằng IC_{50} bằng ít nhất 5,9 nM. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 10. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 10 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 11. 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 BCMA.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 4, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 5, và CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 6. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 7, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 5, CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 6, CDR1 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 24, CDR2 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 25, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 26. Kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 57. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 57 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 28. 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 BCMA.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 7, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 5, và CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 6. Trong một số

phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 7, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 5, CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 6, CDR1 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 24, CDR2 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 25, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 26. Kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 34. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 34 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 28. 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 BCMA.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 4, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 5, và CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 19. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 4, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 5, CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 19, CDR1 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 24, CDR2 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 25, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 26. Kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 39. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 39 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 28. 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 BCMA.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 4, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 8, và CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 6. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 4, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 8, CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 6, CDR1 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 24, CDR2 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 25, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 26. Kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 40. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 40 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 28. 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 BCMA.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 13, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 5, và CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 19. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 13, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 5, CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 19, CDR1 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 24, CDR2 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 25, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 26. Kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 58. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 58 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 28. 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 BCMA.

Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 13, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 8, và CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 19. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 13, CDR2 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 8, CDR3 của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 19, CDR1 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 24, CDR2 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 25, và CDR3 của chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 26. Kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 43. Trong một số phương án, các kháng thể đặc hiệu BCMA và các mảnh gắn kháng nguyên bao gồm miền biến đổi của chuỗi nặng gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 43 và miền biến đổi chuỗi nhẹ gần như đồng dạng, hoặc đồng nhất với SEQ ID NO: 28. 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 BCMA.

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 (SEQ ID NO 74).

SEQ ID NO 74

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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 (SEQ ID NO 73).

SEQ	ID	NO	73
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT			
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG			
PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQF			
NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS			
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI			
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV			
MHEALHNHYTQKSLSLGLK			

Các kháng thể đặc hiệu được xác định theo CDR và/hoặc trình tự miền biến đổi được trình bày ở các đoạn trên có thể bao gồm các vùng Fc IgG này.

Bản mô tả này cũng bộc lộ các polynucleotit tổng hợp phân lập mã hóa các kháng thể hoặc các mảnh gắn kháng nguyên liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA. 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.

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 BCMA 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 thực thi miễn dịch) của các kháng thể đặc hiệu BCMA 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 một vị trí đã cho được ghi là, ví dụ, K409R có nghĩa là Lysin ở vị trí 409 được thay thế bằng Arginin; 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 gốc axit amin bất kỳ. Do đó, Arginin thay thế cho Lysin ở vị trí 409 được ký hiệu là: K409R, hay gốc axit amin bất kỳ thay thế cho Lysin ở vị trí 409 được ký hiệu là K409X. Trường hợp Lysin ở vị trí 409 bị làm mất được biểu thị bằng ký hiệu K409*. 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 polyhistidin, 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 gốc 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 gốc 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 BCMA 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.

Các kháng thể đặc hiệu BCMA hoặc mảnh gắn kháng nguyên trong bản mô tả này có các giá trị IC_{50} ít nhất bằng 5,9 nM đối với liên kết APRIL. IC_{50} của các kháng thể đặc hiệu BCMA hoặc mảnh gắn kháng nguyên trong bản mô tả này có thể được xác định bằng nhiều phương pháp đã biết trong ngành, như phương pháp dựa trên xét nghiệm ELISA hoặc phương pháp đo và đếm tế bào theo dòng (FACS). Các xét nghiệm để đo IC_{50} bằng ELISA có BCMA trên đĩa, có và không có kháng thể đặc hiệu BCMA, và APRIL với các nồng độ khác nhau được sử dụng. Kháng thể BCMA ức chế liên kết của APRIL với BCMA là “ức chế APRIL như được đo bằng ELISA”.

Bản mô tả cũng cung cấp các vector chứa các polynucleotit được mô tả tại đây. Các vector có thể là vector biểu hiện. Do đó, các vector 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. Vector 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 vector 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 plasmid, 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 vector vi khuẩn, nấm men và vi rút khác.

Các vector 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 vector biểu hiện, cụ thể là các vector 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 vector 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 vector 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 thymidin kinaza của vi rút herpes đơn dạng. Trong một phương án, trình tự mã hóa kháng thể đặc hiệu BCMA 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 tetracyclin, vùng khởi động cảm ứng doxyxycyclin, các vùng khởi động chứa một hoặc nhiều yếu tố đáp ứng kích thích interferon (ISRE) như 2',5-oligoadenylate synthetaza của kinaza protein R, các gen Mx, ADAR1, v.v.

Trong bản mô tả này, các vector có thể chứa một hoặc nhiều vị trí tiếp nhận ribô thể bên trong (Internal Ribosome Entry Site, IRES). Việc các vector 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 vector 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 vector 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 vector 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 neomycin, gen kháng hygromycin, gen kháng kanamycin, gen kháng tetracyclin, gen kháng penicillin, gen kháng puromycin, gen kháng blastomycin), 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-methylpurin (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 vector 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 vector để tạo các tế bào sản xuất kháng thể đặc hiệu BCMA hoặc mảnh gắn kháng nguyên. Theo đó, sáng chế cung cấp phương án khác mô tả các tế bào chủ được biến nạp bằng các vector chứa trình tự axit nucleic mã hóa một kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với BCMA, 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 vector 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 BCMA 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 vector 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 bất cặp sai, hoặc kết hợp các phương pháp này.

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

Bản mô tả này cung cấp các kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA. 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 BCMA 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 BCMA-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 BCMA. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện BCMA

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 BCMA 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 thực thi miễn dịch của kháng thể đặc hiệu BCMA có thể được tăng cường hoặc làm bất hoạt bằng cách điều hòa Fc bằng các kỹ thuật được những người có trình độ 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 khỏi 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-fucosyltransferaza (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-acetylglucosaminyltransferaza III và golgi α -mannosidaza II hoặc chất ức chế alpha-mannosidaza 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 BCMA 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 BCMA

Bản mô tả cung cấp các phương pháp phát hiện BCMA 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 bước phát hiện BCMA trong mẫu sinh học bằng cách cho mẫu tiếp xúc với các kháng thể đặc hiệu BCMA bất kỳ, hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của nó mà được mô tả trong bản mô tả này.

Trong một số phương án, mẫu có thể được tiếp xúc với nhiều hơn một kháng thể đặc hiệu BCMA hoặc 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 BCMA thứ nhất hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, sau đó tiếp xúc với kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA 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 và các mảnh gắn kháng nguyên được gắn nhãn có thể hỗ trợ phát hiện BCMA 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 dietylenetriaminpentaaxetic (DTPA), peroxyđaza ở cây cải ngựa, phosphataza kiềm và beta-galactosidaza, poly-histidin (gắn nhãn HIS), thuốc nhuộm acridin, thuốc nhuộm xyanin, thuốc nhuộm flo, thuốc nhuộm oxazin, thuốc nhuộm phenanthridin, thuốc nhuộm rodamin, thuốc nhuộm Alexa Fluor®, v.v.

Các kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA 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 BCMA 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 BCMA.

BCMA có mặt ở mức có thể phát hiện trong các mẫu máu và huyết thanh. Theo đó, bản mô tả cung cấp các phương pháp phát hiện BCMA trong mẫu sinh học dẫn xuất từ máu, như mẫu huyết thanh, bằng cách cho mẫu tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó mà có liên kết đặc hiệu với BCMA. 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 BCMA 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 BCMA ở đối tượng. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện BCMA bao gồm các loại 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 BCMA trong mẫu sinh học như mẫu máu hay mẫu huyết thanh, đã mang lại khả năng chẩn đoán bệnh ung thư ở người hiến tặng 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 người hiến tặng 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 BCMA 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 BCMA 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 BCMA hay không bằng cách xác định lượng BCMA có trong mẫu sinh học lấy từ đối tượng; và bước so sánh lượng BCMA quan sát được với lượng BCMA trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu, trong đó sự chênh lệch giữa lượng BCMA trong mẫu lấy từ đối tượng và lượng BCMA trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu là chỉ báo cho biết đối tượng có đang mắc ung thư biểu hiện BCMA hay không. Trong phương án khác, có thể so sánh lượng BCMA quan sát được trong mẫu sinh học lấy từ đối tượng với các mức BCMA 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 BCMA 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 BCMA hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, như các kháng thể đặc hiệu BCMA được mô tả trong bản mô tả này. Mẫu được đánh giá về sự có mặt của BCMA 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 BCMA 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 BCMA sẽ bao gồm: bước cho mẫu sinh học của đối tượng tiếp xúc với kháng thể đặc hiệu BCMA, 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 BCMA có trong mẫu liên kết với kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, bước so sánh lượng BCMA có trong mẫu với một mẫu đã biết hoặc mẫu tham chiếu; và bước xác định liệu mức BCMA của đối tượng có rơi vào trong phạm vi các mức BCMA 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 BCMA, như các kháng thể đa hiệu BCMA 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 BCMA hay không bằng cách xác định lượng BCMA có trong mẫu máu hoặc huyết thanh lấy từ đối tượng; và bước so sánh lượng BCMA quan sát được với lượng BCMA trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu, trong đó sự chênh lệch giữa lượng BCMA trong mẫu lấy từ đối tượng và lượng BCMA trong mẫu đối chứng, hoặc mẫu tham chiếu là chỉ báo cho biết đối tượng có đang mắc ung thư biểu hiện BCMA 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 BCMA. 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 BCMA. 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 BCMA, khi lượng BCMA 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 BCMA. Trong một số phương án, trong đó mẫu đối chứng được lấy từ đối tượng không mắc bệnh ung thư biểu hiện BCMA, khi lượng BCMA 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 BCMA. 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 BCMA, khi lượng BCMA 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 BCMA. 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 BCMA, khi lượng BCMA 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 BCMA.

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

Có thể sử dụng các kết hợp khác nhau của các kháng thể đặc hiệu BCMA 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 BCMA bao gồm các loại ung thư hạch bạch huyết, như bệnh đa u tủy (MM).

Trong một số phương án, lượng BCMA 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 được chuẩn

hóa cho lượng BCMA trong mẫu sinh học lấy từ một đối tượng khỏe mạnh. Trong một số phương án, có thể so sánh mức BCMA quan sát được của đối tượng thử nghiệm với mức BCMA quan sát được trong các mẫu lấy từ các đối tượng đã biết là mắc bệnh ung thư biểu hiện BCMA. 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 BCMA. 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 BCMA. 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 BCMA.

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 BCMA ở đối tượng. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện BCMA 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 bệnh ung thư biểu hiện BCMA đang tiến triển, đang thoái lui hay trong tình trạng ổn định bằng cách xác định lượng BCMA có trong mẫu thử lấy từ đối tượng; và bước so sánh lượng BCMA quan sát được với lượng BCMA 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 BCMA 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 BCMA 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 BCMA. Ngược lại, mẫu thử có lượng BCMA 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 BCMA.

Theo đó, mẫu thử có lượng BCMA 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 BCMA. Trong một số phương án, lượng BCMA 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 BCMA 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 BCMA 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, đối tượng là con người.

Trong một số phương án, phương pháp theo dõi bệnh ung thư biểu hiện BCMA sẽ bao gồm: bước cho mẫu sinh học của đối tượng tiếp xúc với kháng thể đặc hiệu BCMA, 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 BCMA có trong mẫu, bước so sánh lượng BCMA có trong mẫu với lượng BCMA 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 BCMA của đối tượng có thay đổi theo thời gian hay không. Mẫu thử có lượng BCMA 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 BCMA 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 BCMA. Theo đó, mẫu thử có lượng BCMA 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 BCMA. Trong một số phương án, chỉ cần so sánh các mức BCMA của mẫu với mẫu đã biết hoặc mẫu tham chiếu, hoặc có thể so sánh thêm với các mức BCMA 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 BCMA, như các kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 như được mô tả trong bản mô tả này.

Trong các phương án khác nhau, lượng BCMA được xác định bằng cách cho mẫu tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu với BCMA, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Trong một số phương án, mẫu có thể được tiếp xúc với nhiều hơn một loại kháng thể liên kết đặc hiệu với BCMA, 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 BCMA thứ nhất hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, sau đó tiếp xúc với kháng thể liên kết đặc hiệu BCMA 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 BCMA bao gồm ung thư huyết học, như bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính (AML).

Trong một số phương án, lượng BCMA 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 BCMA

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

Kháng thể đặc hiệu BCMA hoặc mảnh gắn kháng nguyên được mô tả có thể có 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 mẫu đặc hiệu mô.

Các phương tiện xác định mức BCMA còn bao gồm, ví dụ, các dung dịch đệm hoặc các thuốc thử khác để sử dụng trong xét nghiệm xác định mức BCMA.

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 BCMA.

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 BCMA được mô tả trong bản mô tả này nhận diện được các tế bào biểu hiện BCMA trên bề mặt của chúng. Như đã lưu ý ở phần trên, biểu hiện BCMA có thể là chỉ báo của tế bào ung thư. Có thể nhằm 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 BCMA và với đích khác, như CD3. Thực hiện điều này bằng cách tạo một phân tử bao gồm vùng thứ nhất liên kết với BCMA 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 BCMA 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 BCMA và CD3. Trong các phương án ưu tiên, các kháng thể đa hiệu liên kết với BCMA và CD3 (“các kháng thể đa hiệu BCMA x CD3”) và các mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của chúng được cung cấp. Trong một số phương án, kháng thể đa hiệu BCMA 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 miễn dịch đặc hiệu với BCMA, và chuỗi nặng thứ hai (HC2)

và chuỗi nhẹ thứ hai (LC2) bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ hai liên kết miễn dịch đặc hiệu với CD3. Trong một số phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 là kháng thể đặc hiệu đôi bao gồm nhánh đặc hiệu BCMA chứa chuỗi nặng thứ nhất (HC1) và chuỗi nhẹ thứ nhất (LC1) bắt cặp để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết miễn dịch 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 miễn dịch đặc hiệu với BCMA. 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 BCMA của các kháng thể đa hiệu cung cấp trong bản mô tả này có thể được dẫn xuất từ các kháng thể đặc hiệu BCMA bất kỳ đã nêu ở phần trên. Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết BCMA này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với BCMA bao gồm CDR1, CDR2, và CDR3 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 BCMA này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với BCMA bao gồm CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nặng và CDR1, CDR2, và CDR3 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 BCMA này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với BCMA bao gồm CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nặng của dòng BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176, hoặc BCMB177. Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết BCMA này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với BCMA bao gồm CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nặng và CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nhẹ của dòng BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128,

BCMB129, BCMB176, hoặc BCMB177. Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết BCMA này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với BCMA 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 BCMA này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với BCMA 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 BCMA này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với BCMA bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của dòng BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176, hoặc BCMB177. Trong một số phương án mẫu về các nhánh liên kết BCMA này, vùng gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết với BCMA bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ của dòng BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176, hoặc BCMB177.

Bảng 3 cung cấp danh sách các kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 có một cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đặc hiệu đối với BCMA 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, mà đã được sử dụng để tạo phương án được mô tả.

Bảng 3:

Nhánh đặc hiệu BCMA = ID kháng thể	Nhánh đặc hiệu CD3 = ID kháng thể
BCMB69	CD3B219
BCMB117	CD3B219
BCMB123	CD3B219
BCMB128	CD3B219
BCMB129	CD3B219
BCMB176	CD3B219
BCMB177	CD3B219

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

Trong một số phương án, nhánh liên kết BCMA 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 BCMA 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 BCMA 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/lambd 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 5×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-9} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-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 các phương án khác về các kháng thể đặc hiệu đôi, nhánh liên kết CD3 bao gồm các trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nặng và CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nhẹ được nêu ở Bảng 2. Ví dụ, các trình tự CDR của chuỗi nặng và nhẹ của một số phương án về nhánh liên kết CD3 của các kháng thể đặc hiệu đôi được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm các trình tự axit amin sau: CDR1 chuỗi nặng, SEQ ID NO: 59; CDR2 chuỗi nặng: SEQ ID NO: 60; CDR3 chuỗi nặng, SEQ ID NO: 61; CDR1 chuỗi nhẹ, SEQ ID NO: 62; CDR2 chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 63; và CDR3 chuỗi nhẹ, SEQ ID NO: 64.

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 CD4⁺ 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 BCMA x CD3 có nhánh liên kết BCMA bao gồm chuỗi nặng của dòng kháng thể BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176, hoặc BCMB177. Một số phương án cung cấp kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 có nhánh liên kết BCMA bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của dòng kháng thể BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176, hoặc BCMB177. Một số phương án cung cấp kháng thể đặc hiệu đôi BCMA 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 BCMA 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 BCMA x CD3 có nhánh liên kết BCMA bao gồm chuỗi nặng của dòng kháng thể BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176, hoặc BCMB177 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 BCMA x CD3 có nhánh liên kết BCMA bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của dòng kháng thể BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176, hoặc BCMB177 và nhánh liên kết CD3 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của dòng kháng thể CD3B219.

Ví dụ về kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 được cung cấp trong Bảng 9.

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 dimer 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 (Biotechnol) 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 dimer 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 disulfua và sự phân ly-kết hợp các miền CH3. Các liên kết disulfua 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 disulfua 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 dimer hóa hơn là đồng dimer 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 BCMA và một epitope trên CD3.

Trong bản mô tả này, “đồng dime hóa” chỉ sự tương tác giữa hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 đồng nhất. Trong bản mô tả này, “đồng dime” chỉ kháng thể có hai chuỗi nặng có các trình tự axit amin CH3 đồng nhất.

Trong bản mô tả này, “dị dime 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 dime” 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 dime. 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 núp) 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 dime được tạo thành, là kết quả của tương tác ưu tiên của chuỗi nặng có “hole” (“lỗ”) với chuỗi nặng có “knob” (“đầu núp”). Ví dụ về các cặp thay thế CH3 tạo thành đầu núp 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 dime 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 dime 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 dimer đơn đặc hiệu và tạo thành kháng thể dị dimer đặc hiệu đôi từ hai kháng thể đồng dimer đơn đặc hiệu mẹ trong các điều kiện khử để cho phép isome hóa liên kết disulfua theo các phương pháp được mô tả trong 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 BCMA) 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 dimer; 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 disulfua; 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- mercaptoethylamin (2-MEA), dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE), glutathion, tris (2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), L-xystein và beta-mercaptoetanol, tốt nhất là chất khử được chọn từ nhóm bao gồm: 2-mercaptoethylamine, dithiothreitol và tris (2-carboxyethyl)phosphine. 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 dithiothreitol 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 BCMA x CD3 được mô tả, sáng chế cũng đề xuất các trình tự polynucleotit có khả năng mã hóa các kháng thể đa hiệu BCMA 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 BCMA 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 BCMA như được trình bày ở phần trên, ví dụ kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 đã nêu, có thể được dùng trong điều trị bệnh. Cụ thể, các kháng thể đặc hiệu đôi BCMA 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 được dụng. Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu là kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi BCMA x CD3 của nó. Trong một phương án, được phẩm đã nêu được dùng để điều trị bệnh ung thư biểu hiện BCMA, bao gồm (nhưng không giới hạn trong) các loại sau: Các bệnh ung thư tế bào B biểu hiện BCMA, như bệnh đa u tủy (MM); và các bệnh ung thư khác biểu hiện BCMA 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 BCMB69, BCMB117, BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB176, hoặc BCMB177 hoặc CD3B219. Một ví dụ về kháng thể đặc hiệu đôi hữu ích trong điều trị bệnh ung thư, như bệnh ung thư huyết học, bao gồm các loại bệnh ung thư cụ thể này, là BCMB72.

Các được phẩm 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 được dụng, có thể là chất trợ hoặc có hoạt tính sinh lý học. Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu là kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi BCMA x CD3 của nó. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang được 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, dextroza, 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) dextroza 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, anthraxyclin (thuốc chống u bướu), histamin dihydroclorua 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 đậm phosphat, dextroza, 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 thẩm 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 trợ, 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 cốm ngọt được dụng chứa các chất pha loãng trợ 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 thẩm 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 BCMA+ bằng cách cho bệnh nhân sử dụng kháng thể đa hiệu liên kết với BCMA đã nêu và có khả năng tuyển mộ tế bào T để tiêu diệt tế bào BCMA+ 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 BCMA x CD3 BCMB72 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 được phẩm 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 BCMA, bao gồm (nhưng không giới hạn trong) các loại sau: Các bệnh ung thư tế bào B biểu hiện BCMA, như bệnh đa u tủy (MM); và các bệnh ung thư khác biểu hiện BCMA chưa được xác định. Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu là kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi BCMA x CD3 của nó.

Theo đó, được phẩm 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 BCMA, bao gồm (nhưng không giới hạn trong) các loại sau: Các bệnh ung thư tế bào B biểu hiện BCMA, như bệnh đa u tủy cấp (MM); và các bệnh ung thư khác biểu hiện BCMA 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 BCMA, 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 đơn nhân máu ngoại vi (PBMC). Trong các phương án ưu tiên, kháng thể đa hiệu là kháng thể đa hiệu BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi BCMA x CD3 của nó. Trong một phương án ưu tiên, thuốc điều trị khác này là thuốc cytoxar, anthracyclin (thuốc chống u bướu), histamin dihydroclorua 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 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 BCMA x CD3 và các mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của chúng có thể hữu ích trong điều trị bệnh ung thư biểu hiện BCMA ở đối tượng cần điều trị. Trong một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện BCMA 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 BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi BCMA 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

dù, 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 dược phẩm 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 dược phẩm 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 $(\text{mg/kg}) \times 70$: 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 lường

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 idiotyp nhắm đích vùng gắn kháng nguyên BCMA 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, anthracyclin (thuốc chống u bướu), histamin dihydroclorua, 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 chứng rối loạn liên quan đến các tế bào biểu hiện BCMA ở đối tượng, 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 BCMA x CD3 được mô tả trong bản mô tả này, và điều trị bằng xạ trị cho đối tượng được cung cấp. 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 BCMA 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, radii, xesi-

137, iridi-192, amerixi-241, vàng-198, coban-57, đồng-67, tecneti-99, iodu-123, iodu-131, và indi-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 BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi BCMA 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 BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đa hiệu của nó, và tốt hơn là kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 như được mô tả trong tài liệu này, hoặc mảnh gắn kháng nguyên đặc hiệu đôi BCMA x CD3 của nó. Trong một phương án, sáng chế cung cấp kit sử dụng để chẩn đoán ung thư bao gồm một dụng cụ chứa kháng thể BCMA x CD3 đặc hiệu đôi, và một hoặc nhiều thuốc

thử để phát hiện sự liên kết của kháng thể với BCMA. 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 diethylentriaminpentaaxetic (DTPA), peroxydaza ở cây cải ngựa, phosphataza kiềm và beta-galactosidaza, hoặc poly-histidin hoặc các nhãn tương tự đã biết trong ngành.

Các phương án ví dụ về chủ đề được mô tả

Để mô tả rõ hơn và đầy đủ hơn chủ đề của bản mô tả, phần này liệt kê các phương án ví dụ về chủ đề được trình bày.

Các phương án được liệt kê:

1. Kháng thể tái tổ hợp, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA, trong đó kháng thể có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chuỗi nặng này bao gồm:

a. vùng xác định bổ sung chuỗi nặng 1 (CDR1) có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6;

b. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6;

c. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6;

d. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19;

e. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6;

f. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19;

g. CDR1 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, CDR2 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, và CDR3 chuỗi nặng có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19.

2. Kháng thể, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, theo phương án 1, trong đó kháng thể này còn bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 24, CDR2 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 25, và CDR3 chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26.

3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án 1, trong đó chuỗi nặng của kháng thể của (a) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27; chuỗi nặng của kháng thể của (b) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 57; chuỗi nặng của kháng thể của (f) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 34; chuỗi nặng của kháng thể của (k) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 39; chuỗi nặng của kháng thể của (l) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 40; chuỗi nặng của kháng thể của (m) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 58 hoặc chuỗi nặng của kháng thể của (n) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 43.

4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án 2 hoặc phương án 3, trong đó chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 28.

5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với miền ngoại bào của BCMA người.

6. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 5, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của người.

7. Mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 6, trong đó mảnh gắn kháng nguyên là mảnh Fab, mảnh Fab2, hoặc kháng thể chuỗi đơn.
8. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 7, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó ức chế sự tương tác giữa BCMA và APRIL.
9. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án 8, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên biểu hiện IC_{50} cho sự tương tác giữa BCMA và APRIL bằng khoảng 5,9 nM như đo được bằng phương pháp ELISA.
10. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 9, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó là IgG.
11. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 10 là lớp kháng thể IgG4.
12. Kháng thể theo phương án 11, trong đó IgG4 có thay thế S228P, thay thế L234A và thay thế L235A trong vùng Fc của nó.
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 của nó liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA người và phản ứng chéo với BCMA khi đuôi dài.
14. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 13, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với BCMA trên bề mặt của các tế bào u tủy người.
15. 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 với BCMA trên bề mặt của các tế bào đa u tủy người.
16. Tế bào tái tổ hợp biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 15.

17. Tế bào theo phương án 16, trong đó tế bào là tế bào lai.
18. Tế bào theo phương án 16, trong đó kháng thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp.
19. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 tái tổ hợp hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi BCMA x CD3 của nó 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 liên kết với LC1 và HC2 liên kết với LC2 và trong đó HC1 bao gồm SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, và SEQ ID NO: 61 và LC1 bao gồm SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, và SEQ ID NO: 64 để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết miễn dịch đặc hiệu với CD3 và trong đó HC2 bao gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, và SEQ ID NO: 6 a và LC2 bao gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, và SEQ ID NO: 26 để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ hai liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA.

20. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 tái tổ hợp hoặc mảnh của nó theo phương án 19 bao gồm HC1 có SEQ ID NO: 55, LC1 có SEQ ID NO: 56, HC2 có SEQ ID NO: 65, và LC2 bao gồm: a) SEQ ID NO: 66 hoặc b) SEQ ID NO: 76.
21. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 20, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi là IgG.
22. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án 19, phương án 20 hoặc phương án 21, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi là lớp kháng thể IgG4.
23. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án từ 19 đến 22, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi liên kết miễn dịch đặc

hiệu với BCMA người bằng ái lực tối thiểu bằng 0,22 nM được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt.

24. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo các phương án từ 19 đến 23, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi của nó liên kết với BCMA trên bề mặt của các tế bào u tủy người.

25. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo các phương án từ 19 đến 24, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi của nó liên kết với BCMA trên bề mặt của các tế bào đa u tủy người.

26. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án 19 đến 25, 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 0,37 nM.

27. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án từ 19 đến 26, 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 BCMA trong ống nghiệm với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 0,45 nM.

28. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án từ 19 đến 27, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi không phải là chất chủ vận BCMA.

29. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án từ 19 đến 28, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi không thay đổi sự hoạt hóa NF- κ B ở các nồng độ thấp hơn 10 nM.

30. Tế bào tái tổ hợp biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 19 đến 29.

31. Tế bào theo phương án 30, trong đó tế bào là tế bào lai.

32. Phương pháp điều trị đối tượng mắc bệnh ung thư, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 19 đến 29 trong một thời gian đủ để điều trị bệnh ung thư.

33. Phương pháp ức chế sự tăng trưởng hoặc tăng sinh tế bào ung thư, phương pháp này bao gồm bước cho sử dụng lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đặc hiệu đôi BCMA CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 19 đến 29 để ức chế sự tăng trưởng hoặc tăng sinh tế bào ung thư.
34. Phương pháp chuyển hướng tế bào T đến tế bào ung thư biểu hiện BCMA, phương pháp này bao gồm bước cho sử dụng lượng điều trị hữu hiệu kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 19 đến 29 để chuyển hướng tế bào T đến tế bào ung thư.
35. Phương pháp theo phương án 32, 33, hoặc 34, trong đó bệnh ung thư là bệnh ung thư huyết học.
36. Phương pháp theo phương án 35, trong đó bệnh ung thư huyết học là ung thư tế bào B biểu hiện BCMA.
37. Phương pháp theo phương án 36, trong đó bệnh ung thư tế bào B biểu hiện BCMA là đa u tủy.
38. Phương pháp theo phương án 32 còn bao gồm bước cho sử dụng tác nhân điều trị thứ hai.
39. Phương pháp theo phương án 38, trong đó tác nhân điều trị thứ hai là thuốc hóa trị liệu hoặc liệu pháp kháng ung thư nhắm đích.
40. Phương pháp theo phương án 39, trong đó thuốc hóa trị liệu là thuốc cytoxar, anthraxyclin (thuốc chống u bướu), histamin dihydroclorua, hoặc interleukin 2.
41. Dược phẩm bao gồm kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 19 đến 29 và chất mang được dùng.
42. Phương pháp tạo kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 19 đến 29 bằng cách nuôi cấy tế bào theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 30 đến 31.

43. Polynucleotit tổng hợp được phân lập mã hóa HC1, HC2, LC1 hoặc LC2 của kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 19 đến 29.

44. Kit bao gồm kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi như đã định nghĩa theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 19 đến 29 và/hoặc polynucleotit như đã định nghĩa theo điểm 44 và bao bì đóng gói.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1A và 1B. Vectơ được sử dụng để tạo dòng BCMA người (Hình 1A) và BCMA khi đuôi dài (Hình 1B).

Hình 2A-2D. Vị trí epitope BCMB69 và sự tương tác giữa BCMA và BCMB69 người. (Hình 2A) Tổng quan về vị trí epitope. BCMB69 liên kết với bề mặt lõm của BCMA (vùng màu đen). (Hình 2B) Sơ đồ tương tác cho thấy các điểm tiếp xúc trực tiếp giữa BCMA và BCMB69. Các đơn phân từ tất cả CDR ngoại trừ CDR-L1 tiếp xúc với BCMA. Các tương tác lực Van der Waals được trình bày bằng các đường đứt nét, các liên kết H là các đường liền nét với những mũi tên chỉ các liên kết H của khung và chỉ vào các nguyên tử của khung. Các đơn phân BCMA tiếp xúc với cả BCMB69 và APRIL có khung màu đen. Ngưỡng khoảng cách 4 Å được sử dụng để nhận dạng các đơn phân tiếp xúc (ngưỡng khoảng cách 3,5 Å cho các liên kết H). (Hình 2C và Hình 2D) Hình cận cảnh về các tương tác chính của BCMA với chuỗi nhẹ (Hình 2C) và chuỗi nặng (Hình 2D) của BCMB69. Các liên kết H được trình bày bằng các đường đứt nét với khoảng cách tính theo đơn vị Angstrom.

Hình 3. Các đơn phân epitope và paratope của BCMB69. Các đơn phân epitope và paratope được đóng khung, các vùng CDR được gạch dưới (định nghĩa Kabat), và các đơn phân BCMA không phải của người được in nghiêng đậm. Chỉ các trình tự Fab BCMB69 và BCMA ngoại bào là được minh họa.

Hình 4A và 4B. Các vùng va chạm giữa Fab BCMB69 và APRIL (Hình 4A) và Fab BCMB69 và BAFF (Hình 4B). Sự chồng lấp cấu trúc của phức BCMA/BCMB69 lên các phức BCMA/APRIL và BCMA/BAFF thể hiện các vùng va chạm giữa Fab và phối tử. Bề mặt tiếp xúc với dung môi của BCMA được thể hiện. Các phân tử Fab và phối tử lần lượt được thể hiện bằng hình màu xám và đen. Sự chồng lấp này là do sự chồng các nguyên tử C α của BCMA tương đương ở cả hai phức (RMSD là 0,9 Å cho phức APRIL và 1,2 Å cho BAFF).

Hình 5. Dữ liệu SPR về BCMB72 cho thấy rằng phân tử có liên kết với BCMA người, khi đuôi dài và chuột. K_D trung bình cho BCMA khi đuôi dài và chuột lần lượt gấp khoảng 36 lần và 402 lần so với BCMA người.

Hình 6. Xác định EC_{50} cho BCMB72 liên kết trên các dòng tế bào BCMA⁺. Các dòng tế bào được nhuộm cho BCMA sử dụng BCMB72. Cường độ huỳnh quang trung bình hình học của BCMB72 liên kết với các tế bào được trình bày. EC_{50} được nêu trong chú thích. Đạt được sự bão hòa ở nồng độ bằng khoảng 100 nM. Cường độ huỳnh quang trung bình được xem xét để thu các giá trị EC_{50} cho các tế bào U2932 (EC_{50} = 7,92 nM), MM1R (EC_{50} = 8,74 nM), H929 (EC_{50} = 14,7 nM), EJM (EC_{50} = 17,5 nM) và LP1 (EC_{50} = 22,3 nM). 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).

Hình 7. Đường cong đồ thị mức liên kết BCMB72 trong máu toàn phần. Máu toàn phần từ ba người hiến tặng bình thường được nhuộm với các kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng kháng BCMA hoặc BCMB72. Phân tích cổng chặn (gating) được thực hiện để nhận dạng lympho bào trong quần thể bạch cầu bằng dấu ấn đặc hiệu tế bào chuẩn. Cường độ nhuộm cho một người hiến tặng đại diện được trình bày trong các ô, trong đó đường liền nét màu đen là các kháng thể quan tâm và đường đứt nét nền màu xám là lớp kháng thể tương ứng. Không quan sát được biểu hiện BMCA nào trên các lympho bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt hoặc các DC tương bào ở ba người hiến tặng bình thường. BCMB72 biểu hiện sự liên kết với các tế bào T CD3⁺ ở cả ba người

hiển tặng với cường độ khác nhau giữa những người hiến tặng. BCMB72 không liên kết với các loại tế bào khác được thử nghiệm trong xét nghiệm này.

Hình 8A-8E. Sự hoạt hóa tế bào T phụ thuộc BCMB72 với sự có mặt của nhiều dòng tế bào MM. Các tế bào H929 (Hình 9A), MM.1R (Hình 9B), RPMI 8226 (Hình 9C), U266 (Hình 9D) và Mv4-11 (Hình 9E) được xử lý bằng các kháng thể chỉ định khi có mặt các tế bào T từ sáu người hiến tặng bình thường (giá trị trung bình $\pm$ SEM của người hiến tặng được trình bày) và chất ức chế Fc (2 mg/mL) trong 48 giờ. Các giá trị EC_{50} được biểu thị trên biểu đồ. Phân tích thống kê: Ngoài sự hội tụ của mô hình, độ rộng của khoảng tin cậy 95% về $LogEC_{50}$ được xem xét để đánh giá tính phù hợp. (Khoảng tin cậy về $LogEC_{50}$ được sử dụng vì nó cân đối; các khoảng tin cậy về EC_{50} thì không). Khoảng nhỏ hơn ± 2 (hoặc tổng độ rộng khoảng tin cậy 95% nhỏ hơn 4) được xem là phù hợp.

Hình 9. Tổng hợp các giá trị hoạt hóa tế bào T tối đa và EC_{50} từ hai thí nghiệm độc lập sử dụng các tế bào T từ nhiều người hiến tặng bình thường. Các giá trị của từng người hiến tặng và giá trị trung bình của những người hiến tặng được trình bày cho mỗi dòng tế bào và cho mỗi thí nghiệm. Không có dữ liệu = không thử nghiệm; không áp dụng = phần mềm không thể tạo đường cong; ~ giá trị = số gần đúng dựa trên ngoại suy mô hình.

Hình 10A-10E. Cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc BCMB72 qua trung gian tế bào T của nhiều dòng tế bào đa u tủy. Các tế bào H929 (Hình 11A), MM.1R (Hình 11B), RPMI 8226 (Hình 11C), U266 (Hình 11D) và Mv4-11 (Hình 11E) được xử lý bằng kháng thể với nồng độ chỉ định khi có mặt các tế bào T từ sáu người hiến tặng bình thường (giá trị trung bình $\pm$ SEM của người hiến tặng được trình bày) và chất ức chế Fc (2 mg/mL) trong 48 giờ. Các giá trị EC_{50} được biểu thị trên đồ thị. Phân tích thống kê: Ngoài sự hội tụ của mô hình, độ rộng của khoảng tin cậy 95% về $LogEC_{50}$ được xem xét để đánh giá tính phù hợp. (Khoảng tin cậy về $LogEC_{50}$ được sử dụng vì nó cân đối; các khoảng tin cậy về EC_{50} thì không). Khoảng nhỏ hơn ± 2 (hoặc tổng độ rộng khoảng tin cậy 95% nhỏ hơn 4) được xem là phù hợp.

Hình 11. Tổng hợp các giá trị ly giải tối đa và EC_{50} từ hai thí nghiệm độc lập sử dụng các tế bào T từ nhiều người hiến tặng bình thường. Các giá trị của từng người hiến tặng và giá trị trung bình của những người hiến tặng được trình bày cho mỗi dòng tế bào và cho mỗi thí nghiệm. Không có dữ liệu = không thử nghiệm; không áp dụng = phần mềm không thể tạo đường cong; ~ giá trị = số gần đúng dựa trên ngoại suy mô hình.

Hình 12. Cơ chế gây độc tế bào và sự hoạt hóa tế bào T ở các tế bào H929. Các kháng thể đặc hiệu đôi BCMAxCD3 (các phân tử đột biến của BCMB72) được thử nghiệm trong xét nghiệm về cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T. Dòng tế bào dương tính với BCMA (H929) được ủ với các nồng độ kháng thể khác nhau trong 48 giờ với sự có mặt tế bào T người ngoại sinh từ những người hiến tặng bình thường (ID người hiến tặng: M5763 và M6576). Sau 48 giờ ủ, sự tiêu diệt tế bào được đo bằng phương pháp đo và đếm tế bào theo dòng (FACS) và được báo cáo theo % gây độc tế bào trong Hình 12A. Hình 12B trình bày sự hoạt hóa tế bào T, được đánh giá theo sự tăng biểu hiện CD25 trên bề mặt tế bào T. Nói chung, các điểm dữ liệu được căn chỉnh chặt chẽ theo đường cong phù hợp được tạo và có ít thay đổi giữa người hiến tặng tế bào T và các nghiên cứu lặp lại.

Hình 13. Tổng hợp các giá trị EC_{50} của việc phóng thích cytokin qua trung gian BCMB72. Các lớp bề mặt tế bào RPMI 8226 từ các thí nghiệm về cơ chế gây độc tế bào (xem Ví dụ 12, Hình 8) được thu thập và phân tích cho sáu mức cytokin khác nhau bằng xét nghiệm đa thành phần dựa trên MSD. Các kháng thể BCMB72 (BCMA x CD3) và các kháng thể đối chứng (BCMA x bất hoạt và bất hoạt x CD3) được sử dụng với những nồng độ khác nhau.

Hình 14A và 14B. Xét nghiệm về cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc BCMB72 qua trung gian tế bào T được thực hiện bằng cách sử dụng dòng tế bào H929 dương tính với BCMA. Các tế bào được xử lý bằng BCMB72 ở các nồng độ khác nhau khi có mặt các tế bào T từ nhiều người hiến tặng bình thường (tổng cộng ba người hiến tặng M7197, M5137 và M6457 được trình bày đại diện) và chất ức chế Fc (2 mg/mL) trong 48 giờ. Tỷ lệ tế bào thực thi /tế bào đích (E/T) là 5:1. Hình 14A biểu thị khả

năng gây độc tế bào và Hình 14B bên phải biểu thị các đường cong hoạt hóa tế bào T tương tự giữa các lô BCMB72 khác nhau.

Hình 15. Các tế bào H929 được xử lý bằng các kháng thể BCMB72 (BCMA x CD3) và các kháng thể đối chứng (BCMA x bất hoạt và bất hoạt x CD3) trong 30 phút với các liều được biểu thị trên trục X ở đồ thị phía trên và tổng lượng protein được phân tích bằng phương pháp phân tích Simple Western theo quy trình chuẩn theo hướng dẫn sử dụng ProteinSimple. Dữ liệu được chuẩn hóa bằng cách sử dụng actin làm gen giữ nhà (housekeeping) và các tỷ lệ được thể hiện trên trục Y. Sự phosphoryl hóa cảm ứng bởi APRIL và BAFF của P38 theo dự kiến và các kháng thể không có tác dụng kích thích ở các nồng độ được thử nghiệm.

Hình 16A-16F. Các tế bào HEK-NF κ B biểu hiện BCMA (Hình 16A, Hình 16C và Hình 16E) hoặc các tế bào mẹ (Hình 16B, Hình 16D và Hình 16F) được kích thích với TNF α và APRIL hoặc BCMB72 với các nồng độ khác nhau. Ba thời điểm, 16 giờ. (Hình 16A và Hình 16B), 24 giờ. (Hình 16C và Hình 16D) và 48 giờ (Hình 16E và Hình 16F) được phân tích. Sự hoạt hóa NF- κ B cảm ứng TNF α ở cả tế bào mẹ HEK- Nf- κ B và tế bào HEK-NF- κ B-BCMA, trong khi chỉ nhìn thấy sự cảm ứng APRIL ở loại tế bào đặc hiệu BCMA. BCMB72 không có tác dụng đối với dòng tế bào mẹ và chỉ thể hiện sự hoạt hóa ở các nồng độ cao trong các tế bào biểu hiện BCMA.

Hình 17A và 17B. Các tế bào T không biểu hiện sự hoạt hóa qua trung gian BCMA tan và phụ thuộc BCMB72. BCMB72 (Hình 17A) và kháng thể đối chứng bất hoạt x CD3 (Hình 17B) được chuẩn độ với các tế bào T từ hai người hiến tặng bình thường (M7077 và M5137) với sự có mặt của ECD BCMA dạng tan với các liều lượng khác nhau. Dữ liệu: Giá trị trung bình $\pm$ SEM.

Hình 18A- 18F. Tác dụng của các yếu tố tan, BCMA tan, APRIL và BAFF đối với sự hoạt hóa tế bào T và khả năng gây độc tế bào qua trung gian tế bào T đối với BCMB72 trong các tế bào H929. Các tế bào được thực hiện xét nghiệm tiêu diệt tế bào trong 48 giờ bằng cách sử dụng các tế bào T từ người hiến tặng (M7077 &

M6521) và BCMB72. Cơ chế gây độc tế bào đích được minh họa bằng các đồ thị bên trái và sự hoạt hóa tế bào T được minh họa bằng các đồ thị bên phải ($n=2$). Các giá trị EC_{50} của mỗi lần xử lý được trình bày trong các chú thích. Cơ chế gây độc tế bào khi có mặt BCMA tan (Hình 18A), APRIL (Hình 18B) và BAFF (Hình 18C) được trình bày. Sự hoạt hóa tế bào T khi có mặt BCMA tan (Hình 18D), APRIL (Hình 18E) và BAFF (Hình 18F) được trình bày. Dữ liệu: Giá trị trung bình $\pm$ SEM.

Hình 19A và 19B. Các tín hiệu từ hai thí nghiệm độc lập được chuẩn hóa thành tín hiệu tối đa của liên kết BCMA-Fc với APRIL và BAFF khi không có các kháng thể cạnh tranh. Liên kết của BCMA với APRIL (Hình 19A) và BAFF (Hình 19B) được minh họa dưới dạng đồ thị của hàm của nồng độ BCMB72 và kháng thể đối chứng (bất hoạt x CD3).

Hình 20A-20E. Hiệu lực gây độc tế bào của BCMB72 kháng tương bào MM sơ cấp ở người. Các tế bào tủy xương đơn nhân đông lạnh từ năm bệnh nhân khác nhau (MM240BM (Hình 20A), MM259BM (Hình 20B), MM270BM (Hình 20C), MM276BM (Hình 20D) và MM277BM (Hình 20E)) được sử dụng để đánh giá liên kết BCMB72, so với lớp kháng thể đối chứng IgG4 (CNTO 9412, hình trái), cơ chế gây độc tương bào (giữa) và sự hoạt hóa tế bào T (phải). Đối với xét nghiệm về cơ chế gây độc tế bào, các tế bào T từ người hiến tặng khỏe mạnh bình thường M7077 được bổ sung ngoại sinh cho các mẫu BMMC của bệnh nhân và được ủ với BCMB72 (BCMA X CD3), BC3B4 (BCMA X bất hoạt) hoặc CNTO 7008 (bất hoạt X CD3) trong 48 giờ. BCMB72 liên kết với các tương bào phụ thuộc liều lượng cho tất cả mẫu của người hiến tặng 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 BCMB72. Các giá trị EC_{50} của sự hoạt hóa tế bào T được biểu thị trên đồ thị.

Hình 21. Hiệu lực *trong cơ thể sống* của BCMB72 trong mẫu phòng ngừa H929.

Hình 22. Các mức BCMA tan trong huyết thanh ở chuột ghép ngoại lai H929. Nồng độ BCMA tan trong huyết thanh được phát hiện bằng bộ kit ELISA BCMA

người (R&D Systems). Các mức BCMA tan thấp hơn đáng kể khi điều trị cho chuột với lượng BCMB72 là 1 µg và 0,5 µg/chuột so với đối chứng PBS, tương quan tốt với gánh nặng khối u ở các con vật này. Các liều BCMB72 thấp hơn (0,1 µg/chuột) không có tác dụng đối với các mức BCMA tan hoặc kích thước khối u.

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: Nguyên vật liệu

Phân tử ECD BCMA

Protein dung hợp BCMA-Fc người tái tổ hợp (mã danh mục 193-BC-050), tương ứng với axit amin 1 đến 54 của BCMA người (SEQ ID NO:1) và protein dung hợp BCMA-Fc chuột tái tổ hợp (mã danh mục 593-BC-050) tương ứng với axit amin 1 đến 49 của BCMA chuột (SEQ ID NO:2) thu được từ R&D Systems. Protein BCMA khi đuôi dài tái tổ hợp được điều chế từ ADN bổ sung bằng kỹ thuật tổng hợp gen (Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,670,127; Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,521,427). Tất cả protein được thử nghiệm về nội độc tố trước khi sử dụng và được biotin hóa cho các nghiên cứu sàng lọc thực khuẩn. Các nguyên liệu này cũng được sử dụng cho các phép đo về liên kết và ái lực.

BCMA người dạng tan thu được từ AB Biosciences (mã danh mục P011Xp, lô số 033-013) và được sử dụng để nghiên cứu về sự đặc trưng hóa.

Các phân tử APRIL, BAFF, BAFF-R và TACI

APRIL người dạng tan (mã danh mục DY884), BAFF người (mã danh mục 2149-BF), BAFF-R người (mã danh mục 1162-BR), tương ứng với axit amin 7 đến 71 của BAFF-R người, và TAC1 người, tương ứng với axit amin 2 đến 166 của

TACI thu được từ R&D Systems. BAFF-R và TAC1 được biotin hóa cho các nghiên cứu SPR.

Tạo các dòng tế bào BCMA

Các vector biểu hiện BCMA người (Hình 1A) và BCMA khi đuôi dài (Hình 1B) tạm thời được chuyển nhiễm vào trong các tế bào HEK293 expi bằng các phương pháp chuẩn. Các tế bào gắn với 293F được chuyển nhiễm được chọn để hợp nhất vào plasmit một cách ổn định, sau đó một tế bào được phân loại và biểu hiện của thụ thể trên bề mặt BCMA được định lượng bằng phương pháp FACS sử dụng kháng thể được gắn nhãn PE kháng BCMA người (R&D Systems FAB193P).

Ví dụ 2: Phân lập kháng thể đơn dòng BCMA người biểu hiện tế bào lai

Chuột biến đổi gen globulin miễn dịch người (OmniRat ®; OMT, Inc.) được sử dụng để phát triển kháng thể đơn dòng BCMA người biểu hiện các tế bào lai. OmniRat® chứa lôcut IgH người/chuột tổng hợp (gồm 22 V_H người, tất cả đoạn D và J_H người trong cấu hình tự nhiên liên kết với lôcut C_H chuột) cùng với lôcut IgL người hoàn chỉnh (12 V_K liên kết với J_K-C_K và 16 V_L liên kết với J_L-C_L). (xem ví dụ, Osborn, và cộng sự (2013) J Immunol (Tạp chí miễn dịch học) 190(4): 1481-1490). Theo đó, chuột giảm biểu hiện IgM hoặc κ chuột, và để đáp ứng sự tạo miễn dịch, các gen biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ người đã đưa vào sẽ chuyển đổi lớp và đột biến soma để tạo các kháng thể đơn dòng IgG người có ái lực cao. Việc điều chế và sử dụng OmniRat®, và việc điều hòa bộ gen được thực hiện bởi các con chuột này, được mô tả trong PCT số công bố WO 14/093908 đến Bruggemann và cộng sự.

Khi được tạo miễn dịch với BCMA người tái tổ hợp (rhBCMA), chuột biến đổi gen này sẽ sản sinh các kháng thể IgG người đặc hiệu BCMA người.

Quy trình tạo miễn dịch được thực hiện như sau: sáu con chuột được tạo miễn dịch với dung hợp BCMA-Fc người. Tiếp theo chế độ tạo miễn dịch 21 ngày, các lá lách và hạch bạch huyết từ các chuột đã tạo miễn dịch được thu thập và sử dụng để tạo tổng cộng bốn thư viện tế bào lai. Các thư viện được chuẩn độ và xét nghiệm bằng phương pháp ELISA để nhận dạng các kháng thể đơn dòng biểu hiện liên kết với BCMA người được biotin hóa. Các kháng thể đơn dòng thu được trên đĩa MSD Streptavidin. Sau khi tiếp tục sàng lọc xác nhận, các lớp bề mặt tế bào lai biểu hiện

liên kết đặc hiệu với BCMA người và BCMA khi đuôi dài được giải trình tự, tách dòng và biểu hiện và chuyển hóa thành IgG1 và IgG4 người.

Ví dụ 3: Tinh chế kháng thể BCMA

Thu được các kháng thể BCMA trong các lớp bề mặt của môi trường nuôi cấy đã được làm sạch bằng nhựa MabSelect SuRe Protein A và chúng được rửa giải với natri axetat 100 mM (pH 3,5). Các phân đoạn chứa kháng thể được tập hợp và trung hòa ngay lập tức với Tris HCl 2,5 M (pH 7,2), sau đó là dung dịch đệm được thay đổi thành 1xD-PBS hoặc các dung dịch đệm mong muốn khác nếu được chỉ định. Nồng độ protein được xác định bằng cách đo OD280 trên quang phổ kế NanoDrop và được tính bằng cách sử dụng hệ số hấp thụ của nó. Độ tinh khiết và tính đồng nhất của kháng thể được đánh giá bằng SDS-PAGE và SE-HPLC. Bước tinh chế SEC bằng cách sử dụng Superdex 200 được thực hiện nếu monome giảm xuống dưới 95% cho mỗi SE-HPLC.

Ví dụ 4: Đặc trưng hóa tế bào chứa các kháng thể BCMA liên kết với BCMA

Liên kết của các kháng thể BCMA với các tế bào biểu hiện BCMA được kiến tạo và dòng tế bào ung thư U2392, EJM, MMIR, U266, OPM2, và RPMI-18226 được đánh giá bằng xét nghiệm liên kết tế bào MSD (Mesoscale) và phương pháp đo và đếm tế bào theo dòng. Mục đích của xét nghiệm sàng lọc là nhận dạng các kháng thể liên kết với các tế bào biểu hiện BCMA cũng như phản ứng chéo với các tế bào biểu hiện BCMA khi đuôi dài.

Đối với xét nghiệm liên kết tế bào MSD, các tế bào được cố định và các mẫu kháng thể BCMA được xét nghiệm theo bộ ba. Mô tả ngắn gọn, lớp bề mặt biểu hiện của các kháng thể BCMA đã được tinh chế được chuẩn hóa đến khi đạt nồng độ 10 µg/mL. 5000 tế bào mỗi lỗ được đổ vào một đĩa 384 lỗ (MA6000, loại L21XB, MSD) và cho kết dính trong 2 giờ. Sau đó các tế bào được phủ bằng FBS 20% trong PBS (Gibco) trong 15 phút. Sau đó bổ sung lớp kháng thể bề mặt và để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Các tế bào được rửa 3 lần bằng PBS và sau đó kháng thể thứ cấp được gắn nhãn ruteni (Jackson Immuno Research) được bổ sung với lượng 1 µg/mL và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó áp dụng bước rửa tiếp theo và thêm 35 µL dung dịch đệm đọc MSD T (không có chất hoạt động bề mặt) vào mỗi lỗ và ủ

trong 30 phút để được phát hiện. Sau đó các đĩa được đọc bằng thiết bị MSD Sector 6000. Dữ liệu được chuẩn hóa theo các đối chứng và được vẽ đồ thị bằng GraphPad Prism phiên bản 5. Chất liên kết dương tính được xác định là kết quả với tín hiệu lớn hơn gấp 3 lần nền. Xét nghiệm được lặp lại để nhất quán dữ liệu và chọn ra các chất liên kết hàng đầu để phát triển tiếp.

Đối với phương pháp đo và đếm tế bào theo dòng, các tế bào được ủ với thuốc nhuộm giúp nhận biết tế bào sống và 100.000 tế bào được thêm vào đĩa có đáy chữ U và được ly tâm để tạo viên tế bào. Các kháng thể BCMA đã được chuẩn độ được bổ sung vào các tế bào. Sau giai đoạn ủ, các tế bào được tạo thành viên và được rửa. Kháng thể thứ cấp đặc hiệu loài đã được dán nhãn AlexaFluor 647 được bổ sung vào các tế bào và được ủ. Các tế bào được tạo viên và rửa vài lần. Các tế bào được tái huyền phù trong dung dịch đệm đang chảy với lượng phù hợp và được phân tích bằng FACS CantoII. Các tế bào bị chặn bằng FSC-A và SSC-A về kích thước, SSC-A và SSC-H về các nhóm đơn và về thuốc nhuộm giúp nhận biết tế bào sống. Các giá trị MFI hình học của quần thể tế bào sống được vẽ đồ thị và được sử dụng để tính các giá trị EC_{50} nếu có thể, tức là nếu đường cong hoàn toàn có dạng sigma.

Ức chế liên kết phối tử APRIL

Nhóm kháng thể BCMA được sàng lọc trong xét nghiệm ELISA về cạnh tranh liên kết với APRIL. April người dạng tan được mua từ R&D systems mã danh mục DY884), khả năng của các kháng thể kháng BCMA trong việc ức chế liên kết của April với BCMA cố định được đánh giá.

Mô tả ngắn gọn, các đĩa maxisorb trong gồm 96 lỗ được xử lý với 100 μ L BCMA-ECD có nồng độ 0,5 μ g/mL được tạo trong PBS và được ủ ở nhiệt độ phòng qua đêm. Sau đó các đĩa được rửa ba lần với dung dịch đệm rửa ELISA chứa Tween-20 n PBS 0,05% (R&D Systems mã danh mục WA126), và sau đó được lấp bằng 300 μ L/lỗ Reagent Diluent chứa BSA5 1% trong PBS (R&D Systems mã danh mục DY995). Về liên kết cạnh tranh, các kháng thể BCMA được thêm vào đĩa theo các thể tích 100 μ L và được ủ trong 30 phút trước khi bổ sung APRIL. Sau 30 phút, 1 ng APRIL được thêm vào mỗi lỗ và các đĩa được ủ qua đêm ở 4°C. APRIL không liên kết được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa ELISA và APRIL đã được biotin hóa liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng liên hợp SA-HRP với mật độ quang 450 nm.

Ví dụ 5: Đánh giá và lựa chọn kết quả

Sau khi hoàn tất thí nghiệm về sự đặc trưng hóa, kháng thể được dẫn xuất từ tế bào lai M2 có tên BCMB69- được xác định có các đặc trưng sau:

- Liên kết với BCMA người tái tổ hợp
- Liên kết với BCMA khi tái tổ hợp
- Biểu hiện liên kết yếu với BCMA chuột
- Liên kết với cả BCMA người biểu hiện HEK và BCMA khi biểu hiện HEK được đo bằng phương pháp đếm và đo tế bào theo dòng
- Liên kết với các dòng ung thư ở người biểu hiện BCMA (U2392, EJM, MMIR, U266, OPM2, và RPMI-18226)
- Ước chế liên kết APRIL với $IC_{50} = 5,9 \text{ nM}$

Kết quả là BCMB69 (Bảng 4 và Bảng 5) được biểu hiện và tinh chế để điều chế các kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3.

Bảng 4. Các trình tự CDR của BCMB69 (SEQ ID NO liên quan được cung cấp trong dấu ngoặc)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
BCMB69	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)

Bảng 5: Các trình tự V_H và V_L của BCMB69

ID AA mAb	Trình tự axit amin V_H	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin V_L	SEQ ID NO:
BCMB69	QLQLQESGPGLVKPSET LSLTCTVSGGSISSGSYF WGWRQPPGKGLEWIG SIYYSGITYYNPSLKS VTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARHD GAVAGLFDYWGQGTL VTVSSA	27	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28

Ví dụ 6: Cấu trúc tinh thể của Fab kháng BCMA

Cấu trúc tinh thể của một kháng thể kháng BCMA (BCMB69) được xác định ở dạng Fab tự do, cũng như khi được liên kết với BCMA người, để đặc trưng hóa sự tương tác kháng thể/kháng nguyên theo các chi tiết nguyên tử, giúp tăng hiểu biết của chúng ta về cơ chế tác dụng của kháng thể, và hỗ trợ các nỗ lực kiến tạo kháng thể theo yêu cầu.

Nguyên vật liệu

Fab BCMA gắn His (các SEQ ID NO: 75 và 76; sau đây gọi đơn giản là Fab BCMB69) được biểu hiện trong các tế bào HEK293 và được tinh chế bằng các phép sắc ký ái lực và theo loại kích cỡ. Thu được Fab trong NaCl 130 mM, MES 20 mM, pH 7,4.

Vùng ngoại bào BCMA người (các đơn phân 5-51 có SEQ ID NO:1; sau đây gọi đơn giản là BCMA) với nhãn His ở đầu C được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ vi rút Baculo và được tinh chế bằng phép sắc ký ái lực và theo loại kích cỡ. Thu được protein trong NaCl 50 mM, Tris 20 mM, pH 8.

Tinh thể hóa

Phức BCMA/Fab BCMB69

Phức Fab/kháng nguyên được điều chế bằng cách trộn BCMA với Fab BCMB69 với tỷ lệ mol là 3,8 : 1 (BCMA dư) trong khoảng 16 giờ ở 4°C trong khi dung dịch đệm đổi thành Hepes 20 mM có pH 7,5. Sau đó phức hợp được rửa giải từ cột monoS 5/50 với gradien của NaCl 51-63 mM trong Hepes 20 mM có pH 7,5 và được cô đặc đến khi đạt nồng độ 17 mg/mL. Các tinh thể phù hợp để thực hiện nhiễu xạ tia X thu được từ PEG 3 kDa 25%, MgCl₂ 0,2 M, Mes 0,1 M có pH 6,5 bằng phương pháp khuếch tán hơi nước giọt ngồi ở 20°C cùng với gieo mầm cực nhỏ.

Fab BCMB69

Fab BCMB69 được cô đặc đến 9 mg/mL mà không cần tinh chế thêm. Các tinh thể phù hợp để thực hiện nhiễu xạ tia X thu được từ (NH₄)₂SO₄ 2 M, MPD 5%, Mes 0,1 M có pH 6,5 bằng phương pháp khuếch tán hơi nước giọt ngồi ở 20°C.

Thu thập dữ liệu tia X và xác định cấu trúc

Để thu thập dữ liệu tia X, các tinh thể được nhúng trong vài giây trong dung dịch bảo vệ đông lạnh chứa dung dịch mẹ tương ứng được bổ sung glyxerol 20% và sau đó được làm đông nhanh trong nitơ lỏng. Dữ liệu nhiễu xạ tia X cho phức BCMA/BCMB69 được thu thập bằng thiết bị dò Rayonix 300HS CCD tại đường chùm CMCf-08ID của Trung tâm Nguồn sáng Canada (Canadian Light Source - CLS), trong khi dữ liệu tia X cho Fab BCMB69 tự do được thu thập bằng thiết bị dò Dectris Pilatus 6M Pixel Array tại đường chùm 17-ID của Nguồn photon nâng cao (Advanced Photon Source - APS) tại Phòng thí nghiệm quốc gia Argonne (Argonne National Laboratory). Dữ liệu nhiễu xạ được xử lý bằng chương trình HKL (Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Xử lý dữ liệu nhiễu xạ tia X được thu thập trong chế độ dao động. *Methods in Enzymology* (Các phương pháp trong enzym học) 276: 307-326.).

Các cấu trúc được phân giải bằng cách thay thế phân tử (MR) bằng Phaser (Read, R. J. (2001). Mở rộng giới hạn của việc thay thế phân tử hết mức có thể. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 1373-82). Trong trường hợp cấu trúc Fab tự do, mô hình tìm kiếm cho MR là Fab 5j8 ngưng kết hồng cầu kháng cúm (mã PDB: 4M5Y). Trong trường hợp cấu trúc phức BCMA/Fab, mô hình tìm kiếm cho MR là cấu trúc tinh thể của BCMA (mã PDB: 1XU2) và cấu trúc Fab tự do BCMB69. Các cấu trúc được tinh chế bằng PHENIX (Adams, P. D., Gopal, K., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Pai, R. K., Read, R. J., Romo, T. D., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K., Storoni, L. C. & Terwilliger, T. C. (2004). Các phát triển gần đây về phần mềm PHENIX để xác định cấu trúc tinh thể học tự động. *J Synchrotron Radiat* 11: 53-5.) và việc điều chỉnh mô hình được thực hiện bằng chương trình COOT (Emsley P. & Cowtan, K. (2004). Coot: Công cụ thiết lập mô hình về đồ họa phân tử. *Acta Crystallogr. Tỷ lệ D60*: 2126-2132). Tất cả phép tính tinh thể học khác được thực hiện bằng các chương trình CCP4 (Collaborative Computational Project (Dự án tính toán phối hợp) số 4, 1994). Tất cả đồ họa phân tử được tạo bằng PyMol (DeLano, W. (2002). Hệ thống đồ họa phân tử PyMOL. *Palo Alto, CA, USA; Delano Scientific*).

Số liệu thống kê dữ liệu về cấu trúc Fab tự do BCMB69 và phức được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Dữ liệu tinh thể học cho phức BCMA/Fab BCMB69 và Fab BCMB69 tự do.

	Phức	Fab tự do
<i>ID cấu trúc trong CBIS</i>	PS41	PS40
<i>Dữ liệu tinh thể</i>		
Dung dịch kết tinh		
Dung dịch đậm 0,1 M	Mes pH 6,5	Mes pH 6,5
Chất kết tủa	PEG 3 kDa 25%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 2 M
Chất phụ gia	MgCl ₂ 0,2 M	MPD 5%
Nhóm không gian	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Phân tử/đơn vị bất đối xứng	2	1
Ô đơn vị		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	62,9, 87,1, 88,7	64,3, 71,1, 123,0
α , β , γ (°)	90,0, 94,8, 90,0	90,0, 90,0, 90,0
Hàm lượng dung môi (%)	47	56
<i>Dữ liệu tia X*</i>		
Độ phân giải (Å)	50,00-2,00	50,00-2,70
Vỏ có độ phân giải cao nhất (Å)	(2,07-2,00)	(2,75-2,70)
Phản xạ đo được	235.905	91.256
Tính hoàn chỉnh (%)	99,9 (99,8)	99,9 (99,9)
Tính dư thừa	3,7 (3,6)	5,7 (4,8)
R _{đối xứng} (%)	10,0 (52,7)	14,8 (51,9)
<I/ σ >	13,3 (2,9)	13,5 (3,1)
<i>Tinh chế</i>		
Độ phân giải (Å)	45,4-2,0	34,2-2,7
Số phản xạ	64.157	15.890
Tổng số nguyên tử	7.001	3.149
Số lượng nước	89	10
R _{hoạt động} / R _{tự do} (%)	19,0 / 23,7	18,5 / 24,0
Chiều dài liên kết RMSD (Å)	0,009	0,004
Góc liên kết RMSD (°)	1,190	0,869
Hệ số B trung bình (Å ²)	31,0	51,1
MolProbity		
Ramachandran ưu tiên (%)	97,32	96,86
Ramachandran cho phép (%)	2,68	2,90
Phần tử ngoại lai Ramachandran (%)	0,00	0,24
Ngoại lai đồng phân quay (%)	0,39	0,59
Điểm va chạm	3,20	1,96

Epitope, paratope và các tương tác

BCMB69 nhận diện được epitope cấu hình bao gồm các đơn phân trong vùng β -hairpin (các đơn phân Y13-H19) và helix-loop-helix (đoạn xoắn-vòng-đoạn xoắn) (các đơn phân L26, R27, và N31-L35) của BCMA (Hình 3 và 4). Epitope BCMB69 bao gồm vùng bằng phẳng khoảng $830 \text{ \AA}^2$ trên BCMA và chứa mô-típ DXL liên kết phối tử (các đơn phân D15-L18 trong vòng cuộn loại I thuộc β -hairpin), nhô vào trong khoang cạnh được tạo bởi các vùng xác định bổ sung của kháng thể (CDR). Leuxin 17, ở đầu vòng cuộn DXL, hoàn toàn được bao phủ trong khoang kháng thể và có các tương tác mở rộng với BCMB69. Đơn phân epitope phổ biến khác là Arg27, ở trên 3_{10} -helix h1 và thực hiện một số tiếp xúc liên kết hydro với CDR chuỗi nặng.

Paratope BCMB69 bao gồm các đơn phân từ tất cả CDR ngoại trừ CDR-L1 (Hình 2 và 3). Chuỗi nặng có số điểm tiếp xúc với BCMA gấp hai lần so với chuỗi nhẹ. Các mạch bên nhỏ ở đầu vòng CDR-H3 (102-GAVAG-106) (SEQ ID NO: 77) hỗ trợ việc đưa CDR-H3 vào trong BCMA và thiết lập các điểm tiếp xúc kháng thể/kháng nguyên mở rộng (40% tổng số điểm tiếp xúc được CDR-H3 thực hiện). Các CDR BCMB69 xếp chặt lại với nhau trên bề mặt lõm của cấu trúc BCMA có hình chiếc ghế với CDR-L2 (các đơn phân Y48, D52, P54, S55), CDR-H1 (các đơn phân G32-Y34), và CDR-H3 (D101, A103, V104, Y110) tiếp xúc với “chỗ ngồi” được tạo bởi đoạn xoắn h1 và vòng h1h2, trong khi CDR-L3 (các đơn phân W90, S92, D95), CDR-H1 (F35), CDR-H2 (Y54, Y60), và CDR-H3 (H100, G102, A103, A105) tiếp xúc với “lưng ghế” được tạo bởi cấu trúc β -hairpin của BCMA. Leu35, đơn phân epitope duy nhất trong “chân ghế” (đoạn xoắn h2), có các tiếp xúc van der Waals với đơn phân D52 của CDR-L2.

BCMA có miền ngoại bào nhỏ gọn (khoảng 50 đơn phân). Ở đây có sẵn bề mặt giới hạn để liên kết các kháng thể không cạnh tranh hoặc các phối tử với BCMA. Hầu hết các đơn phân epitope BCMB69 cũng là các đơn phân liên kết cho APRIL (12 trong số 14 đơn phân epitope) và BAFF (9 trong số 14 đơn phân). Trong trường hợp APRIL, đây là phối tử có ái lực cao nhất của BCMA, các đơn phân epitope duy nhất không được dùng chung là F14 và S16 (Hình 2B), trong khi đối với BAFF, các đơn phân không được dùng chung là F14, L26, T32, P33, và L35. Vòng DXL được bao phủ bởi cả phối tử và BCMB69.

Các cơ chế tác dụng của BCMB69 được đề xuất

BCMB69 là ứng viên để chuyển hướng các tế bào T đến các tế bào ung thư MM. Việc tiêu diệt các tế bào ung thư qua trung gian kháng thể đặc hiệu đòi hỏi BCMB69 x kháng CD3 dự kiến sẽ không bị suy yếu bởi cấu trúc và vị trí của epitope BCMB69. Vị trí có thể tiếp xúc của epitope cho phép liên kết nhánh Fab BCMB69 với BCMA được liên kết với màng, trong khi nhánh Fab khác vẫn liên kết với CD3 trong màng tế bào T.

BCMB69 cũng có thể phá vỡ các đường phát tín hiệu APRIL và BAFF trong các tương bào thông qua việc chặn không gian và cạnh tranh trực tiếp về điểm gắn BCMA. Sự chồng lấp cấu trúc BCMA/BCMB69 trên các cấu trúc BCMA/APRIL và BCMA/BAFF (Liu, Y., Hong, X., Kappler, J., Jiang, L., Zhang, R., Xu, L., Pan, C.H., Martin, W.E., Murphy, R.C., Shu, H.B., Dai, S. & Zhang, G. (2003). *Nature (Tự nhiên)* 423: 49-56; Hymowitz, S.G., Patel, D.R., Wallweber, H.J.A., Runyon, S., Yan, M., Yin, J., Shriver, S.K., Gordon, N.C., Pan, B., Skelton, N.J., Kelley, R.F. & Starovasnik, M.A. (2005). *J. Biol. Chem. (Tập chí Sinh hóa học)* 280: 7218-7227.) trình bày các vùng va chạm giữa BCMB69 và APRIL, BAFF (Hình 2B và Hình 4A và 4B), khiến cho BCMA không thể liên kết đồng thời với kháng thể và phối tử tự nhiên. APRIL và BAFF có thể phát tín hiệu bằng các thụ thể khác, như TACI và BAFF-R, và chuột có BCMA bất hoạt vẫn còn sống. Vì vậy, việc ức chế hoạt tính APRIL và BAFF thông qua việc chặn BCMA có thể không gây độc nghiêm trọng đối với các bệnh nhân MM.

Ví dụ 7: Tạo các đột biến BCMB69 dựa trên cấu trúc

Việc đánh giá sử dụng máy điện toán các mô-típ điều hòa sau dịch mã và nguy cơ kết tụ vùng biến đổi BCMB69 không liên kết cho biết rủi ro trung bình về isome hóa cho các đơn phân D101-G102 (CDR-H3) và mảng kỵ nước 486 Å² trong vùng CDR có thể gây nguy cơ kết tụ. Các đơn phân kỵ nước được tiếp xúc nhiều nhất trong mảng là I58 (CDR-H2), F35 (CDR-H1), và V104 (CDR-H3; V104 có liên quan trong mô hình tương đồng Fv, nhưng không trong cấu trúc tinh thể Fab). Để loại bỏ nguy cơ isome hóa và kết tụ trong vùng biến đổi BCMB69, các đột biến khác nhau được tạo một cách hợp lý (Bảng 7).

Bảng 7: Nhóm đột biến BCMB69

Tập hợp	ID dòng	Đột biến	Mục đích
1	BCMB117	G152A ^L	Loại bỏ sự isome hóa và giảm tính kỵ nước
1	BCMB118	G102A ^H , F35Y ^H , V104T ^H	Loại bỏ sự isome hóa và giảm tính kỵ nước
1	BCMB119	D101E ^H , F35Y ^H , V104T ^H	Loại bỏ sự isome hóa và giảm tính kỵ nước
1	BCMB120	D101S ^H , F35Y ^H , V104T ^H	Loại bỏ sự isome hóa và giảm tính kỵ nước
1	BCMB121	G32S ^H , F35Y ^H , I58S ^H , P37K ^L , V44L ^L , V83D ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước
1	BCMB122	G32S ^H , F35Y ^H , I58S ^H	Các đột biến dòng mầm VH để giảm tính kỵ nước
1	BCMB123	G32S ^H	Hiệu quả tiếp cận của một đột biến, giảm tính kỵ nước
1	BCMB124	F35Y ^H	Hiệu quả tiếp cận của một đột biến, giảm tính kỵ nước
1	BCMB125	D101E ^H	Hiệu quả tiếp cận của một đột biến, loại bỏ sự isome hóa
1	BCMB126	D101S ^H	Hiệu quả tiếp cận của một đột biến, loại bỏ sự isome hóa
1	BCMB127	G102A ^H	Hiệu quả tiếp cận của một đột biến, loại bỏ sự isome hóa
1	BCMB128	V104T ^H	Hiệu quả tiếp cận của một đột biến, giảm tính kỵ nước
1	BCMB129	I58S ^H	Hiệu quả tiếp cận của một đột biến, giảm tính kỵ nước
1	BCMB130	G102A ^H , F35Y ^H , I58S ^H	Loại bỏ sự isome hóa và giảm tính kỵ nước
1	BCMB131	D101E ^H , F35Y ^H , I58S ^H	Loại bỏ sự isome hóa và giảm tính kỵ nước
2	BCMB176	G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước
2	BCMB177	I58R ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước
2	BCMB178	I58W ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước
2	BCMB179	D101Q ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Phá vỡ sự isome hóa và tính kỵ nước,
2	BCMB180	D101H ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Phá vỡ sự isome hóa và tính kỵ nước
2	BCMB181	D101W ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước và loại bỏ sự isome hóa
2	BCMB182	D101Y ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước và loại bỏ sự isome hóa
2	BCMB183	I58R ^H , D101Q ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước và loại bỏ sự isome hóa
2	BCMB184	I58R ^H , D101H ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước và loại bỏ sự isome hóa
2	BCMB185	I58R ^H , D101Y ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước và loại bỏ sự isome hóa
2	BCMB186	I58W ^H , D101Q ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước và loại bỏ sự isome hóa
2	BCMB187	I58W ^H , D101H ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước và loại bỏ sự isome hóa
2	BCMB188	I58W ^H , D101Y ^H , G32S ^H , V104T ^H , G152A ^L	Các đột biến dòng mầm VH và VL để giảm tính kỵ nước và loại bỏ sự isome hóa

Các trình tự CDR và trình tự VH và VL của các đột biến BCMB69 dựa trên cấu trúc lần lượt được trình bày trong Bảng 8 và 9.

Bảng 8: Các trình tự CDR của các đột biến BCMB69 (SEQ ID NO liên quan được cung cấp trong dấu ngoặc)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
BCMB117	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB118	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDAATAGLFDY (9)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB119	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HEGATAGLFDY (12)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB120	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HSGATAGLFDY (15)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB121	SSSYWYG (7)	SIYYSGITYYNPSLKS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB122	SSSYWYG (7)	SIYYSGITYYNPSLKS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB123	SSSYWYG (7)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB124	SGSYWYG (10)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB125	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HEGAVAGLFDY (16)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB126	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HSGAVAGLFDY (17)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB127	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDAAVAGLFDY (18)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB128	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB129	SGSYFWG (4)	SIYYSGITYYNPSLKS (8)	HDGAVAGLFDY (6)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB130	SGSYWYG (10)	SIYYSGITYYNPSLKS (8)	HDAAVAGLFDY (18)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB131	SGSYWYG (10)	SIYYSGITYYNPSLKS (8)	HEGAVAGLFDY (16)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB176	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB177	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSLKS (8)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB178	SSSYFWG (13)	SIYYSGWITYYNPSLKS (11)	HDGATAGLFDY (19)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB179	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HQGATAGLFDY (20)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB180	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HHGATAGLFDY (21)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB181	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HWGATAGLFDY (22)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
BCMB182	SSSYFWG (13)	SIYYSGITYYNPSLKS (5)	HYGATAGLFDY (23)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB183	SSSYFWG (13)	SIYYSGRTYYNPSLKS (14)	HQGATAGLFDY (20)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB184	SSSYFWG (13)	SIYYSGRTYYNPSLKS (14)	HHGATAGLFDY (21)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB185	SSSYFWG (13)	SIYYSGRTYYNPSLKS (14)	HYGATAGLFDY (23)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB186	SSSYFWG (13)	SIYYSGWTYYNPSLKS (11)	HQGATAGLFDY (20)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB187	SSSYFWG (13)	SIYYSGWTYYNPSLKS (11)	HHGATAGLFDY (21)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)
BCMB188	SSSYFWG (13)	SIYYSGWTYYNPSLKS (11)	HYGATAGLFDY (23)	GGNNIGSKSVH (24)	DDSDRPS (25)	QVWDSSSDHVV (26)

Bảng 9: Các trình tự VH và VL của các đột biến BCMB69

ID AA mAb	Trình tự axit amin VH	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin VL	SEQ ID NO:
BCMB 117	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARH DGAVAGLFDYWGQGTL VTVSSA	57	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 118	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYYW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHDAATAGLF DYWGQGTLVTVSSA	29	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 119	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYYW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHEGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA	31	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 120	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYYW GWIRQPPGKGLEWIGSIY	32	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQPPGQAPVVVVYDD	28

	YSGITYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHSGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA		SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	
BCMB 121	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYYW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGSTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHDGAVAGLF DYWGQGTLVTVSSA	33	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQKPGQAPVLVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEADY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	30
BCMB 122	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYYW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGSTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHDGAVAGLF DYWGQGTLVTVSSA	33	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	28
BCMB 123	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGITYYNPSLKSRTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARHDGAVAGLFD YWGQGTLVTVSSA	34	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	28
BCMB 124	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYYW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHDGAVAGLF DYWGQGTLVTVSSA	35	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	28
BCMB 125	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHEGAVAGLF DYWGQGTLVTVSSA	36	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	28
BCMB 126	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD	37	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY	28

	TAVYYCARHSGAVAGLF DYWGQGTLVTVSSA		YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	
BCMB 127	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHDAAVAGLF DYWGQGTLVTVSSA	38	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 128	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHDGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA	39	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 129	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGSTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHDGAVAGLF DYWGQGTLVTVSSA	40	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 130	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYYW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGSTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHDAAVAGLF DYWGQGTLVTVSSA	41	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 131	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSGSYYW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGSTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHEGAVAGLF DYWGQGTLVTVSSA	42	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 176	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARH DGATAGLFDYWGQGT	58	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28

	VTVSSA			
BCMB 177	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGRTYYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHDGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA	43	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	28
BCMB 178	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGWTYYNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHDGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA	44	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	28
BCMB 179	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGITYYNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARHQGATAGLFD YWGQGTLVTVSSA	45	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	28
BCMB 180	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGITYYNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARHHGATAGLFD YWGQGTLVTVSSA	46	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	28
BCMB 181	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGITYYNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARHWGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA	47	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	28
BCMB 182	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGITYYNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCARHYGATAGLFD YWGQGTLVTVSSA	48	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFEGG GTKLTVL	28
BCMB	QLQLQESGPGLVKPSETL	49	SYVLTQPPSVSVAPGQT	28

183	SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGRTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHQGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA		ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	
BCMB 184	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGRTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHHGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA	50	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 185	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGRTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHYGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA	51	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 186	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGWTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHQGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA	52	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 187	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGWTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHHGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA	53	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28
BCMB 188	QLQLQESGPGLVKPSETL SLTCTVSGGSISSSSYFWG WIRQPPGKGLEWIGSIYY SGWTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARHYGATAGLF DYWGQGTLVTVSSA	54	SYVLTQPPSVSVAPGQT ARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVY YCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVL	28

Vì vậy, ngoài BCMB69, 28 đột biến được biểu hiện và tinh chế theo mô tả trong Ví dụ 3 và được đặc trưng hóa để liên kết với các tế bào biểu hiện BCMA

bằng phương pháp đếm và đo tế bào theo dòng theo mô tả trong Ví dụ 4. 7 trong 28 đột biến liên kết với các tế bào biểu hiện BCMA và được phát triển để điều chế nhóm đặc hiệu đôi BCMA x CD3.

Ví dụ 8: Điều chế kháng thể BCMA và CD3 theo dạng đặc hiệu đôi trong S228P, L234A, L235A của IgG4

Các kháng thể BCMA được biểu hiện dưới dạng IgG4, có các thay thế Fc S228P, L234A, và L235A (đánh số theo chỉ mục EU). Kháng thể kháng CD3 đơn đặc hiệu CD3B19 cũng được tạo bao gồm chuỗi nặng và nhẹ có các trình tự lần lượt có SEQ ID NO 55 và SEQ ID NO 56.

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 BCMA x CD3 đặc hiệu đôi được tạo bằng cách kết hợp kháng thể đơn dòng CD3 đơn đặc hiệu và kháng thể đơn dòng BCMA đơn đặc hiệu bằng phương pháp trao đổi nhánh Fab *trong ống nghiệm* (theo mô tả trong WO2011/131746). Mô tả vắn tắt, kháng thể kháng BCMA/kháng CD3 (hoặc trong một số trường hợp thêm 6% một kháng thể mẹ để làm mất đi kháng thể khác) với nồng độ bằng khoảng 1-20 mg/mL với tỷ lệ mol 1:1 trong PBS, pH 7-7,4 và 2-mercaptoetanolamin 75 mM (2-MEA) được trộn với nhau và được ủ ở 31°C trong 5 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. Sự hình thành các kháng thể BCMA x CD3 đặc hiệu đôi được phân tích bằng HPLC trao đổi cation (CEX) hoặc HPLC sắc ký tương tác kỵ nước (HIC). Nếu muốn, kháng thể BCMA x CD3 đặc hiệu đôi được tinh chế bằng CEX hoặc HIC điều chế để loại bỏ (các) kháng thể mẹ còn lại

Chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 đại diện được trình bày bên dưới trong Bảng 10. BCMB178 có biểu hiện kém khi kết hợp với nhánh CD3, và kết quả là không được đặc trưng hóa thêm.

Bảng 10. Trình tự chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể đặc hiệu đôi

Kháng thể		Trình tự axit amin
BCMB72	Chuỗi nặng 1 CD3B219 (SEQ ID NO:55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAA SVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY CARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK
	Chuỗi nhẹ 1 CD3B219 (SEQ ID NO:56)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPK SKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	Chuỗi nặng 2 BCMB69 (SEQ ID NO:65)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAG LFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK
	Chuỗi nhẹ 2 BCMB69 (SEQ ID NO:76)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTPSK QSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG STVEKTVAPTECS
BC3B7	Chuỗi nặng 1 CD3B219 (SEQ ID NO:55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAA SVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY

		CARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 1 CD3B219 (SEQ ID NO:56)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYNLWV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	Chuỗi nặng 2 BCMB117 (SEQ ID NO:67)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAG LFDYWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 2 BCMB117 (SEQ ID NO:66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSDDHVVFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG STVEKTVAPTECS
BC3B8	Chuỗi nặng 1 CD3B219 (SEQ ID NO:55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAA SVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV

		SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 1 CD3B219 (SEQ ID NO:56)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	Chuỗi nặng 2 BCMB123 (SEQ ID NO:68)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 2 BCMB123 (SEQ ID NO:66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNATATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
BC3B9	Chuỗi nặng 1 CD3B219 (SEQ ID NO:55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFNGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPC

		PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 1 CD3B219 (SEQ ID NO:56)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPSPSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	Chuỗi nặng 2 BCMB128 (SEQ ID NO:69)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARHDGATAG LFDYWGGQTLTVVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 2 BCMB128 (SEQ ID NO:66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFVG GTKLTVLGQPKAAPSVTLPSPSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG STVEKTVAPTECS
BC3B10	Chuỗi nặng 1 CD3B219 (SEQ ID NO:55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAA SVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY CARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

		EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 1 CD3B219 (SEQ ID NO:56)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	Chuỗi nặng 2 BCMB129 (SEQ ID NO:70)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAG LFDYWGGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPCCPPCAPEAAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 2 BCMB129 (SEQ ID NO:66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG STVEKTVAPTECS
BC3B11	Chuỗi nặng 1 CD3B219 (SEQ ID NO:55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAA SVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY CARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCC PPCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK

		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 1 CD3B219 (SEQ ID NO:56)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNLWV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	Chuỗi nặng 2 BCMB176 (SEQ ID NO:71)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAG LFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 2 BCMB176 (SEQ ID NO:66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG STVEKTVAPTECS
BC3B12	Chuỗi nặng 1 CD3B219 (SEQ ID NO:55)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAA SVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY CARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV

		MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 1 CD3B219 (SEQ ID NO:56)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNY ANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	Chuỗi nặng 2 BCMB177 (SEQ ID NO:72)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFW GWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGRTYYNPSLKSRTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAG LFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDPKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	Chuỗi nhẹ 2 BCMB177 (SEQ ID NO:66)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHW YQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG STVEKTVAPTECS

Ví dụ 9: Xác định ái lực BCMA của các kháng thể BCMA và các kháng thể đặc hiệu đôi BCMA X CD3

Phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được sử dụng để đo các giá trị ái lực BCMA người của các kháng thể BCMA được dùng để tạo các đặc hiệu đôi CD3. Quy trình được sử dụng cho SPR tương tự với quy trình được mô tả trong Ví dụ 4. Các kết quả trình bày trong Bảng 11 biểu thị tất cả mẫu liên kết với kháng nguyên BCMA monome có các ái lực khác nhau. Kháng thể đơn dòng mẹ (BCMB69) có các ái lực liên kết bằng ~ 1,4 nM. BCMB117 và BCMB128 có các ái lực trong khoảng bằng ái lực của BCMB69, trong khi BCMB123, BCMB129,

BCMB176 và BCMB177 có các ái lực tương đối yếu hơn (3 đến 15 lần) do tốc độ phân ly nhanh hơn. Để đánh giá khả năng tái lập dữ liệu, tất cả mẫu được chạy ít nhất theo bộ ba và độ lệch chuẩn được báo cáo.

Bảng 11. Các ái lực liên kết của các kháng thể đơn dòng kháng BCMA với BCMA người dạng monome theo SPR

Kháng thể đơn dòng	$K_{\text{kết hợp}}$ ($\times 10^6$ 1/Ms)	$K_{\text{phân ly}}$ ($\times 10^{-3}$ 1/s)	K_D (nM)
BCMB69	$2,74 \pm 0,02$	$3,95 \pm 0,19$	$1,44 \pm 0,05$
BCMB117	$2,57 \pm 0,21$	$3,42 \pm 0,25$	$1,34 \pm 0,20$
BCMB123	$2,14 \pm 0,04$	$11,0 \pm 1,33$	$5,12 \pm 0,69$
BCMB128	$4,20 \pm 0,13$	$8,70 \pm 0,61$	$2,07 \pm 0,21$
BCMB129	$1,54 \pm 0,06$	$8,43 \pm 0,44$	$5,47 \pm 0,13$
BCMB176	$4,00 \pm 0,05$	$28,8 \pm 1,25$	$7,18 \pm 0,22$
BCMB177	$2,80 \pm 0,22$	$56,6 \pm 5,54$	$20,2 \pm 1,57$

SPR cũng được sử dụng để đo các giá trị ái lực của các kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 với BCMA người và khỉ. Các kết quả trong Bảng 12 biểu thị tất cả mẫu liên kết với các kháng nguyên Fc-BCMA có các ái lực khác nhau. BC3B7 và BC3B9 có các ái lực trong khoảng bằng ái lực của BCMB72 với BCMA người, trong khi các kháng thể đặc hiệu đôi còn lại có ái lực yếu hơn gấp 2-3 lần khi so với BCMB72. Đối với Fc-BCMA khỉ, BC3B7 và BC3B9 có ái lực chặt hơn gấp 2-3 lần so với BCMB72 (K_D lần lượt là 0,65-0,37 nM), trong khi các kháng thể đơn dòng còn lại có ái lực liên kết tương tự như BCMB72 ($K_D \sim 0,8$ -1,2 nM). Để đánh giá khả năng tái lập dữ liệu, tất cả mẫu được chạy ít nhất theo bộ ba và độ lệch chuẩn được báo cáo.

Bảng 12. Các ái lực liên kết của các kháng thể BCMA x CD3 với Fc-BCMA theo SPR

BCMA x CD3	Fc-BCMA	$k_{\text{kết hợp1}}$ ($\times 10^6$ 1/Ms)	$k_{\text{phân ly1}}$ ($\times 10^{-3}$ 1/s)	K_{D1} (nM)	$k_{\text{kết hợp2}}$ ($\times 10^{-3}$ 1/s)	$k_{\text{phân ly2}}$ ($\times 10^{-4}$ 1/s)	K_D cuối (nM)
BCMB72 (B69 x B219)	Người	$1,35 \pm 0,11$	$2,08 \pm 0,80$	$1,51 \pm 0,45$	$6,56 \pm 1,27$	$2,79 \pm 0,55$	$0,06 \pm 0,01$
	Khỉ	$1,26 \pm 0,12$	$4,83 \pm 0,28$	$3,87 \pm 0,57$	$1,06 \pm 0,10$	$7,85 \pm 1,04$	$1,65 \pm 0,26$

BC3B7	Người	1,48±0,09	1,58±0,30	1,07±0,20	4,97±0,67	2,94±0,54	0,06±0,01
(B117 x B219)	Khí	1,38±0,07	4,17±0,19	3,04±0,25	1,50±0,06	4,15±0,53	0,65±0,04
BC3B8	Người	1,35±0,08	1,23±0,24	0,91±0,16	3,13±0,48	5,94±0,82	0,14±0,01
(B123 x B219)	Khí	1,09±0,05	7,34±0,21	6,77±0,48	1,94±0,08	3,26±0,43	0,97±0,09
BC3B9	Người	2,58±0,14	2,05±0,75	0,79±0,25	5,06±1,12	3,64±0,36	0,05±0,01
(B128 x B219)	Khí	2,18±0,06	4,23±0,23	1,94±0,14	1,60±0,09	3,76±0,52	0,37±0,04
BC3B10	Người	1,02±0,07	1,55±0,31	1,50±0,22	4,53±0,64	5,31±1,20	0,16±0,03
(B129 x B219)	Khí	0,93±0,04	6,36±0,28	6,84±0,48	1,65±0,07	3,59±0,50	1,22±0,17
BC3B11	Người	2,26±0,16	1,32±0,15	0,58±0,07	2,52±0,32	6,89±1,17	0,12±0,02
(B176 x B219)	Khí	1,93±0,10	6,83±0,11	3,56±0,23	1,47±0,04	3,95±0,76	0,75±0,11
BC3B12	Người	1,78±0,09	1,29±0,05	0,72±0,05	1,29±0,15	5,57±0,38	0,22±0,03
(B177 x B219)	Khí	1,48±0,10	8,31±0,30	5,65±0,46	1,46±0,07	3,37±0,43	1,06±0,15

Các ái lực liên kết của kháng thể đặc hiệu đôi kháng BCMA x CD3 (BCMB72) với các protein BCMA dung hợp Fc (người, khí và chuột) được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng hệ thống Biacore T200 (GE Healthcare, NJ).

Các tế bào theo dòng 2, 3 và 4 của chip cảm biến được dẫn xuất streptavidin (GE Healthcare, Prod# BR-1005-31) lần lượt được cố định với BCMA người, khí hoặc chuột dung hợp Fc được biotin hóa (các mức cố định BCMA trong khoảng 12-16 đơn vị đáp ứng (RU); protein Fc-BCMA: người (R&D Systems; Prod# 193-FC), khí (tại chỗ; Cat# BCMW6.001) và chuột (R&D Systems; Prod# 593-BC) được biotin hóa tại chỗ). Không cố định protein trên tế bào theo dòng 1 và không sử dụng làm bề mặt tham chiếu. Các thí nghiệm động học liên kết được thực hiện ở 25°C trong dung dịch đệm đang chảy (PBS pH 7,4, P20 0,005%, EDTA 3 mM). BCMB72 được điều chế trong dung dịch đệm đang chảy nồng độ bắt đầu từ 100 nM đến 0,16 nM khi pha loãng gấp 5 lần. Các dung dịch này được tiêm trong 5 phút (pha kết hợp) với lượng 50 µL/phút và sự phân ly được theo dõi trong 15 phút theo dung dịch đệm đang chảy. Bề mặt chip được tái tạo bằng những lần tiêm glyxin (pH 1,5) với thời gian ngắn và dung dịch đệm đang chảy với lượng 100 µL/phút. Phân tích động học liên kết của các tương tác BCMB72 với Fc-BCMA được thực hiện bằng cách tham chiếu kép dữ liệu bằng cách loại trừ các đường cong được tạo bằng việc tiêm dung dịch đệm ra khỏi các

đường cong về tiêm chất phân tích. Sự phù hợp động học chung của các sensorgram (đồ thị về các đáp ứng theo thời gian trong nghiên cứu cộng hưởng plasmon bề mặt) được thực hiện bằng mô hình liên kết hai tình trạng (Two-State) sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 (GE Healthcare, NJ). Các kết quả về ái lực liên kết từ mô hình liên kết hai tình trạng cho các loại BCMA khác nhau được báo cáo dưới dạng phức thứ nhất (K_{D1}) và phức cuối (K_D) (Hình 5).

Ví dụ 10: Hoạt hóa tế bào T đặc hiệu đích và hiệu lực gây độc tế bào của các kháng thể BCMA x CD3 với sự có mặt các dòng tế bào bất tử của nền đa u tủy

Sự hoạt hóa các tế bào T qua trung gian các kháng thể BCMA x CD3 được đánh giá. Mô tả ngắn gọn, BCMB72 (BCMA x CD3) và các kháng thể đối chứng (BCMA x bất hoạt và bất hoạt x CD3) được pha loãng đến khi đạt nồng độ 800 $\mu\text{g/ml}$ 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 tế bào đích được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 không có kháng sinh được bổ sung GlutaMAX, FBS 10% và HEPES 25 mM (môi trường nuôi cấy). Vào ngày thiết lập (Ngày 1), các tế bào đích được đếm và 10 triệu tế bào được ly tâm với tốc độ 1350 vòng/phút trong 3 phút, sau đó, các lớp bề mặt được loại bỏ. Thuốc nhuộm để nhận biết sự tăng sinh CellTrace FCSE được tái tạo trong 18 μl DMSO vô trùng và 1 μl dung dịch được pha loãng trong 10 ml PBS vô trùng. Các viên tế bào được tái huyền phù trong 1 ml dung dịch pha loãng CFSE và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 8 phút, tránh ánh sáng trực tiếp. 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 khi đạt nồng độ $2,2 \times 10^5/\text{ml}$ và được ủ ở 37°C đến khi sử dụng.

Các tế bào T pan từ những người hiến tặng bình thường được rã đông trong bể điều nhiệt 37°C , sau đó, tế bào của các lọ đông lạnh được chuyển sang các lọ hình nón 50 ml và được tái tạo trong 15 ml môi trường nuôi cấy lạnh. Sau đó các tế bào được ly tâm với tốc độ 1350 vòng/phút ở 4°C trong 3 phút. Các lớp bề mặt được loại bỏ và các viên tế bào được tái tạo trong 5 đến 10 ml môi trường nuôi cấy. Các tế bào T được đếm

và khả năng sống sót được ghi lại. Sau đó các tế bào được tái tạo trong môi trường nuôi cấy đến khi đạt nồng độ $1,1 \times 10^6/\text{ml}$.

2×10^5 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. 1×10^5 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 BCMA x CD3 được thêm vào mỗi lỗ. Các đĩa được ủ ở 37°C với CO_2 5% trong 48 giờ.

Hai ngày sau, các đĩa được ly tâm với tốc độ 1350 vòng/phút trong 3 phút ở 4°C và 100 μl lớp bề mặt được chuyển sang đĩa riêng và được 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.

Hình 8 cho thấy BCMB72 thúc đẩy sự hoạt hóa tế bào T đặc hiệu đích một cách nhất quán, được đánh giá theo sự tăng biểu hiện CD25 trên bề mặt tế bào T. Chất ức chế Fc được sử dụng để ngăn chặn liên kết phụ thuộc thụ thể Fc của các kháng thể với các tế bào đích. Nói chung, các điểm dữ liệu được căn chỉnh chặt chẽ theo đường cong phù hợp đã tạo và có ít thay đổi giữa những người hiến tặng tế bào T. Đạt được sự hoạt hóa tối đa là 45 - 85% cho các tế bào BCMA⁺ và 4 - 10% (tương đương với các mức nền) cho các tế bào BCMA⁻. Tổng hợp các giá trị hoạt hóa tế bào T tối đa và EC₅₀ từ hai thí nghiệm độc lập sử dụng tế bào T từ nhiều người hiến tặng bình thường được trình bày trong Hình 9.

Hình 10 cho thấy BCMB72 có cơ chế gây độc tế bào mạnh, nhất quán đối với các dòng tế bào BCMA⁺. Chất ức chế Fc được sử dụng để ngăn chặn liên kết phụ thuộc thụ thể Fc của BCMB72 với các tế bào đích. Nói chung, các điểm dữ

liệu được căn chỉnh chặt chẽ theo đường cong phù hợp đã tạo và có ít thay đổi giữa những người hiến tặng tế bào T. Đạt được sự ly giải tối đa là 62 – 97% cho các tế bào BCMA⁺ và 4 – 18% cho các tế bào BCMA⁻. Tổng hợp các giá trị ly giải tối đa và EC₅₀ từ hai thí nghiệm độc lập sử dụng tế bào T từ nhiều người hiến tặng bình thường được trình bày trong Hình 11.

Sáu kháng thể BCMA X CD3 khác biểu thị cơ chế gây độc tế bào tối đa là 83 đến 93% (Hình 12A) và sự hoạt hóa tế bào T trong khoảng 74 đến 83% cho các tế bào H929 BCMA⁺ sử dụng tế bào T từ hai người hiến tặng khác nhau (Hình 12B). Sáu phân tử kháng thể BCMA x CD3 này có khả năng tiêu diệt tế bào đích BCMA⁺ với giá trị EC₅₀ trong khoảng từ 0,04 đến 0,09 nM.

Ví dụ 11: Hiệu quả liên kết của BCMB72 trên các dòng tế bào BCMA+

Các giá trị EC₅₀ của liên kết BCMB72 với các dòng tế bào BCMA⁺ khác nhau có nền ác tính được đánh giá. Mô tả vắn tắt, kháng thể đặc hiệu đôi BCMB72 (BCMA x CD3) được pha loãng đến khi đạt nồng độ 750 µg/ml trong PBS. Sự chuẩn độ được chuẩn bị trong các dung dịch pha loãng tuần tự gấp 3 lần trong PBS trong đĩa có đáy chữ U 96 lỗ. Cột cuối cùng chỉ còn lại PBS (đối chứng chất mang).

Các tế bào đích H929 được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 không có kháng sinh được bổ sung GlutaMAX, FBS 10% và HEPES 25 mM (môi trường nuôi cấy). Để xét nghiệm, mật độ tế bào đích và khả năng sống sót được đo và sau đó các tế bào được ly tâm với tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Sau đó các viên tế bào được rửa trong 10 ml PBS và được ly tâm lại với tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút. Các tế bào được tái huyền phù trong PBS với mật độ 5,5x10⁵ tế bào/ml và 90 µl huyền phù tế bào được phân chia cho mỗi lỗ của đĩa có đáy chữ U 96 lỗ, tiếp theo là 10 µl/lỗ dung dịch pha loãng BCMB72. Các đĩa được ủ ở 4°C trong 1 giờ trong bóng tối, sau đó được ly tâm với tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút và các lớp bề mặt được loại bỏ. Các viên tế bào được rửa hai lần trong 200 µl dung dịch đệm FACS. Kháng thể thứ cấp được gắn nhãn PE kháng Fc IgG4 người được hòa tan trong dung dịch đệm FACS với tỷ lệ 1:25 và 50 µl hỗn hợp được thêm vào các lỗ tương ứng. Các mẫu được ủ trong 20 phút ở 4°C, được rửa trong dung dịch đệm FACS theo mô tả trên, và được tái tạo trong 150 µl dung dịch đệm FACS để phân

tích trên FACSCanto II. Dữ liệu được phân tích bằng FlowJo 7.6 về liên kết BCMB72 và 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 sử dụng phương pháp bình phương tối thiểu.

Như trong Hình 6, BCMB72 có thể liên kết với tất cả các dòng tế bào BCMA+ được kiểm tra. EC_{50} của liên kết với các tế bào H929 là 14,7 nM, với các tế bào MM.1R là 9,74 nM, với các tế bào EJM là 17,5 nM, với các tế bào LP1 là 22,3 nM và với các tế bào U-2932 là 7,92 nM.

Ví dụ 12: Phân tích biểu hiện BCMA và liên kết BCMB72 trong máu toàn phần ở ngoài cơ thể sống từ những người hiến tặng bình thường

Biểu hiện của BCMA và liên kết BCMB72 trên bạch cầu được đánh giá trong máu toàn phần ở ngoài cơ thể sống từ ba người hiến tặng bình thường. Mô tả ngắn gọn, máu ngoại vi tươi từ những người hiến tặng bình thường được lưu giữ trong các ống được phủ heparin trước khi thí nghiệm. Máu được hút vào trong đĩa có đáy chữ U 96 lỗ theo các phần 100 μ l. Các kháng thể nhuộm được điều chế trong master mix, như đã nêu trong bảng tính thí nghiệm. Master mix được bổ sung trực tiếp vào máu, cùng với các kháng thể kháng BCMA hoặc BCMB72. Sau 30 phút ủ ở nhiệt độ phòng, đĩa có máu được ly tâm với tốc độ 1350 vòng/phút trong 3 phút ở 4°C. Huyết tương trên bề mặt được loại bỏ và các viên tế bào trải qua bốn vòng ly giải RBC liên tiếp, với 5 phút ủ giữa mỗi lần rửa. Sau khi ly giải hoàn tất, các viên tế bào được rửa một lần với PBS và sau đó được nhuộm trong PBS với thuốc nhuộm near-IR phân biệt tế bào sống/chết với tỷ lệ 1:200 và PE kháng IgG4 với tỷ lệ 1:50 (chỉ dành cho các lỗ chứa BCMB72). Các đĩa được ủ thêm trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các mẫu được rửa với 200 μ l dung dịch đệm FACS và cuối cùng được tái tạo trong 150 μ l dung dịch đệm FACS để phân tích trên LSRT Fortessa. Gần 100.000 trường hợp được thu thập từ mỗi lỗ. Việc phân tích được thực hiện trong FlowJo 7.6.

Theo Hình 7, không quan sát được biểu hiện BCMA nào trên các lympho bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt hoặc các DC tương bào ở ba người hiến tặng bình thường. BCMB72 thể hiện sự liên kết với các tế bào T CD3+ ở cả ba người hiến tặng với cường độ thay đổi giữa những người hiến tặng. BCMB72 không liên kết với các loại tế bào khác được thử nghiệm trong xét nghiệm này.

Ví dụ 13: Tác dụng BCMB72 đối với mức cytokin

Mức cytokin ở lớp bề mặt từ các xét nghiệm tiêu diệt qua trung gian tế bào T được đánh giá, sử dụng BCMB72 và các kháng thể đối chứng. Các tế bào T và kháng thể được đặt vào đĩa như trong xét nghiệm về cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T (xem Ví dụ 10). Sau khi ủ 48 giờ, các lớp bề mặt của tế bào được thu thập và các cytokin khác nhau (10/30 Plex) được đo bằng ELISA dựa trên MSD. Các mức cytokin được biểu hiện theo pg/mL và 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). Các giá trị EC_{50} của sáu cytokin từ dòng tế bào RPMI8226 của sáu người hiến tặng tế bào T được trình bày trong Hình 13. Dữ liệu biểu thị sự phóng thích cytokin đáng kể nhờ sự hoạt hóa tế bào T. Không quan sát được/quan sát được mức phóng thích cytokin thấp với các kháng thể đối chứng (dữ liệu không được trình bày).

Ví dụ 14: So sánh chức năng của BCMB72 được tạo từ HEK và CHO (các dòng tế bào tạm thời & ổn định) trong hoạt hóa tế bào T và cơ chế tiêu diệt tế bào đích qua trung gian tế bào T

Các kháng thể đặc hiệu đôi được tạo trong các tế bào khác nhau và theo các dạng biểu hiện khác nhau có thể khác nhau về hoạt tính. Theo đó, hiệu lực *trong ống nghiệm* của BCMB72 được tạo trong các tế bào HEK (biểu hiện tạm thời) hoặc CHO (biểu hiện tạm thời hoặc ổn định) được đánh giá.

BCMB72 được pha loãng đến khi đạt nồng độ 800 µg/ml trong PBS. Như đã nêu trong mỗi thí nghiệm, sự chuẩn độ được chuẩn bị trong các dung dịch pha loãng tuần tự gấp 3 hoặc 4 lần trong PBS trong đĩa có đáy chữ U 96 lỗ. Cột cuối cùng chỉ còn lại PBS (đối chứng chất mang).

Các tế bào đích H929 được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 không có kháng sinh được bổ sung GlutaMAX, FBS 10% và HEPES 25 mM (môi trường nuôi cấy). Vào ngày thiết lập (Ngày 1), các tế bào được đếm và 10 triệu tế bào được ly tâm với tốc độ 1350 vòng/phút trong 3 phút và các lớp bề mặt được loại bỏ. Thuốc nhuộm để nhận biết sự tăng sinh CellTrace FCSE được tái tạo trong 18 µl DMSO vô trùng và 1 µl dung dịch được pha loãng trong 10 ml PBS vô trùng. Viên tế bào H929 được tái huyền phù trong 1 ml dung dịch pha loãng CFSE và được ủ ở nhiệt độ

phòng trong 8 phút, tránh ánh sáng trực tiếp. 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 khi đạt nồng độ chỉ định và được ủ ở 37°C đến khi sử dụng.

Các tế bào T từ những người hiến tặng bình thường được rửa đông trong bể điều nhiệt 37°C, sau đó, tế bào của lọ được chuyển sang lọ hình nón 50 ml và được tái tạo trong 15 ml môi trường nuôi cấy lạnh. Sau đó các tế bào được ly tâm với tốc độ 1350 vòng/phút ở 4°C trong 3 phút. Các lớp bề mặt được loại bỏ và các viên tế bào được tái tạo trong 5 đến 10 ml môi trường nuôi cấy. Các tế bào T được đếm và được tái tạo trong môi trường nuôi cấy đến khi đạt nồng độ phù hợp (xem bảng tính cho mỗi thí nghiệm).

Các tế bào H929 được thêm vào các lỗ, tiếp theo là các tế bào T (tỷ lệ tế bào thực thi:tế bào đích là 5:1). Trong nhóm nghiên cứu này, chất ức chế Fc không được sử dụng. Sau khi trộn các tế bào đích và tế bào T, 20 µl dung dịch pha loãng BCMB72 được thêm vào mỗi lỗ. Các đĩa được ủ ở 37°C với CO₂ 5% trong 48 giờ. Sau 2 ngày, các đĩa chứa tế bào được ly tâm và các lớp bề mặt được loại bỏ hoặc lưu trữ 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 chạy theo phương pháp đo và đếm tế bào theo dòng trong cùng ngày bằng cách sử dụng FACSCanto II và được phân tích trong 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) và phương pháp bình phương tối thiểu.

Theo Hình 14, BCMB72 được tạo trong các tế bào HEK và được tạo trong các tế bào CHO thực hiện gần như đồng nhất trong xét nghiệm chuyển hướng tế bào T về cơ chế gây độc tế bào đối với các tế bào đích và tính kích thích đối với các tế bào T. Thông thường sự tiêu diệt tối đa đạt được là 85% và sự hoạt hóa tế bào T là 80%. Các giá trị EC₅₀ trung bình của cơ chế gây độc tế bào là 0,29 nM cho

BCMB72 được tạo trong các tế bào HEK và 0,42-0,47 nM cho BCMB72 được tạo trong các tế bào CHO. Các giá trị EC_{50} trung bình của sự hoạt hóa tế bào T là 0,28 nM cho BCMB72 được tạo trong các tế bào HEK và 0,37-0,41 nM cho BCMB72 được tạo trong các tế bào CHO. Phân tích so sánh sử dụng kiểm định T Student cho thấy không có ý nghĩa thống kê giữa các giá trị EC_{50} .

Ví dụ 15: Hoạt hóa sự phát tín hiệu P38 bằng BCMB72

Cả BAFF và APRIL đều liên kết với hai thụ thể BCMA (kháng nguyên trưởng thành tế bào B, TNFRSF 17) và TACI (chất hoạt hóa xuyên màng và chất tương tác CAML, TNFRSF 13b). Sự gắn kết BCMA đã hoạt hóa đường phát tín hiệu MAPK P38 và JNK. Có khả năng kháng thể đặc hiệu đôi BCMA X CD3, BCMB72, có thể gây ra tác dụng đối kháng đối với BCMA. Nghiên cứu này bao gồm hai phần. 1. Phát triển xét nghiệm phân tích simple western nhằm theo dõi các thay đổi MAPK P38a trong các tế bào H929 hoặc MM1.R sau khi xử lý bằng APRIL hoặc BAFF. 2. Sử dụng xét nghiệm mới được phát triển để kiểm tra BCMB72 có tác dụng đối kháng đối với BCMA hay không.

Xử lý tế bào

Các tế bào H929 hoặc MM1.R được gieo mầm với mật độ $1,5 \times 10^6$ /ml trong môi trường RPMI không có huyết thanh trong 24 giờ ở 37°C khi có mặt CO_2 5% trước khi xử lý. Vào ngày xử lý, các tế bào được quay để đổ xuống và được tái huyền phù trong RPMI không huyết thanh với mật độ $1,5 \times 10^6$ /ml. Đối với xét nghiệm theo quy trình thời gian, các tế bào được phân chia thành 5 ml cho mỗi ống trong 10 ống. Mỗi ống tế bào được xử lý với APRIL nồng độ 1000 ng/ml (R&D Systems mã danh mục 5860-AP-010) hoặc BAFF nồng độ 1000 ng/ml (R&D Systems mã danh mục 2149-BF-010) lần lượt trong 0, 5, 15, 30 và 60 phút ở 37°C khi có mặt CO_2 5%. Sau khi ủ, các tế bào được tạo viên ngay lập tức và được làm đông lạnh trong -80°C để tạo dung dịch thủy phân tế bào. Đối với xét nghiệm về tác dụng đối kháng BCMB72, các nhóm xử lý tế bào H929 được liệt kê trong Bảng 13. Xét nghiệm tác dụng đối kháng BCMB72 được thực hiện hai lần.

Bảng 13. Các nhóm xử lý cho xét nghiệm về tác dụng đối kháng BCMB72

Mẫu	Xử lý (15 phút)
1	APRIL 0 ng/ml
2	APRIL 1000 ng/ml
3	BAFF 0 ng/ml
4	BAFF 1000 ng/ml
5	BCMB72 0 ng/ml
6	BCMB72 10 ng/ml
7	BCMB72 100 ng/ml
8	BCMB72 1000 ng/ml
9	BCMB72 10000 ng/ml

Điều chế dung dịch thủy phân tế bào cho phân tích Simple Western

Các tế bào được ly giải với dung dịch đệm RIPA, chứa các chất ức chế phosphatase và protease. Nồng độ protein được đo trên thiết bị đọc đĩa vi thể SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) sử dụng xét nghiệm protein DC BioRad (BioRad # 500-0112) và các mẫu albumin huyết thanh bò.

Phân tích Simple Western

Các phân tích Simple Western được thực hiện với Wes-Rabbit (12-230 KDa) Master kit (ProteinSimple # PS-MK01) theo hướng dẫn sử dụng ProteinSimple. Mô tả ngắn gọn, các mẫu dung dịch thủy phân tế bào được kết hợp với master mix đến khi đạt nồng độ cuối của 1x dung dịch đệm mẫu, các mức 1x khối lượng phân tử huỳnh quang, và dithiothreitol 40 mM (DTT) và sau đó được gia nhiệt ở 95°C trong 5 phút. Các mẫu, thuốc thử ức chế, kháng thể sơ cấp phospho-p38 MAPK (ThermoFisher: VWR# MA5-15182) hoặc Actin-beta (Cell Signaling, # 8457S), kháng thể thứ cấp tiếp hợp HRP, cơ chất phát quang hóa học, và các thành phần nền tách và xếp chồng cũng được phân bổ cho các lỗ chỉ định trong các đĩa vi thể Simple Wes. Sau khi cho vào đĩa, các bước điện di phân tách và phát hiện miễn dịch diễn ra trong hệ thống mao dẫn và được tự động hoàn toàn. Trong quá trình điện di, các protein được tách trên cơ

sở khối lượng phân tử thông qua thành phần nền xếp chồng và phân tách và được cố định trên vách mao dẫn bằng hóa học thu nạp quang hoạt độ quyền. Các kháng thể sơ cấp được pha loãng với tỷ lệ 1:50 với chất pha loãng kháng thể II (ProteinSimple #042-203). Các protein đích được dò miễn dịch bằng các kháng thể sơ cấp trong 60 phút, tiếp theo là các kháng thể thứ cấp tiếp hợp HRP. Phân tích Simon-simple Western được thực hiện ở nhiệt độ phòng, và các thiết lập mặc định của thiết bị được sử dụng. Ảnh số được phân tích bằng phần mềm Compass (ProteinSimple), và dữ liệu định lượng về protein được phát hiện được báo cáo theo khối lượng phân tử, cường độ tín hiệu/đỉnh, và vùng đỉnh.

Kết quả

Theo thông tin thu được từ nghiên cứu theo quy trình thời gian, xét nghiệm về đối kháng BCMB72 được thực hiện với các tế bào H929 bằng cách sử dụng điểm cuối của giai đoạn ủ 15 phút. Các tín hiệu MAPK p38 được chuẩn hóa bằng các tín hiệu beta Actin người. Giá trị trung bình của các tín hiệu MAPK p38 được chuẩn hóa từ hai xét nghiệm được trình bày trong Hình 15. Xét nghiệm về đối kháng BCMB72 cho thấy rằng BCMB72 không có tác dụng đối kháng đối với BCMA trong các tế bào H929.

Ví dụ 16: Phát tín hiệu NFκB bằng BCMB72

BCMA là thụ thể bề mặt có thể gây ra sự phát tín hiệu NF-κB để đáp ứng các phối tử nội sinh. Tác dụng của liên kết BCMB72 với BCMA trong việc hoạt hóa đường phát tín hiệu NF-κB được đánh giá bằng cách sử dụng dòng tế bào chỉ thị biểu hiện BCMA biểu hiện phosphatase kiềm (SEAP) trong vùng khởi động NFκB.

Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM được bổ sung GlutaMAX và FBS 10% (môi trường nuôi cấy). Vào buổi tối trước khi thí nghiệm, các tế bào được thu thập bằng cách trypsin hóa (5 phút trong trypsin 0,25% được làm ấm trước ở 37°C) và được rửa trong 30 ml môi trường nuôi cấy. Sau đó các tế bào được ly tâm với tốc độ 1.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C và được tái tạo trong DMEM không có huyết thanh (với GlutaMax) với mật độ $2,5 \times 10^5$ tế bào/ml. 5×10^4 tế bào được cho vào các lỗ của đĩa có đáy bằng gồm 96 lỗ và được ủ ở 37°C trong 16 giờ.

Sáng hôm sau, các thuốc thử kích thích khác nhau (TNF α , APRIL, BCMB72) được cho vào các lỗ tương ứng (xem sơ đồ đĩa thí nghiệm) và các đĩa được ủ ở 37°C thêm 16 giờ, 24 giờ hoặc 48 giờ, lần lượt là các thời điểm phát tín hiệu đầu, giữa và cuối. Sau mỗi thời điểm, 10 μ l môi trường nuôi cấy được xử lý được thu thập từ các lỗ, được chuyển sang đĩa cứng 96 lỗ được cung cấp trong bộ kit SEAP (Cayman, 600272), và đậy nắp lại. Các mẫu SEAP được điều chế bằng cách pha loãng mẫu khối (5 U/ml) 1:10 trong DMEM không huyết thanh (với GlutaMax) và sau đó điều chế dung dịch pha loãng tuần tự với tỷ lệ 1:2; khoảng pha loãng là 50-0,78 mU/ml. Đĩa có các mẫu được ủ ở 65°C trong 30 phút để làm mất hoạt tính phosphatase kiềm nội sinh; SEAP biểu hiện trong xét nghiệm này là ổn định trong các điều kiện ủ này. 10 μ l dung dịch pha loãng mẫu được cho vào các lỗ thích hợp sau khi các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng. 50 μ l dung dịch cơ chất được cho vào tất cả lỗ và các mẫu được trộn nhanh để phân bố dung dịch trong các lỗ. Các mẫu được ủ trong 20-30 phút và sự phát quang hóa học được đánh giá bằng thiết bị đọc đĩa PerkinElmer EnVision 2104 Multilabel Reader. Tất cả chỉ số phát quang được chuyển đổi thành nồng độ đơn vị hoạt tính dựa trên đường cong chuẩn và các giá trị được phân tích trong Microsoft Excel 2010 và được nhập vào Graph Prism 6 để phân tích đồ thị.

Hình 16 chứng minh rằng trong khi APRIL có thể kích thích BCMA ở các nồng độ thấp như 0,46 nM, nhìn chung, BCMB72 không hoạt hóa đường phát tín hiệu NF- κ B trong các tế bào chuyển nhiễm BCMA ở các nồng độ thấp hơn 10 nM. Quan sát thấy sự hoạt hóa phụ thuộc BCMB72 ở mức khiêm tốn ở các nồng độ BCMB72 cao (44-133 nM).

Ví dụ 17: Tác dụng của việc bổ sung ngoại sinh miền ngoại bào của BCMA đối với sự hoạt hóa tế bào T khi không có các tế bào đích

Miền ngoại bào (ECD) BCMA có thể tạo các trimer trong dung dịch. Vì vậy, có khả năng nhiều kháng thể đặc hiệu đôi có thể liên kết với các trimer ECD BCMA và các phức TCR liên kết chéo khi không có các tế bào đích. Điều này ngược lại có thể hoạt hóa các tế bào T theo kiểu không phụ thuộc đích. Nghiên cứu này đã kiểm tra liệu ECD được bổ sung ngoại sinh của BCMA có thể hoạt hóa tế bào T ở mức biểu hiện CD25 mà không tương tác với các tế bào đích hay không.

BCMB72 (BCMA x CD3) và đối chứng (bất hoạt x CD3) được pha loãng đến khi đạt nồng độ 800 $\mu\text{g/ml}$ trong PBS. Sự chuẩn độ được chuẩn bị trong các dung dịch pha loãng tuần tự gấp 3 lần trong PBS trong đĩa có đáy chữ U 96 lỗ. Cột cuối cùng chỉ còn lại PBS (đối chứng chất mang).

ECD BCMA tan (sBCMA) được pha loãng đến khi đạt nồng độ 36 $\mu\text{g/ml}$ (6,67 μM) trong PBS. Sự chuẩn độ được chuẩn bị trong các dung dịch pha loãng tuần tự gấp 3 lần trong PBS trong đĩa có đáy chữ U 96 lỗ. Lỗ trên cùng chỉ còn lại PBS (đối chứng chất mang).

Các tế bào T pan từ người hiến tặng bình thường được rửa đông trong bể điều nhiệt 37°C, sau đó, tế bào của các lọ đông lạnh được chuyển sang các lọ hình nón 50 ml và được tái tạo trong 30 ml môi trường nuôi cấy lạnh. Sau đó các tế bào được ly tâm với tốc độ 1350 vòng/phút ở 4°C trong 3 phút. Các lớp bề mặt được loại bỏ và các viên tế bào được tái tạo trong 10 ml môi trường nuôi cấy. Các tế bào T được đếm và khả năng sống sót được ghi lại. Say đó các tế bào được tái tạo trong môi trường nuôi cấy đến khi đạt $0,525 \times 10^6/\text{ml}$.

1×10^5 tế bào T (190 μl) được cho vào các lỗ, tiếp theo là 5 μl dung dịch pha loãng BCMA tan và 5 μl dung dịch pha loãng BCMB72. Các đĩa được ủ ở 37°C với CO₂ 5% trong 48 giờ.

Sau hai ngày, các đĩa được ly tâm với tốc độ 1500 vòng/phút trong 3 phút ở 4°C và các lớp bề mặt được loại bỏ. Các viên 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 FACSCanto II và FlowJo 7.6 về 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 phương pháp bình phương tối thiểu.

Các tế bào T từ những người hiến tặng bình thường không biểu hiện sự hoạt hóa qua trung gian ECD BCMA tan khi có BCMB72. Sự hoạt hóa yếu với phần trăm tế bào T thấp (10-15%) quan sát được ở các nồng độ BCMB72 cao (>40 nM) theo kiểu không phụ thuộc BCMA tan (Hình 17).

Ví dụ 18: Tác dụng của ECD tan của BCMA, APRIL, và BAFF đối với sự hoạt hóa tế bào T và cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc BCMB72

ECD BCMA tan có thể hoạt động với vai trò là chỗ chứa đối với các kháng thể BCMA x CD3, trong khi APRIL và BAFF có thể là các chất ức chế cạnh tranh đối với sự tương tác giữa thụ thể bề mặt và các kháng thể BCMA x CD3. Tác dụng của ECD BCMA tan và APRIL và BAFF phối tử nội sinh đối với hiệu lực gây độc tế bào *trong ống nghiệm* của cơ chế tiêu diệt tế bào phụ thuộc BCMB72 được đánh giá trong xét nghiệm chuyển hướng tế bào T sử dụng dòng tế bào bắt tử H929 và các tế bào T pan từ người hiến tặng bình thường M7077.

BCMB72 được pha loãng đến khi đạt nồng độ 800 µg/ml trong PBS. Sự chuẩn độ được chuẩn bị trong các dung dịch pha loãng tuần tự gấp 3 lần trong PBS trong đĩa có đáy chữ U 96 lỗ. Cột cuối cùng chỉ còn lại PBS (đối chứng chất mang). ECD BCMA tan được pha loãng đến khi đạt nồng độ 9 µg/ml và APRIL và BAFF được pha loãng đến khi đạt nồng độ 10 µg/ml. Sự chuẩn độ cho cả hai thuốc thử được thực hiện trong các dung dịch pha loãng tuần tự gấp 3 lần trong PBS trong đĩa có đáy chữ U 96 lỗ.

Các tế bào đích H929 được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 không có kháng sinh được bổ sung GlutaMAX, FBS 10% và HEPES 25 mM (môi trường nuôi cấy). Vào ngày thiết lập (Ngày 1), các tế bào đích được đếm và 10 triệu tế bào được ly tâm với tốc độ 1350 vòng/phút trong 3 phút, sau đó, các lớp bề mặt được loại bỏ. Thuốc nhuộm để nhận biết sự tăng sinh CellTrace FCSE được tái tạo trong 18 µl DMSO vô trùng và 1 µl dung dịch được pha loãng trong 10 ml PBS vô trùng. Các viên tế bào được tái huyền phù trong 1 ml dung dịch pha loãng CFSE và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 8 phút, tránh ánh sáng trực tiếp. 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 khi đạt nồng độ $2,2 \times 10^5$ /ml và được ủ ở 37°C đến khi sử dụng.

Các tế bào T pan từ người hiến tặng bình thường được rửa đông trong bể điều nhiệt 37°C, sau đó, tế bào của các lọ đông lạnh được chuyển sang các lọ hình nón 50 ml và được tái tạo trong 30 ml môi trường nuôi cấy lạnh. Sau đó các tế bào được ly tâm với

tốc độ 1350 vòng/phút ở 4°C trong 3 phút. Các lớp bề mặt được loại bỏ và các viên tế bào được tái tạo trong 10 ml môi trường nuôi cấy. Các tế bào T được đếm và khả năng sống sót được ghi lại. Sau đó các tế bào được tái tạo trong môi trường nuôi cấy đến khi đạt nồng độ $1,1 \times 10^6/\text{ml}$.

2×10^5 tế bào H929 được cho vào các lỗ của đĩa có đáy chữ U 96 lỗ; không cần thiết ủ với chất ức chế Fc trong nghiên cứu này. 1×10^5 tế bào T được thêm vào các lỗ (tỷ lệ tế bào thực thi:tế bào đích là 5:1). Sau khi trộn các tế bào T và tế bào đích, 20 μl BCMA tan, APRIL hoặc BAFF được cho vào các lỗ, tiếp theo là 5 μl dung dịch pha loãng kháng thể. Các đĩa được ủ ở 37°C với CO₂ 5% trong 48 giờ.

Sau 2 ngày, các đĩa được ly tâm với tốc độ 1500 vòng/phút trong 3 phút ở 4°C và các lớp bề mặt được loại bỏ. 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.

BCMB72 có thể gây ra cơ chế gây độc tế bào trên các tế bào H929 khi có mặt ECD BCMA tan, chỉ với tác dụng nhỏ (tăng gấp 2 lần) lên EC₅₀ ở các liều cao (>160 nM) ECD BCMA tan; sự hoạt hóa tế bào T bị ảnh hưởng tương tự (xem Hình 18A và 18D). APRIL làm tăng các giá trị EC₅₀ của cơ chế gây độc tế bào và sự hoạt hóa tế bào T lên gấp sáu lần ở các liều cao (46 nM), trong khi gây ảnh hưởng tối thiểu đến xét nghiệm ở các liều thấp hơn (xem Hình 18B và 18E). Sự tiêu diệt tế bào tối đa không bị ảnh hưởng bởi BCMA tan hoặc APRIL. Ngược lại, BAFF ngoại sinh không tác động đến cơ chế gây độc tế bào qua trung gian BCMB72 ở các nồng độ lên đến 51 nM (xem Hình 18C). Khả năng hoạt hóa tế bào T trong tất cả trường hợp đều tương quan tốt với dữ liệu tiêu diệt tế bào, như dự kiến (xem Hình 18F).

Ví dụ 19: Sự cạnh tranh của BCMB72, APRIL và BAFF để liên kết với BCMA trong ống nghiệm

Hai phối tử TNF, APRIL và BAFF có thể liên kết với BCMA và cảm ứng tăng phát tín hiệu dẫn đến sự sống sót và tăng sinh tế bào. Theo mô-tip này, miền ngoại bào của BCMA là mảnh 54 axit amin ngăn liên kết với hai phối tử này cũng như các kháng thể được đưa ra. Tại đây, bản chất cạnh tranh của các phối tử này với BCMB72 được đánh giá.

Xét nghiệm được thiết lập theo định dạng dựa trên ELISA. Khi chuẩn bị cho xét nghiệm cạnh tranh, BCMA-Fc được gắn nhãn MSD SulfoTag. Lọ 50 ug BCMA-Fc được tái tạo trong 500 uL PBS để thu 0,1 mg/mL (3,125 uM monome). 150 nmol NHS-sulfoTag được hòa tan trong 50 uL nước để thu dung dịch 3 mM. 5,2 uL NHS-SulfoTag 3 mM (15,6 nmol) được thêm vào 500 uL BCMA-Fc (1,56 nmol monome) cho 10x dung dịch phản ứng gắn nhãn dư. Dung dịch phản ứng được để trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. 50 uL tris 1 M được bổ sung để dập tắt NHS chưa phản ứng. SulfoTag và tris dư được loại bỏ bằng cách trao đổi dung dịch đệm qua cột quay MWCO Zeba 2 mL 7 k được cân bằng PBS. Thể tích cuối là ~630 uL, vì vậy, SulfoTag-BCMA-Fc cuối được sử dụng là 2,5 uM.

Đối với xét nghiệm cạnh tranh, kháng thể kháng BAFF (100 ug) và kháng APRIL (100 ug) được tái tạo trong 200 uL PBS để thu dung dịch gốc nồng độ 0,5 mg/mL. 30 uL (6 ug) từng kháng thể kháng APRIL và kháng BAFF được pha loãng trong 2,97 mL PBS để thu được dung dịch nồng độ 2 ug/mL. 25 uL kháng thể kháng APRIL nồng độ 2 ug/mL được thêm vào mỗi lỗ của đĩa liên kết cao MSD 96 lỗ. 25 uL kháng thể kháng BAFF nồng độ 2 ug/mL được thêm vào mỗi lỗ của đĩa liên kết cao MSD 96 lỗ thứ hai. Các đĩa được giữ qua đêm ở 4°C để cố định các kháng thể. Các đĩa được phủ kháng thể kháng APRIL và kháng BAFF được trút xuống, và SuperBlock được bổ sung với 300 uL/lỗ. Sau 1 giờ ức chế ở nhiệt độ phòng, các đĩa được rửa 3 lần với PBS-T. Mỗi 10 ug APRIL và BAFF tái tổ hợp được tái huyền phù trong 100 uL PBS để thu được dung dịch 0,1 mg/mL. 3 mL mỗi dung dịch APRIL và BAFF nồng độ 2 ug/mL được điều chế bằng cách pha loãng 60 uL protein được tái tạo mới trong 2,94 mL SuperBlock. 25 uL APRIL nồng độ 2 ug/mL được thêm vào mỗi lỗ của đĩa được phủ kháng thể kháng APRIL, và 25 uL BAFF nồng độ 2 ug/mL được thêm vào mỗi lỗ của đĩa được phủ kháng thể kháng

BAFF. Sau 1 giờ thu thập ở nhiệt độ phòng, các đĩa được rửa 3 lần với PBS-T. 500 μ g kháng thể kháng BCMA (R&D Sys Mab193) được tái tạo trong 1 mL PBS để thu được dung dịch gốc dung dịch 0,5 mg/mL (3,3 μ M). Mab193 kháng BCMA, BCMB72.004 và kháng thể đối chứng (bất hoạt x CD3) được pha loãng đến khi đạt nồng độ 1 μ M trong superbloc. Loạt dung dịch pha loãng tuần tự gấp ba lần 11pt được điều chế bằng cách trộn 100 μ L kháng thể trong 200 μ L SuperBlock. 6 mL SulfoTag-BCMA-FC nồng độ 30nM được điều chế bằng cách pha loãng 72 μ L protein nêu trên trong 5,928 mL SuperBlock. 25 μ L từng kháng thể từ bước 11 được cho vào mỗi lỗ của đĩa thu APRIL/BAFF theo sơ đồ đĩa bên dưới trong hình 1. 25 μ L Sulfotag-BCMA-Fc nồng độ 30nM được cho vào mỗi lỗ của cả hai đĩa. Sau 1 giờ ở nhiệt độ phòng, các đĩa được rửa 3 lần với PST-T. 150 μ L dung dịch đệm đọc MSD 1x T được thêm vào mỗi lỗ, và các đĩa được quét trong thiết bị tạo ảnh sector 6000. Thí nghiệm được lặp lại chính xác theo mô tả trên để mang đến tập hợp kết quả độc lập thứ hai.

Như đã thấy trong Hình 19, khi được ủ với lượng BCMB72 tăng nhưng không phải kháng thể đối chứng (bất hoạt x CD3), protein BCMA-Fc bị ngăn chặn liên kết với APRIL và BAFF trên đĩa. Kết quả quan sát là nhất quán giữa hai thí nghiệm độc lập, mỗi thí nghiệm được thực hiện theo bộ ba.

Ví dụ 20: Liên kết của BCMB72 và cơ chế gây độc tế bào đối với tế bào dương tính với CD138 của tủy xương bệnh nhân bị đa u tủy.

Để đánh giá hiệu lực của BCMB72 trong các mẫu sơ cấp từ các bệnh nhân bị đa u tủy, chúng tôi đã thử nghiệm kháng thể này trong xét nghiệm tiêu diệt gây độc tế bào sử dụng các mẫu đa u tủy của tủy xương đông lạnh từ 5 bệnh nhân và các tế bào T từ những người hiến tặng khỏe mạnh. Sự liên kết kháng thể và khả năng hoạt hóa tế bào T cũng được đo.

Xét nghiệm về liên kết của BCMB72

100 μ L huyền phù tế bào được phân chia cho mỗi lỗ trong đĩa có đáy chữ U 96 lỗ, tiếp theo là 95 μ L môi trường nuôi cấy. Sau đó 5 μ L dung dịch pha loãng tuần tự BCMB72 hoặc các đối chứng được thêm vào các lỗ và đĩa được ủ trong 1 giờ ở 4°C. Sau khi nhuộm, các tế bào được ly tâm với tốc độ 1.200 vòng/phút trong 3 phút và

được rửa một lần trong 200 μ l PBS. Các tế bào được ly tâm lần nữa; các lớp bề mặt được loại bỏ sau đó, các viên tế bào được tái tạo trong 50 μ l thuốc nhuộm near-IR phân biệt tế bào sống/chết (tỷ lệ pha loãng 1:200), kháng thể PE kháng Fc IgG4 người (tỷ lệ pha loãng 1:50), kháng thể kháng CD138 (tỷ lệ pha loãng MI15 1:50 và DL-101 1:50) và được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. Sau đó các tế bào được ly tâm và rửa trong 200 μ l dung dịch đệm FACS và cuối cùng được tái tạo trong 150 μ l dung dịch đệm FACS. Các mẫu được phân tích bằng FACSCanto II và FlowJo 7.6 về cường độ liên kết của BCMB72 trên MNC CD138+. Việc 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.

Xét nghiệm chuyển hướng tế bào T

1×10^5 tế bào đích được cho vào các lỗ của đĩa có đáy chữ U 96 lỗ, tiếp theo là 1×10^5 tế bào T (tỷ lệ tế bào thực thi:tế bào đích bằng khoảng 5:1, tạo mức trung bình 20% số lượng tương bào trong các dưỡng bào từ tủy xương). Sau khi các tế bào T và tế bào đích được trộn với nhau, 5 μ l dung dịch pha loãng BCMB72 được cho vào mỗi lỗ. Các đĩa được ủ ở 37°C với CO₂ 5% trong 48 giờ.

Hai ngày sau, các đĩa được ly tâm và các lớp bề mặt được loại bỏ. Các tế bào được rửa trong 200 μ l PBS và được ủ trong 50 μ l PBS với thuốc nhuộm giúp phân biệt tế bào sống/chết near-IR (tỷ lệ pha loãng 1:200), kháng thể kháng CD138 (tỷ lệ pha loãng MI15 1:50 và DL-101 1:50), kháng TCR α/β (tỷ lệ pha loãng 1:50) và 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 μ l dung dịch đệm FACS và cuối cùng được tái tạo trong 150 μ l 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 tương bào (% tế bào CD138+ chết) 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.

Kết quả

Hình 20 biểu thị BCMB72 liên kết và cảm ứng cơ chế tiêu diệt tất cả mẫu của bệnh nhân có phụ thuộc liều lượng sau 48 giờ đã được chứng minh bằng việc mất

các tương bào CD138⁺. Dữ liệu hoạt hóa tế bào T tương quan tốt với dữ liệu tiêu diệt tế bào như dự kiến. EC₅₀ trung bình của sự hoạt hóa tế bào T nằm trong khoảng 1 nM. Dữ liệu này xác nhận rằng BCMB72 có thể tiêu diệt các tế bào tủy xương đa u tủy sơ cấp *trong ống nghiệm*.

Ví dụ 21: Hiệu quả kháng khối u của BCMB72 trong việc ngăn chặn sự tạo u trong các mẫu ghép ngoại lai đa u tủy người H929 ở chuột NSG nhân hóa PBMC

Nghiên cứu này đánh giá hiệu quả của BCMB72 trong việc ngăn chặn sự tạo u trong các mẫu ghép ngoại lai đa u tủy (MM) người H929 ở chuột NSG (NOD SCID Gamma) nhân hóa PBMC (tế bào đơn nhân máu ngoại vi). Chuột NSG là dòng bị suy giảm miễn dịch thiếu các tế bào T, B và tế bào sát thủ tự nhiên (NK) chức năng trưởng thành. Các chuột NSG cái cùng tuổi được tiêm tĩnh mạch 1×10^7 PBMC người vào ngày 7 của nghiên cứu. Vào ngày 1 sau khi cấy PBMC, mỗi chuột được cấy dưới da (sc) các tế bào MM người H929 (5×10^6 tế bào trong 200 μ L PBS) ở sườn lưng phía sau bên phải, tiếp theo là truyền vào tĩnh mạch PBS và BCMB72 0,1 μ g (0,005 mg/kg), 0,5 μ g (0,025 mg/kg) và 1 μ g (0,05 mg/kg) cho mỗi con. Đối chứng PBS và BCMB72 được cho sử dụng hai ngày một lần hoặc ba ngày một lần trong tổng số năm lần điều trị. Các khối u sc H929 có thể sớm được tìm thấy trong các nhóm được điều trị bằng PBS và 0,1 μ g BCMB72 vào ngày 8 sau khi cấy tế bào khối u. Các khối u từ hai nhóm này được tiếp tục phát triển đến khi thể tích khối u trung bình $>500 \text{ mm}^3$ vào ngày 22. Vào ngày 24, thể tích khối u trung bình của nhóm đối chứng PBS đã vượt quá 1000 mm^3 . Điều đáng quan tâm là các khối u H929 sc không phát triển ở chuột được điều trị bằng 0,5 μ g và 1 μ g BCMB72 (Hình 21). Theo đó, BCMB72 đã ức chế sự tạo u trong các mẫu ghép ngoại lai MM người H929 ở tất cả con vật được điều trị với nồng độ 0,5 và 1 μ g/con.

Ví dụ 22: Định lượng BCMA tan trong huyết thanh chuột từ các mẫu ghép ngoại lai (các tế bào đa u tủy người) H929 ở chuột NSG nhân hóa PBMC được điều trị bằng BCMB72

Nghiên cứu này được thiết kế để định lượng các mức BCMA tan trong huyết thanh từ chuột ghép ngoại lai H929 và liên kết các mức BCMA tan với gánh nặng khối u ở các con vật này.

Mô tả ngắn gọn, huyết thanh từ các mẫu nghiên cứu ghép ngoại lai được phân tích bằng xét nghiệm chất hấp phụ miễn dịch gắn với enzym BCMA (ELISA), thu được từ R&D Systems. Huyết thanh được rửa đông và pha loãng với tỷ lệ 1:50 trong chất pha loãng thuốc thử và được ủ qua đêm ở 4°C. ELISA định lượng BCMA được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất. Các đĩa ELISA được phân tích bằng thiết bị đọc đĩa MD SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale CA) được cài đặt ở 450 nm. Mỗi lỗ trong ELISA tương ứng với huyết thanh từ một con chuột trong nghiên cứu mẫu ghép ngoại lai ban đầu.

Có sự giảm nồng độ BCMA tan đáng kể trong huyết thanh chuột được điều trị bằng 1 µg và 0,5 µg BCMB72 so với việc chỉ điều trị bằng PBS hoặc BCMB72 với nồng độ 0,1 µg/chuột (Hình 22). Dữ liệu này hỗ trợ nghiên cứu về ghép ngoại lai, trong đó chuột được điều trị bằng 1 µg và 0,5 µg BCMB72 không phát triển khối u hoặc phát triển khối u ở mức tối thiểu. Các dữ liệu này cho thấy rằng BCMA tan trong các mẫu huyết thanh có thể được coi là dấu ấn sinh học tiềm năng để đánh giá chỉ báo bệnh đa u tủy; việc kiểm tra BCMA tan có thể giúp theo dõi gánh nặng bệnh tật.

Mô tả vắn tắt danh sách liệt kê trình tự

SEQ ID NO:	Loại	Loài	Mô tả	Trình tự
1	PRT	người	BCMA	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQL RCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTN AILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINS EPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRT GDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPK VDSDFHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDY CKSLPAALSATEIEKSISAR
2	PRT	chuột	BCMA	MAQQCFHSEYFDSLLHACKPCHLRCS NPPATCQPYCDPSVTSSVKGTYYTVLWI FLGLTLVLSLALFTISFLLRKMNPALK DEPQSPGQLDGSALDKADTELTRIRA GDDRIFPRSLEYTVEECTCEDCVKSKP KGDSDFHCFPLPAMEEGATILVTTKTGD

				YGKSSVPTALQSVMGMEKPTHTR
3	PRT	khi	BCMA	MLQMARQCSQNEYFDSLHDCCKPCQ LRCSSTPPLTCQRYCNASMTNSVKGM NAILWTCLGLSLIISLAVFVLTFLLRK MSSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLE KGRTGDEIVLPRGLEYTVEECTCEDCI KNKPKVDSDFPLPAMEEGATILVT TKTNDYCNSLSAALSVTEIEKSISAR
4	PRT	người	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, và BCMB129- HCDR1	SGSYFWG
5	PRT	người	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB176, BCMB179, BCMB180, BCMB181, và BCMB182- HCDR2	SIYYSGITYYNPSLKS
6	PRT	người	BCMB69, BCMB117, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124,	HDGAVAGLFDY

			và BCMB129- HCDR3	
7	PRT	người	BCMB121, BCMB122, và BCMB123 HCDR1	SSSYWG
8	PRT	người	BCMB121, BCMB122, BCMB129, BCMB130, BCMB131, và BCMB177- HCDR2	SIYYSGSTYYNPSLKS
9	PRT	người	BCMB118- HCDR3	HDAATAGLFDY
10	PRT	người	BCMB124, BCMB130, và BCMB131- HCDR1	SGSYWG
11	PRT	người	BCMB178, BCMB186, BCMB187, và BCMB188- HCDR2	SIYYSGWTYYNPSLKS
12	PRT	người	BCMB119- HCDR3	HEGATAGLFDY
13	PRT	người	BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187 và	SSSYFWG

			BCMB188-HCDR1	
14	PRT	người	BCMB183, BCMB184 và BCMB185-HCDR2	SIYYSGRTYYNPSLKS
15	PRT	người	BCMB120-HCDR3	HSGATAGLFDY
16	PRT	người	BCMB125 và BCMB131-HCDR3	HEGAVAGLFDY
17	PRT	người	BCMB126-HCDR3	HSGAVAGLFDY
18	PRT	người	BCMB127 và BCMB130-HCDR3	HDAAVAGLFDY
19	PRT	người	BCMB128, BCMB176, BCMB177, và BCMB178-HCDR3	HDGATAGLFDY
20	PRT	người	BCMB179, BCMB183, và BCMB186-HCDR3	HQGATAGLFDY
21	PRT	người	BCMB180, BCMB184, và BCMB187-HCDR3	HHGATAGLFDY
22	PRT	người	BCMB181-HCDR3	HWGATAGLFDY
23	PRT	người	BCMB182, BCMB185, và BCMB188-HCDR3	HYGATAGLFDY

24	PRT	người	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB129, BCMB130, BCMB131, BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187, và BCMB188 - LCDR1	GGNNIGSKSVH
25	PRT	người	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB129, BCMB130,	DDSDRPS

			BCMB131, BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187, và BCMB188 - LCDR2	
26	PRT	người	BCMB69, BCMB117, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB121, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB129, BCMB130, BCMB131, BCMB176, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187, và BCMB188 -	QVWDSSSDHVV

			LCDR3	
27	PRT	người	BCMB69-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGL FDYWGQGTLVTVSSA
28	PRT	người	BCMB69, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB122, BCMB123, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB128, BCMB129, BCMB130, BCMB131, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187, và BCMB188 - VL	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDE AVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL
29	PRT	người	BCMB118-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHDAATAGL FDYWGQGTLVTVSSA
30	PRT	người	BCMB121-VL	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDE ADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL
31	PRT	người	BCMB119-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSI

				YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHEGATA GLFDYWGQGTLVTVSSA
32	PRT	người	BCMB120- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHSGATA GLFDYWGQGTLVTVSSA
33	PRT	người	BCMB121 và BCMB122- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLVTVSSA
34	PRT	người	BCMB123- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLVTVSSA
35	PRT	người	BCMB124- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLVTVSSA
36	PRT	người	BCMB125- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHEGAVA GLFDYWGQGTLVTVSSA
37	PRT	người	BCMB126- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHSGAVA GLFDYWGQGTLVTVSSA
38	PRT	người	BCMB127- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDAVA GLFDYWGQGTLVTVSSA
39	PRT	người	BCMB128- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATA GLFDYWGQGTLVTVSSA

40	PRT	người	BCMB129-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLVTVSSA
41	PRT	người	BCMB130-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDAAVA GLFDYWGQGTLVTVSSA
42	PRT	người	BCMB131-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSGSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARHEGAVAG LFDYWGQGTLVTVSSA
43	PRT	người	BCMB177-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGRTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAG LFDYWGQGTLVTVSSA
44	PRT	người	BCMB178-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGWTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAG LFDYWGQGTLVTVSSA
45	PRT	người	BCMB179-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHQGATAGL FDYWGQGTLVTVSSA
46	PRT	người	BCMB180-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHHGATAGL FDYWGQGTLVTVSSA
47	PRT	người	BCMB181-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHWGATAGL FDYWGQGTLVTVSSA
48	PRT	người	BCMB182-VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY

				YSGITYYNPSLKS RV TISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHYGATAGL FDYWGQGTLVTVSSA
49	PRT	người	BCMB183- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGRTYYNPSLKS RV TISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARHQGATAG LFDYWGQGTLVTVSSA
50	PRT	người	BCMB184- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGRTYYNPSLKS RV TISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARHHGATAG LFDYWGQGTLVTVSSA
51	PRT	người	BCMB185- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGRTYYNPSLKS RV TISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARHYGATAG LFDYWGQGTLVTVSSA
52	PRT	người	BCMB186- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGWTYYNPSLKS RV TISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARHQGATAG LFDYWGQGTLVTVSSA
53	PRT	người	BCMB187- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGWTYYNPSLKS RV TISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARHHGATAG LFDYWGQGTLVTVSSA
54	PRT	người	BCMB188- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGWTYYNPSLKS RV TISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARHYGATAG LFDYWGQGTLVTVSSA
55	PRT	người	CD3B219 - Chuỗi nặng	EVQLVESGGGLVQP GGSRLSCAASGF TFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYN NYATYYAASVKGRFTISRDDSKN SLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFG NSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKR VESKYGP PCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK

				TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
56	PRT	người	CD3B219- Chuỗi nhẹ	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTG AVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
57	PRT	người	BCMB117- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLVTVSSA
58	PRT	người	BCMB176- VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARH DGATAGLFDYWGQGTLVTVSSA
59	PRT	người	CD3B219- VH	TYAMN
60	PRT	người	CD3B219- VH	RIRSKYNNYATYYAASVKG
61	PRT	người	CD3B219- VH	HGNFGNSYVSWFAY
62	PRT	người	CD3B219- VL	RSSTGAVTTSNYAN
63	PRT	người	CD3B219- VL	GTNKRAP
64	PRT	người	CD3B219- VL	ALWYSNLWV
65	PRT	người	BCMB69 - Chuỗi nặng	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGL FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTV

				SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
66	PRT	người	BCMB123, BCMB128, BCMB129, BCMB177, BCMB178, BCMB179, BCMB180, BCMB181, BCMB182, BCMB183, BCMB184, BCMB185, BCMB186, BCMB187, và BCMB188 – Chuỗi nhẹ	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDE AVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
67	PRT	người	BCMB117 - Chuỗi nặng	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSGSYFWGWIRQPPGKLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGL FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
68	PRT	người	BCMB123 -	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG

			Chuỗi nặng	SSSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGL FDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
69	PRT	người	BCMB128 - Chuỗi nặng	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGL FDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
70	PRT	người	BCMB129 - Chuỗi nặng	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYY SGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLF DYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP

				QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
71	PRT	người	BCMB176 - Chuỗi nặng	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIY YSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGL FDYWGGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
72	PRT	người	BCMB177 - Chuỗi nặng	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYY SGRTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLF DYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
73	PRT	nhân tạo	IgG4PAA	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTK YTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL

				PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK
74	PRT	người	IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
75	PRT	người	Fab	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSI YYSGITYYNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCHHHHHH
76	PRT	người	BCMB69, BCMB118, BCMB119, BCMB120, BCMB122, BCMB124, BCMB125, BCMB126, BCMB127, BCMB130, BCMB131– Chuỗi nhẹ	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIG SKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDE AVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTLKTLV GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGV ETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Đơn này yêu cầu quyền ưu tiên của Đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ tạm thời số 62/206,246, nộp ngày 17 tháng 08 năm 2015, và được kết hợp đầy đủ vào bản mô tả này bằng viện dẫn.

Danh sách liệt kê trình tự

Đơn xin cấp bằng sáng chế này bao gồm Danh sách liệt kê trình tự đã được nộp bằng đường điện tử theo định dạng ASCII và được kết hợp đầy đủ vào bản mô tả này bằng viện dẫn. Bản ASCII này được tạo vào ngày 15 tháng 08 năm 2016, có tên PRD3383USNP_SL.txt và dung lượng 87.341 byte.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể tái tổ hợp, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, mà liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA, trong đó kháng thể có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chuỗi nặng như vậy bao gồm:

a. vùng xác định bổ sung chuỗi nặng 1 (CDR1) có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, và chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6;

b. chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 7, chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, và chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6;

c. chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, và chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19;

d. chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 4, chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, và chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 6;

e. chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 5, và chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19; hoặc

f. chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 13, chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 8, và chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 19,

trong đó kháng thể như vậy ngoài ra còn bao gồm chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 24, chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 25, và chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 26.

2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 1, trong đó chuỗi nặng của kháng thể của (a) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 27; chuỗi nặng của kháng thể của (a) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 57; chuỗi nặng của kháng thể của (c) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 39; chuỗi nặng của

kháng thể của (d) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 40; hoặc chuỗi nặng của kháng thể của (e) bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 58.

3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 2, trong đó chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 28.

4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm bất kỳ từ điểm 1 đến 3 trong đó:

i) kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với miền ngoại bào của BCMA người;

ii) kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên là kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của người;

iii) mảnh gắn kháng nguyên là mảnh Fab, mảnh Fab2, hoặc kháng thể chuỗi đơn;

iv) kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó ức chế sự tương tác giữa BCMA và APRIL; sao cho trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên biểu hiện giá trị IC_{50} của sự tương tác giữa BCMA và APRIL bằng khoảng 5,9 nM như đo được bằng phương pháp ELISA.

v) kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó là IgG;

vi) kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó là lớp kháng thể IgG4, ví dụ trong đó IgG4 có thay thế S228P, thay thế L234A và thay thế L235A trong vùng Fc của nó;

vii) kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA người và phản ứng chéo với BCMA khỉ đuôi dài;

viii) kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với BCMA trên bề mặt của các tế bào u tủy người; và/hoặc

ix) kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với BCMA trên bề mặt của các tế bào đa u tủy người.

5. Tế bào tái tổ hợp biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 1 đến 4, tùy ý trong đó tế bào là tế bào lai hoặc kháng thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp.

6. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 tái tổ hợp hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi BCMA x CD3 của nó 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 liên kết với LC1 và HC2 liên kết với LC2 và trong đó HC1 bao gồm SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, và SEQ ID NO: 61 tương ứng làm chuỗi nặng CDR1-3, và LC1 bao gồm SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, và SEQ ID NO: 64 tương ứng làm chuỗi nhẹ CDR1-3, để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ nhất liên kết miễn dịch đặc hiệu với CD3 và trong đó HC2 bao gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, và SEQ ID NO: 6 tương ứng làm chuỗi nặng CDR1-3, và LC2 bao gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, và SEQ ID NO: 26 tương ứng làm chuỗi nhẹ CDR1-3, để tạo điểm gắn kháng nguyên thứ hai liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA.

7. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 tái tổ hợp hoặc mảnh của nó theo điểm 6 bao gồm HC1 có SEQ ID NO: 55, LC1 có SEQ ID NO: 56, HC2 có SEQ ID NO: 65, và LC2 có SEQ ID NO: 76, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó là IgG.

8. Kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo điểm 6 hoặc điểm 7 trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên:

- i) là lớp kháng thể IgG4;
- ii) liên kết miễn dịch đặc hiệu với BCMA người bằng ái lực tối thiểu bằng 0,22 nM như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt;
- iii) liên kết với BCMA trên bề mặt của các tế bào u tủy người;
- iv) liên kết với BCMA trên bề mặt của các tế bào đa u tủy người

v) cảm ứng hoạt hóa tế bào T người trong ống nghiệm với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 0,37 nM;

vi) cảm ứng cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc tế bào T đối với các tế bào biểu hiện BCMA trong ống nghiệm với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 0,45 nM;

vii) không phải chất chủ vận BCMA; và/hoặc

viii) không làm thay đổi sự hoạt hóa NF- κ B ở các nồng độ thấp hơn 10 nM.

9. Tế bào tái tổ hợp biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 6 đến 8, trong đó tế bào là tế bào lai.

10. Dược phẩm bao gồm kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 6 đến 8 và chất mang dược dụng.

11. Phương pháp tạo ra kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 6 đến 8 bằng cách nuôi cấy tế bào theo điểm 9.

12. Polynucleotit tổng hợp được phân lập mã hóa kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 6 đến 8.

13. Kit bao gồm kháng thể đặc hiệu đôi BCMA x CD3 hoặc mảnh gắn đặc hiệu đôi như được định nghĩa theo điểm bất kỳ trong các điểm từ điểm 6 đến 8 và/hoặc polynucleotit như được định nghĩa theo điểm 12 và bao bì đóng gói chúng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JANSSEN PHARMACEUTICA NV

<120> KHÁNG THỂ TÁI TỔ HỢP, KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU ĐÔI BCMA x CD3
TÁI TỔ HỢP, TẾ BÀO TÁI TỔ HỢP BIỂU HIỆN KHÁNG THỂ, DƯỢC PHẨM
VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY

<130> PRD3383USNP

<140>

<141>

<150> 62/206,246

<151> 2015-08-17

<160> 77

<170> Phiên bản sáng chế 3.5

<210> 1

<211> 184

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 1

Met	Leu	Gln	Met	Ala	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln	Asn	Glu	Tyr	Phe	Asp
Ser														
1			5					10					15	

Leu	Leu	His	Ala	Cys	Ile	Pro	Cys	Gln	Leu	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn
Thr														
			20					25				30		

Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Gln	Arg	Tyr	Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn
Ser														
		35					40				45			

Val	Lys	Gly	Thr	Asn	Ala	Ile	Leu	Trp	Thr	Cys	Leu	Gly	Leu	Ser
Leu														
	50					55				60				

Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Val	Phe	Val	Leu	Met	Phe	Leu	Leu	Arg	Lys
Ile														
65					70				75				80	

Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly
Leu

85

90

95

Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp
Glu

100

105

110

Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr
Cys

115

120

125

Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys
Phe

130

135

140

Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr
Lys

145

150

155

160

Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr
Glu

165

170

175

Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg

180

<210> 2

<211> 185

<212> PRT

<213> Mus sp. (chuột)

<400> 2

Met Ala Gln Gln Cys Phe His Ser Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu
His

1

5

10

15

Ala Cys Lys Pro Cys His Leu Arg Cys Ser Asn Pro Pro Ala Thr
Cys

20

25

30

Gln Pro Tyr Cys Asp Pro Ser Val Thr Ser Ser Val Lys Gly Thr
Tyr

35

40

45

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

50

55

60

Leu Phe Thr Ile Ser Phe Leu Leu Arg Lys Met Asn Pro Glu Ala
Leu

65

70

75

80

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

85

90

95

Asp Lys Ala Asp Thr Glu Leu Thr Arg Ile Arg Ala Gly Asp Asp
Arg

100

105

110

Ile Phe Pro Arg Ser Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
Glu

115

120

125

Asp Cys Val Lys Ser Lys Pro Lys Gly Asp Ser Asp His Phe Phe
Pro

130

135

140

Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
Thr

145

150

155

160

Gly Asp Tyr Gly Lys Ser Ser Val Pro Thr Ala Leu Gln Ser Val
Met

165

170

175

Gly Met Glu Lys Pro Thr His Thr Arg

180

185

<210> 3

<211> 183

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis* (khỉ đuôi dài)

<400> 3

Met Leu Gln Met Ala Arg Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp
Ser

1 5 10 15

Leu Leu His Asp Cys Lys Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Thr
Pro

20 25 30

Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Met Thr Asn Ser
Val

35 40 45

Lys Gly Met Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
Ile

50 55 60

Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Thr Phe Leu Leu Arg Lys Met
Ser
65 70 75 80Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
Leu

85 90 95

Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Gly Arg Thr Gly Asp Glu
Ile

100 105 110

Val Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
Glu

115 120 125

Asp Cys Ile Lys Asn Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
Pro

130 135 140

Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
Thr

145
160

150

155

Asn Asp Tyr Cys Asn Ser Leu Ser Ala Ala Leu Ser Val Thr Glu
Ile

165

170

175

Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
180

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 4

Ser Gly Ser Tyr Phe Trp Gly
1 5

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 5

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

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 6

His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 7

Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

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

<210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 9
 His Asp Ala Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 10
 Ser Gly Ser Tyr Tyr Trp Gly
 1 5

<210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 11
 Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 Ser
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 12
 His Glu Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 13
 Ser Ser Ser Tyr Phe Trp Gly
 1 5

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 14
 Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 Ser
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 15
 His Ser Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 16
 His Glu Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 17
 His Ser Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 18
 His Asp Ala Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 19
 His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 20
 His Gln Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 21
 His His Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 22
 His Trp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 23

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 23
 His Tyr Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 24
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 25
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 26
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Val Val
 1 5 10

<210> 27
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 27
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Gly

	20		25		30	
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu						
Glu						
	35		40		45	
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro						
Ser	50		55		60	
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln						
Phe						
65		70		75		80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr						
Tyr						
		85		90		95
Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp						
Gly						
	100		105		110	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala						
	115		120			
<210> 28						
<211> 108						
<212> PRT						
<213> Người thông minh						
<400> 28						
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly						
Gln						
1		5		10		15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser						
Val						
	20		25		30	
His Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Val						
Tyr						
	35		40		45	

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala
Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp
His
85 90 95

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

<210> 29
<211> 122
<212> PRT
<213> Người thông minh

<400> 29
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Gly
20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Asp Ala Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

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

<210> 30

<211> 108

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 30

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
Gln

1

5

10

15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser
Val

20

25

30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val
Tyr

35

40

45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
Ser

50

55

60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala
Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp
His

85

90

95

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

<210> 31
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 31
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Gly
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg His Glu Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
 Gly
 100 105 110

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

<210> 32
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 32

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Gly
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

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

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

<210> 33

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 33

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Ser
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
 Gly
 100 105 110

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

<210> 34
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 34
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Ser
 20 25 30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 Glu

	35		40		45									
Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro
Ser														
	50				55					60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln
Phe														
65				70					75				80	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
Tyr														
			85					90					95	
Cys	Ala	Arg	His	Asp	Gly	Ala	Val	Ala	Gly	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp
Gly														
			100					105					110	
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala					
			115					120						
<210> 35														
<211> 122														
<212> PRT														
<213> Người thông minh														
<400> 35														
Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
Glu														
1			5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser
Gly														
			20					25				30		
Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
Glu														
		35				40					45			
Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro
Ser														
	50				55					60				

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
 Gly
 100 105 110

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

<210> 36
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 36
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Gly
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Glu Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115

120

<210> 37

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 37

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Gly

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Ser Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

	100		105		110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala					
	115		120		
<210> 38					
<211> 122					
<212> PRT					
<213> Người thông minh					
<400> 38					
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser					
Glu					
1	5		10		15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser					
Gly					
	20		25		30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu					
Glu					
	35		40		45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro					
Ser					
	50		55		60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln					
Phe					
65		70		75	80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr					
Tyr					
	85		90		95
Cys Ala Arg His Asp Ala Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp					
Gly					
	100		105		110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala					
	115		120		

<210> 39
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 39
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Gly
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

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

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

<210> 40
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 40

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Gly
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
 Gly
 100 105 110

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

<210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 41

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Gly

	20		25		30										
Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
Glu															
	35					40					45				
Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	
Ser															
	50					55				60					
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	
Phe															
65					70				75					80	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	
Tyr															
				85				90					95		
Cys	Ala	Arg	His	Asp	Ala	Ala	Val	Ala	Gly	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	
Gly															
				100				105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala						
				115				120							
<210> 42															
<211> 122															
<212> PRT															
<213> Người thông minh															
<400> 42															
Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	
Glu															
1			5					10					15		
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	
Gly															
			20					25				30			
Ser	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
Glu															
	35					40					45				

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg His Glu Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
 Gly
 100 105 110

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

<210> 43
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 43
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Ser
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

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

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

<210> 44

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 44

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Ser
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr

	85	90	95
Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp			
Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala			
	115	120	
<210> 45			
<211> 122			
<212> PRT			
<213> Người thông minh			
<400> 45			
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser			
Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser			
Ser			
	20	25	30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu			
Glu			
	35	40	45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro			
Ser			
	50	55	60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln			
Phe			
65	70	75	80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr			
Tyr			
	85	90	95
Cys Ala Arg His Gln Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp			
Gly			
	100	105	110

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

<210> 46

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 46

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Ser
20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr
85 90 95

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

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

<210> 47

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 47

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Ser
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

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

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

<210> 48

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 48

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Ser

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Tyr Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

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

<210> 49

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 49

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Ser

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Gln Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

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

<210> 50

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 50

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Ser

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50						55								60
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln
Phe														
65						70				75				80
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
Tyr														
				85					90				95	
Cys	Ala	Arg	His	His	Gly	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp
Gly														
				100					105				110	
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala					
				115					120					
<210>	51													
<211>	122													
<212>	PRT													
<213>	Người thông minh													
<400>	51													
Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
Glu														
1				5					10				15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser
Ser														
				20					25				30	
Ser	Tyr	Phe	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
Glu														
		35					40				45			
Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro
Ser														
	50						55				60			
Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln
Phe														
65						70				75				80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Tyr Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

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

<210> 52

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 52

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Ser

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Gln Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

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

<210> 53

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 53

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Ser

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His His Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

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

<210> 54
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Ser
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

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

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

<210> 55
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 55

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
240

230

235

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
320

310

315

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> 56

<211> 215

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 56

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

<210> 57

<211> 122

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 57

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Gly

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

	85		90		95
Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp					
Gly					
	100		105		110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala					
	115		120		
<210> 58					
<211> 122					
<212> PRT					
<213> Người thông minh					
<400> 58					
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser					
Glu					
1	5		10		15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser					
Ser					
	20		25		30
Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu					
Glu					
	35		40		45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro					
Ser					
	50		55		60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln					
Phe					
65		70		75	80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr					
Tyr					
	85		90		95
Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp					
Gly					
	100		105		110

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

<210> 59
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 59
 Thr Tyr Ala Met Asn
 1 5

<210> 60
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 60
 Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala
 Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 61
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 61
 His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 62
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 62
 Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10

<210> 63
 <211> 7

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 63

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1

5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 64

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1

5

<210> 65

<211> 448

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 65

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Gly

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

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

115

120

125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
Ala

130

135

140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
Val
145
160

150

155

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
Ala

165

170

175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
Val

180

185

190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
His

195

200

205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
Gly

210

215

220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
Ser
225
240

230

235

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
Arg

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
Pro

260

265

270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
Ala

275

280

285

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

290

295

300

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

310

315

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
Thr

325

330

335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
Leu

340

345

350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
Cys

355

360

365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
Ser

370

375

380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
Asp
385
400

390

395

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
Ser

405

410

415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
Ala

420

425

430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
Lys

435

440

445

<210> 66

<211> 214

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 66

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
Gln

1

5

10

15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser
Val

20

25

30

His Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Val
Tyr

35

40

45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
Ser

50

55

60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala
Gly

65

70

75

80

Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp
His

85

90

95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
Lys

100

105

110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
Gln

115

120

125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
Gly

130

135

140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
Gly

145

150

155

160

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

165

170

175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
Ser

180

185

190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
Val

195

200

205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 67

<211> 448

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 67

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Gly

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

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

115

120

125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
Ala

130

135

140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
Val

145

150

155

160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
Ala

165

170

175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
Val

180

185

190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
His

195

200

205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
Gly

210

215

220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
Ser

225

230

235

240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
Arg

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
Pro

260

265

270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
Ala

275

280

285

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

290

295

300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
Tyr

305

310

315

320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
Thr

325

330

335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
Leu

340

345

350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
Cys

355

360

365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
Ser

370

375

380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
Asp

385

390

395

400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
Ser

405

410

415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
Ala

420

425

430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
Lys

435

440

445

<210> 68

<211> 448

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 68

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Ser

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
 Gly
 100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 Val
 145 150 155
 160

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 Ser
 225 230 235
 240

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 Ala
 275 280 285

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

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

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

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

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 Cys
 355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 69

<211> 448

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 69

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Gly
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

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

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 Val
 145 150 155
 160

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 Ser
 225 230 235
 240

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 Ala
 275 280 285

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

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

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

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

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 Cys
 355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 70
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 70
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
 Gly
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro
 Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

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

115

120

125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
Ala

130

135

140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
Val
145
160

150

155

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
Ala

165

170

175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
Val

180

185

190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
His

195

200

205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
Gly

210

215

220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
Ser
225
240

230

235

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
Arg

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
Pro

260

265

270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
Ala

275

280

285

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

290

295

300

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

310

315

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
Thr

325

330

335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
Leu

340

345

350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
Cys

355

360

365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
Ser

370

375

380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
Asp
385
400

390

395

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
Ser

405

410

415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
Ala

420

425

430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
Lys

435

440

445

<210> 71

<211> 448

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 71

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Ser

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

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

115

120

125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
Ala

130

135

140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
Val

145

150

155

160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
Ala

165

170

175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
Val

180

185

190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
His

195

200

205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
Gly

210

215

220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
Ser

225

230

235

240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
Arg

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
Pro

260

265

270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
Ala

275

280

285

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

290

295

300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
Tyr

305

310

315

320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
Thr

325

330

335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
Leu

340

345

350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
Cys

355

360

365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
Ser

370

375

380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
Asp

385

390

395

400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
Ser

405

410

415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
Ala

420

425

430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
Lys

435

440

445

<210> 72

<211> 448

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 72

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Ser

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50

55

60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
Phe

65

70

75

80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr

85

90

95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Thr Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
Gly

100

105

110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 Val
 145 150 155
 160

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 Gly
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 Ser
 225 230 235
 240

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
Ala

275

280

285

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

290

295

300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
Tyr

305

310

315

320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
Thr

325

330

335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
Leu

340

345

350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
Cys

355

360

365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
Ser

370

375

380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
Asp

385

390

395

400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
Ser

405

410

415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
Ala

420

425

430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
Lys

435

440

445

<210> 73

<211> 327

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit
tổng hợp

<400> 73

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>	74													
<211>	330													
<212>	PRT													
<213>	Nguồn thông minh													
<400>	74													
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
160

150

155

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
240

230

235

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> 75

<211> 230

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 75

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

1

5

10

15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
Gly

20

25

30

Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
Glu

35

40

45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro
Ser

50

55

60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg His Asp Gly Ala Val Ala Gly Leu Phe Asp Tyr Trp
 Gly
 100 105 110

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

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 Val
 145 150 155
 160

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

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

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

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

His His His His His His
225 230

<210> 76
<211> 214
<212> PRT
<213> Người thông minh

<400> 76
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly
Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser
Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Val
Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly
Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala
Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp
His
85 90 95

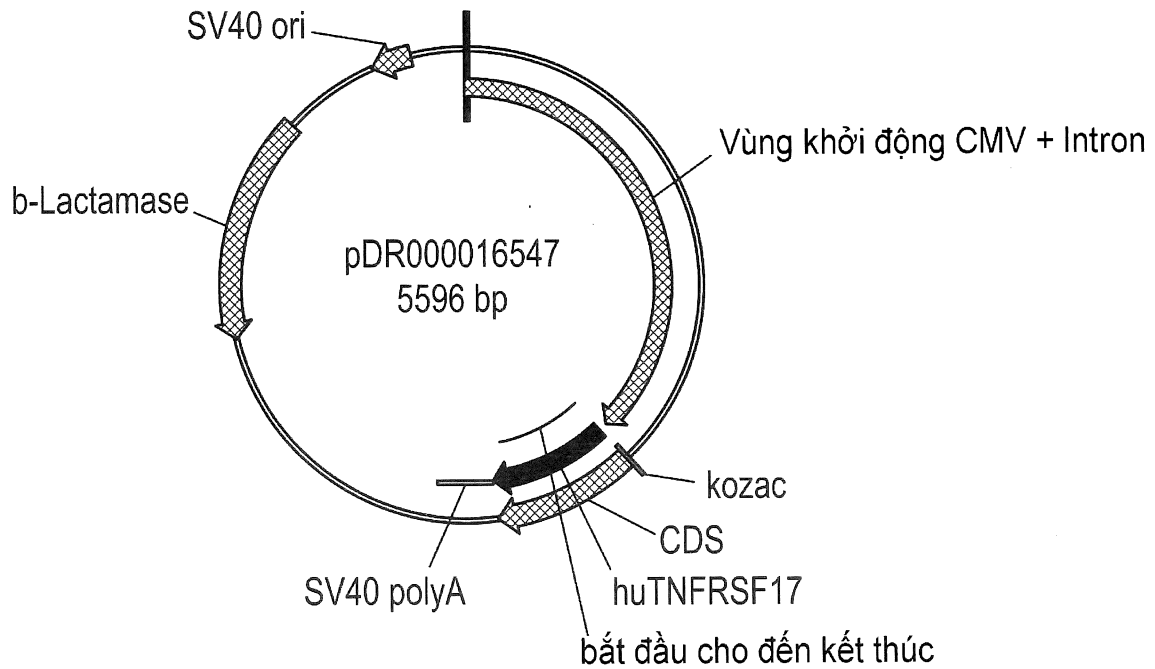
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
Gln
115 120 125

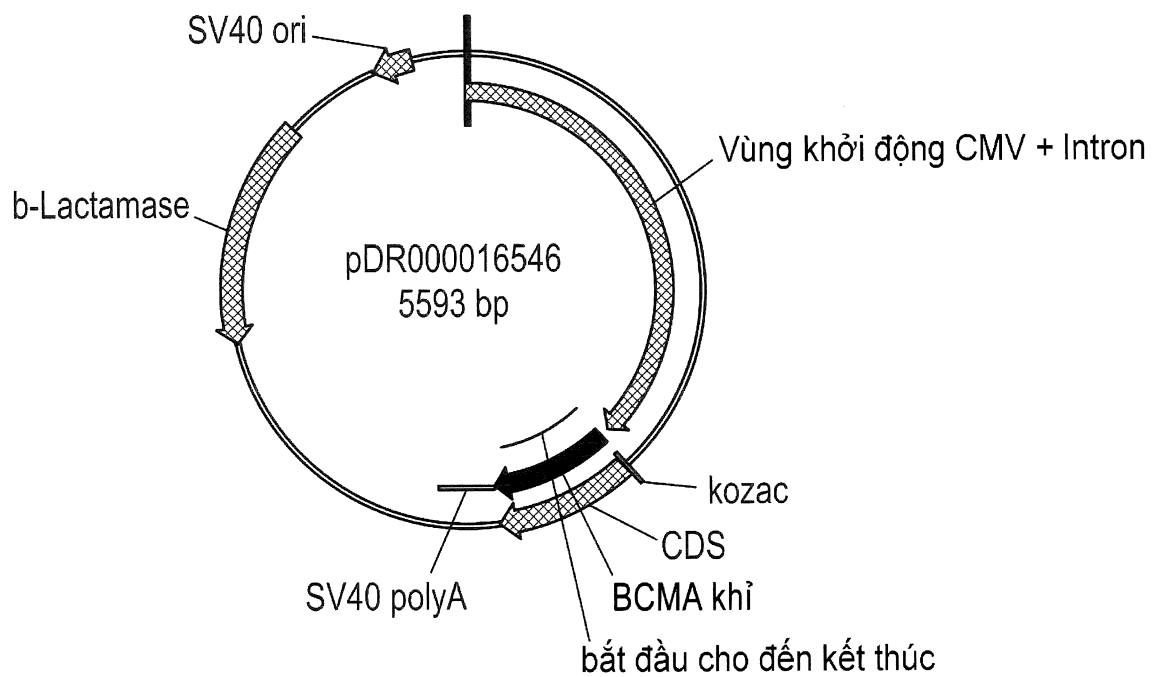
Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
Gly

130		135		140
Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Gly Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala				
Gly				
145		150		155
160				
Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala				
Ala				
	165	170		175
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg				
Ser				
	180	185		190
Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr				
Val				
	195	200		205
Ala Pro Thr Glu Cys Ser				
210				
<210> 77				
<211> 5				
<212> PRT				
<213> Người thông minh				
<400> 77				
Gly Ala Val Ala Gly				
1		5		

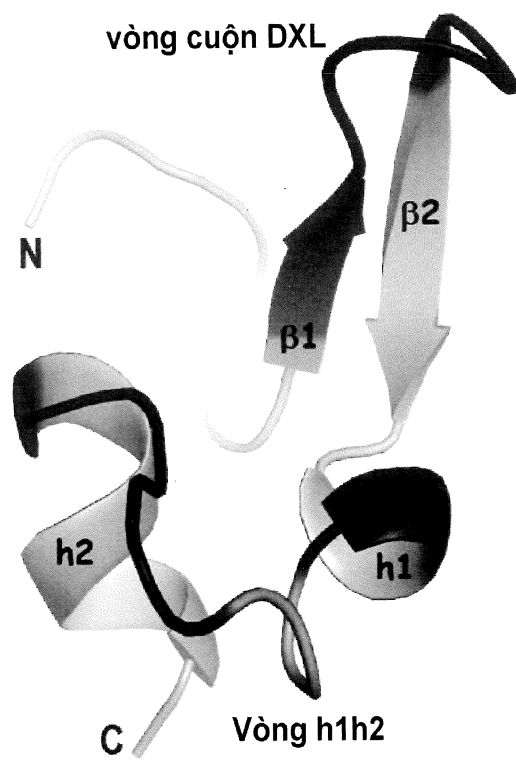
HÌNH 1A



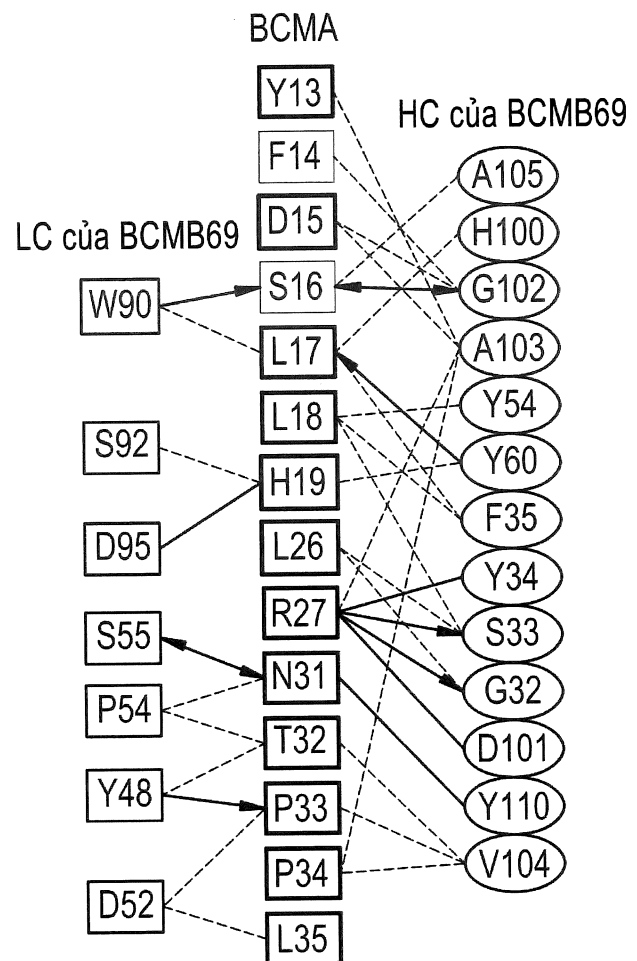
HÌNH 1B



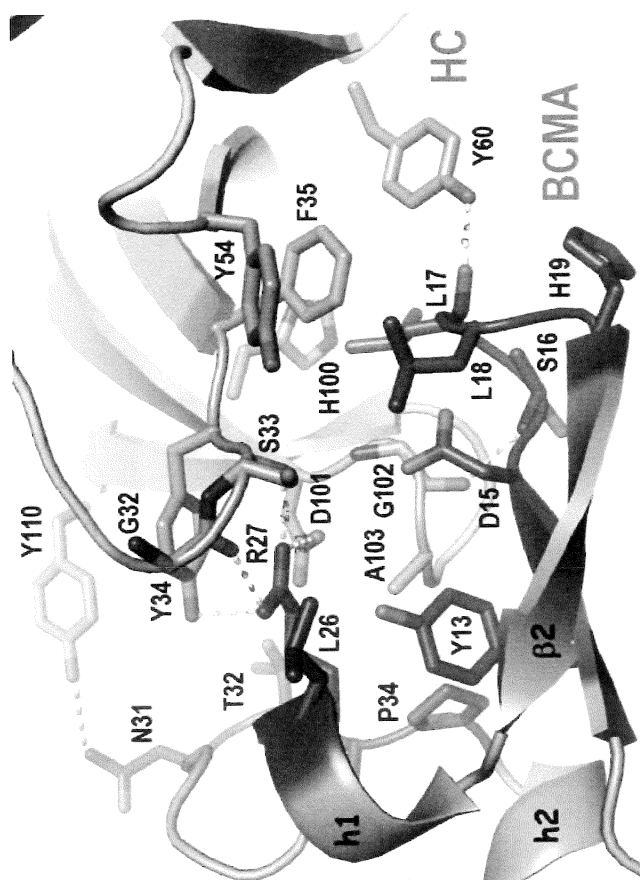
HÌNH 2A



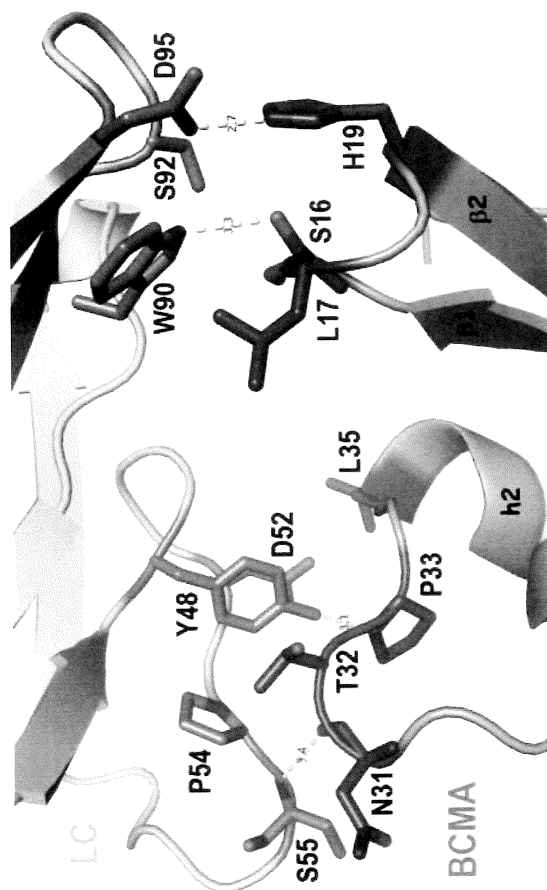
HÌNH 2B



HÌNH 2D



HÌNH 2C



HÌNH 3

Epitope

	1	54	
BCMA người	MLQMAQQCSQNE	YFD	SLHACIPQ
BCMA khi	MLQMAQQCSQNE	YFD	SLHDC
BCMA chuột	---	MAQQCFHSE	YFD

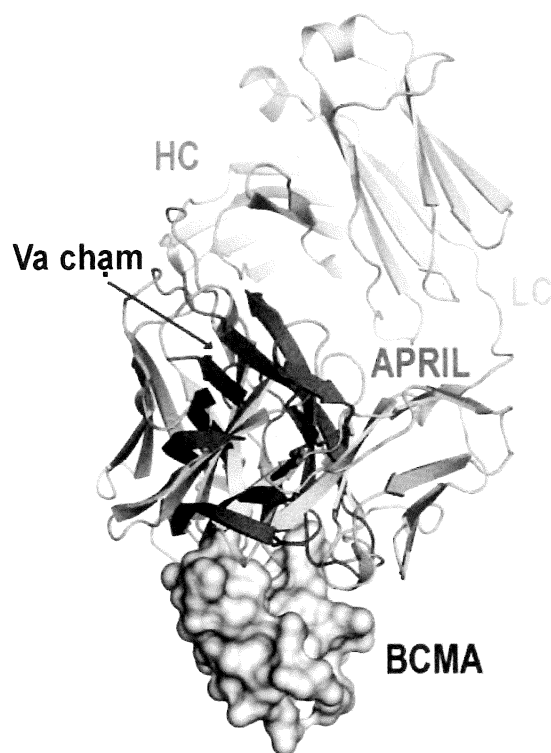
Paratope

SỐ ID TRÌNH TỰ: 75	1	77	
BCMB69_HC	QLQLQESGPGLV	KPSETLSLTCTV	SGS
BCMB69_HC	NQFSLKLSSV	TAADTAVYYCAR	HDGAVAGLEFD
BCMB69_HC	FPEPVTVSWNSG	ALTSGVHTFPAVL	QSSGLYSLSSV

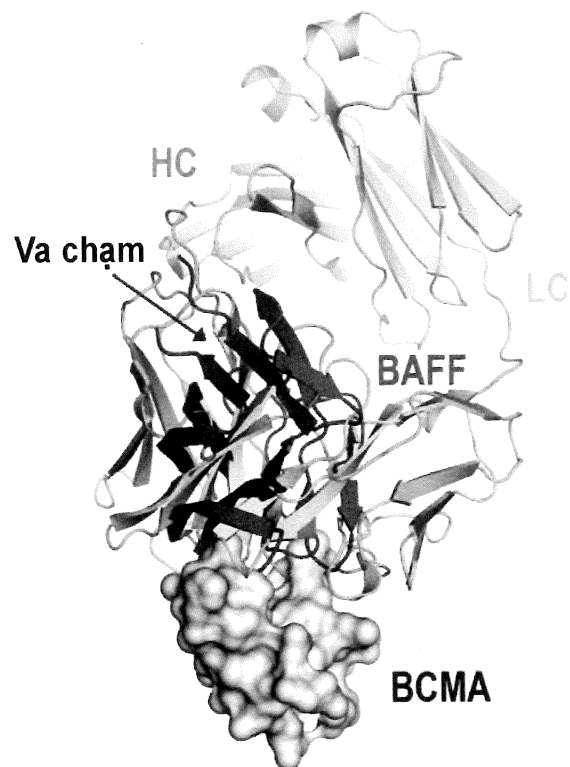
SỐ ID TRÌNH TỰ: 76

BCMB69_LC	1	CDR-L1					CDR-L2					72
		SYVLTQPPSV	SVAPGQTARI	TCGGNNIGSKSV	HWYQQPPGQAP	VVVY	Y	DDSD	DR	PSGI	PERFSG	NSGNTATL
BCMB69_LC	73	CDR-L3										144
		TISRVEAGDE	AVYYCQ	W	MDSSD	HVVVFGG	TKLTVL	LGQPKAAP	SVTLFP	PSSEELQ	ANKATLV	CLISDFYPG
BCMB69_LC	145											214
		AVTVAWKGD	SSPVKAGVET	TTTPSKQ	NNKYAASSYL	SLTPEQ	WKSHRSYCQV	THEGST	VEKTVAPTECS			

HÌNH 4A



HÌNH 4B

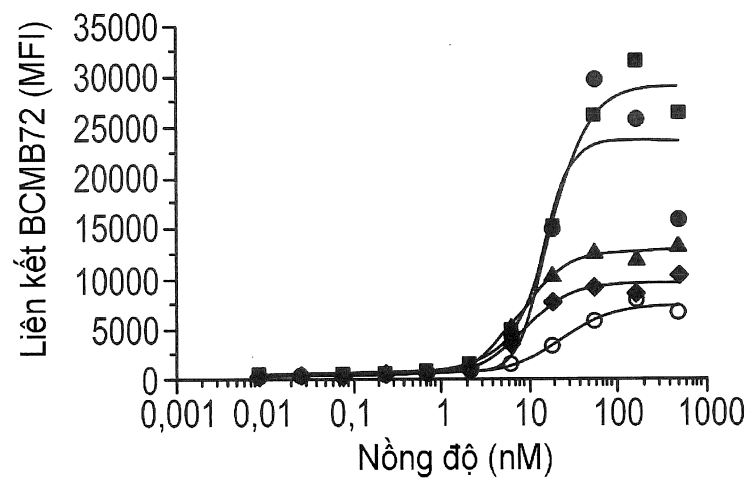


HÌNH 5

mAb (kháng thể đơn dòng)	Fc-BCMA	Phức thứ nhất (K_{D1} , nM)	Phức cuối (K_D , nM)	KHOẢNG
BCMB72	Người	1,59	0,18	0,15 – 0,20
	Khỉ	17,8	6,50	5,36 – 7,27
	Chuột	283	72,4	62,0 – 82,9

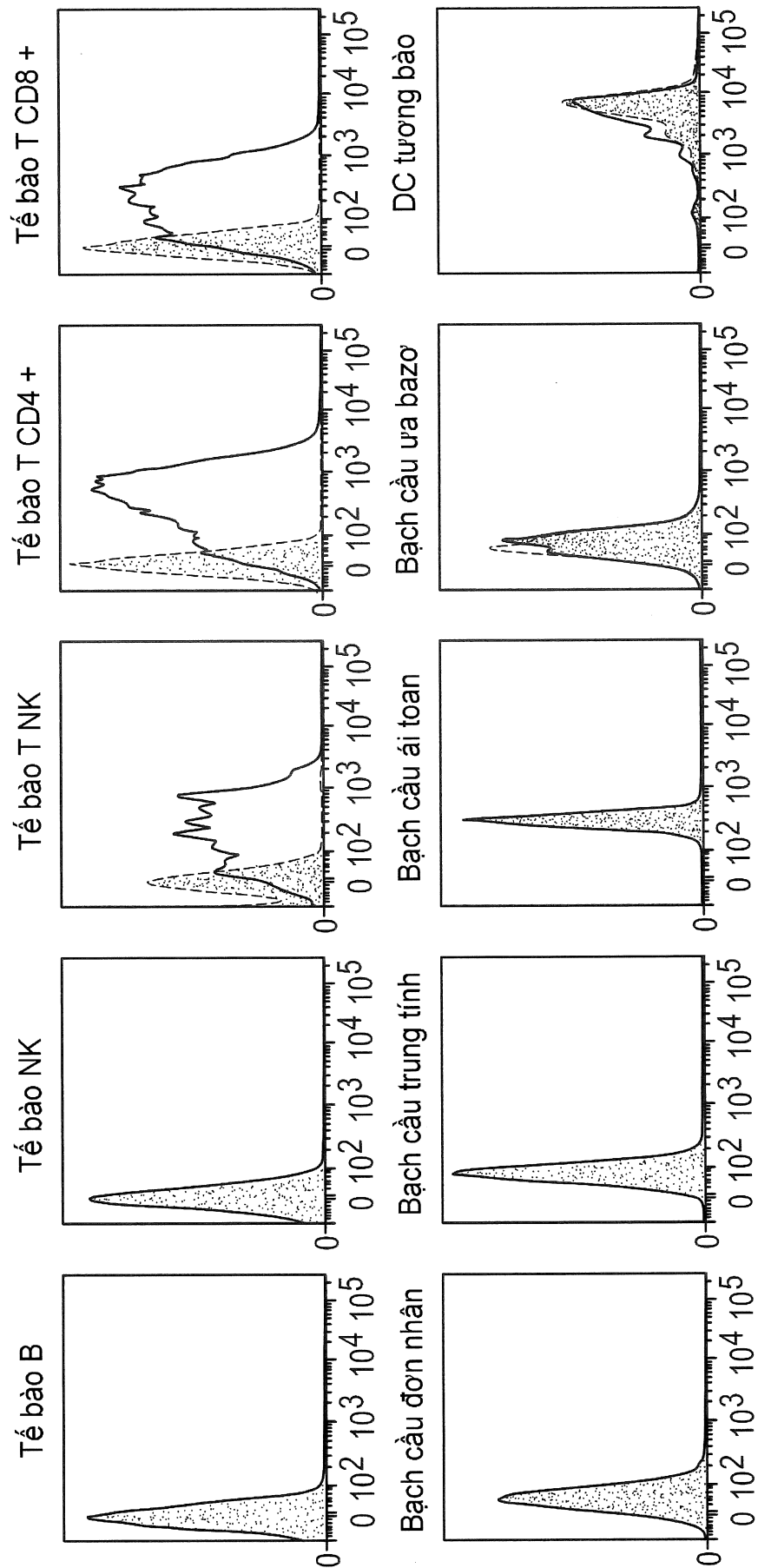
Các ái lực BCMB72: Người > Khỉ >> Chuột

HÌNH 6

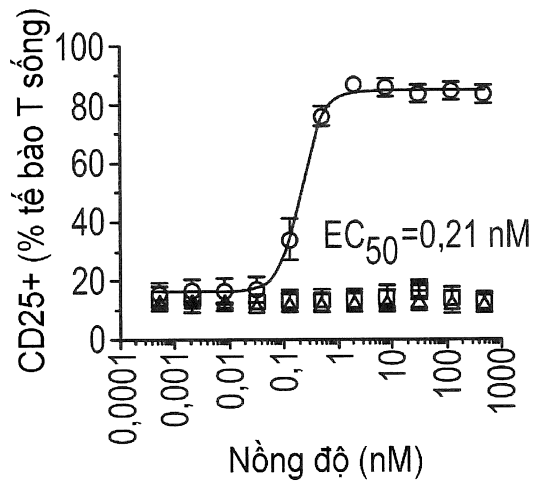


Tế bào:	EC50 (nM):
● H929	14,7
◆ MM.1R	8,74
■ EJM	17,5
○ LP1	22,3
▲ U2932	7,92

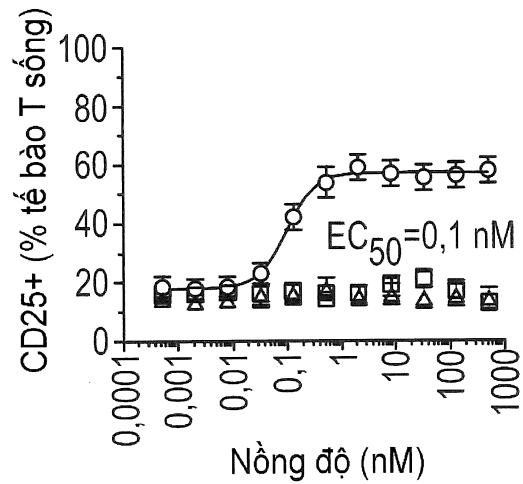
HÌNH 7



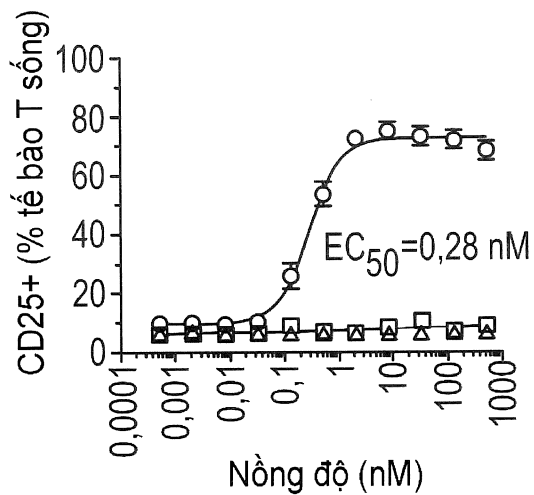
HÌNH 8A



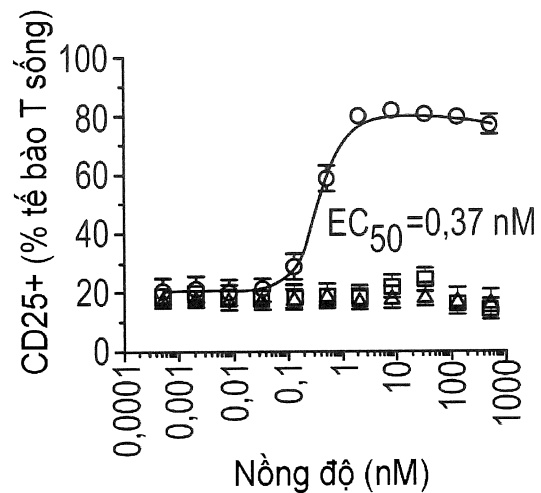
HÌNH 8B



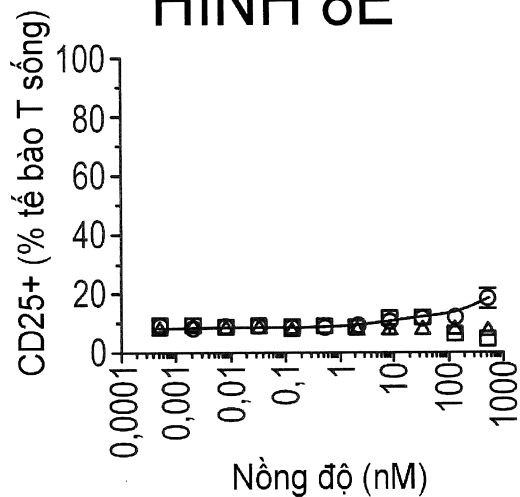
HÌNH 8C



HÌNH 8D



HÌNH 8E



- BCMB72.(BCMA x CD3)
- △ BCMA x bất hoạt
- Bất hoạt x CD3

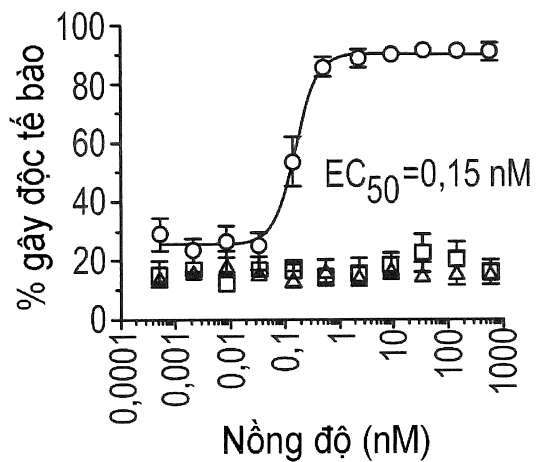
HÌNH 9A

Dòng tế bào	H929 (BCMA-00271)		H929 (BCMA-00273)	
Người hiến tặng	EC50 (nM)	% hoạt hóa tối đa	EC50 (nM)	% hoạt hóa tối đa
M5137	0,1683	89,74	~ 0,5477	68,70
M7197	0,3000	80,73	1,0860	81,11
M6576	0,3178	85,08	0,5134	82,66
M6457	0,2436	74,57	0,7859	81,07
M2550	0,1572	92,34	0,4325	85,24
M6521	0,1313	85,01	không có dữ liệu	không có dữ liệu
M7077	không có dữ liệu	không có dữ liệu	1,3240	72,96
Trung bình	0,2116	84,64	0,7070	78,53
Dòng tế bào	MM.1R (BCMA-00271)		MM.1R (BCMA-00273)	
Người hiến tặng	EC50 (nM)	% hoạt hóa tối đa	EC50 (nM)	% hoạt hóa tối đa
M5137	0,0968	64,71	0,1296	79,62
M7197	0,1159	45,60	0,1323	70,25
M6576	0,1179	50,93	0,1646	78,08
M6457	0,0776	49,27	0,1042	80,51
M2550	0,1206	60,05	0,3514	83,80
M6521	0,0964	73,62	không có dữ liệu	không có dữ liệu
M7077	không có dữ liệu	không có dữ liệu	0,2470	66,68
Trung bình	0,0992	57,12	0,1675	76,25
Dòng tế bào	RPMI 8226 (BCMA-00271)		RPMI 8226 (BCMA-00273)	
Người hiến tặng	EC50 (nM)	% hoạt hóa tối đa	EC50 (nM)	% hoạt hóa tối đa
M5137	0,2448	71,81	0,4787	50,33
M7197	0,2260	67,98	0,3357	64,15
M6576	0,2482	77,69	0,3094	70,58
M6457	0,3041	66,83	0,4631	57,15
M2550	0,6072	84,07	0,5163	70,42
M6521	0,1409	67,74	không có dữ liệu	không có dữ liệu
M7077	không có dữ liệu	không có dữ liệu	0,4055	54,73
Trung bình	0,2777	72,76	0,4024	61,19

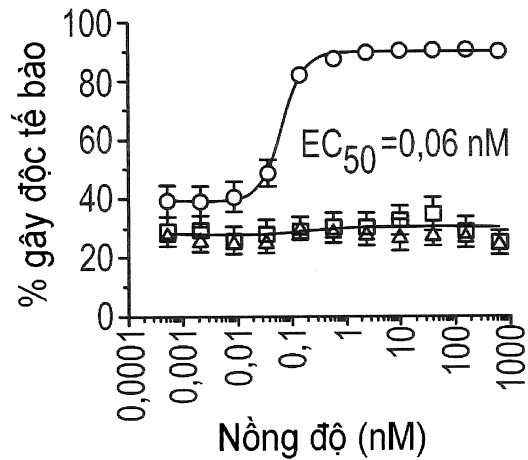
HÌNH 9B

Dòng tế bào	U266 (BCMA-00271)		U266 (BCMA-00273)	
Người hiến tặng	EC50 (nM)	% hoạt hóa tối đa	EC50 (nM)	% hoạt hóa tối đa
M5137	0,2068	85,39	0,4073	73,02
M7197	0,3833	71,98	0,5545	65,98
M6576	0,4521	80,52	0,6042	76,95
M6457	0,3646	74,82	0,4772	61,85
M2550	0,5256	85,30	0,6823	76,24
M6521	0,4068	84,71	không có dữ liệu	không có dữ liệu
M7077	không có dữ liệu	không có dữ liệu	0,6629	68,31
Trung bình	0,3743	80,41	0,5711	70,34
Dòng tế bào	MV4-11 (BCMA-00271)		MV4-11 (BCMA-00273)	
Người hiến tặng	EC50 (nM)	% hoạt hóa tối đa	EC50 (nM)	% hoạt hóa tối đa
M5137	~ 2,940e+006	~ 1522	~ 1,357	4,702
M7197	6,214	7,572	144	6,156
M6576	~ 1,855e+010	~ 104868	31,41	10,7
M6457	~ 2,294e+007	~ 4196	không áp dụng	không áp dụng
M2550	~ 4,075e+008	~ 68789	16,85	5,626
M6521	~ 59722	~ 110,5	không có dữ liệu	không có dữ liệu
M7077	không có dữ liệu	không có dữ liệu	279	8,427
Trung bình	1,531E+12	229246	30,58	6,958

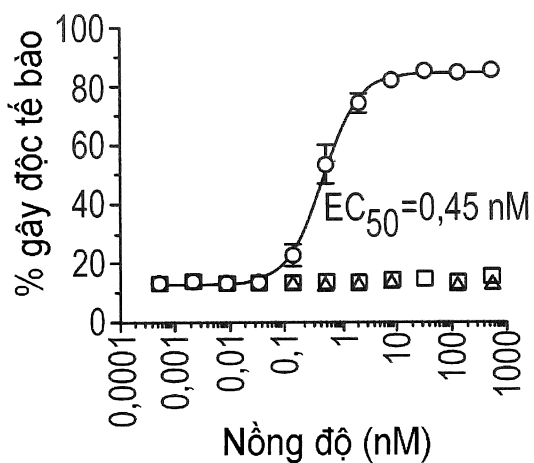
HÌNH 10A



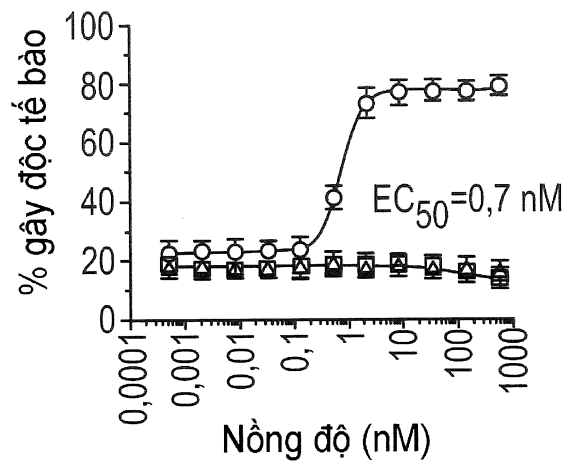
HÌNH 10B



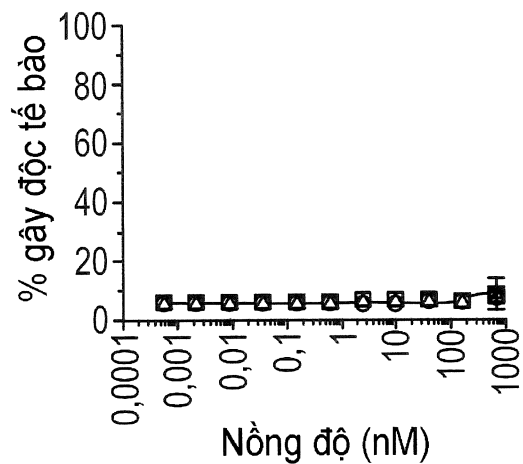
HÌNH 10C



HÌNH 10D



HÌNH 10E



- BCMB72.(BCMA x CD3)
- △ BCMA x bất hoạt
- Bất hoạt x CD3

HÌNH 11A

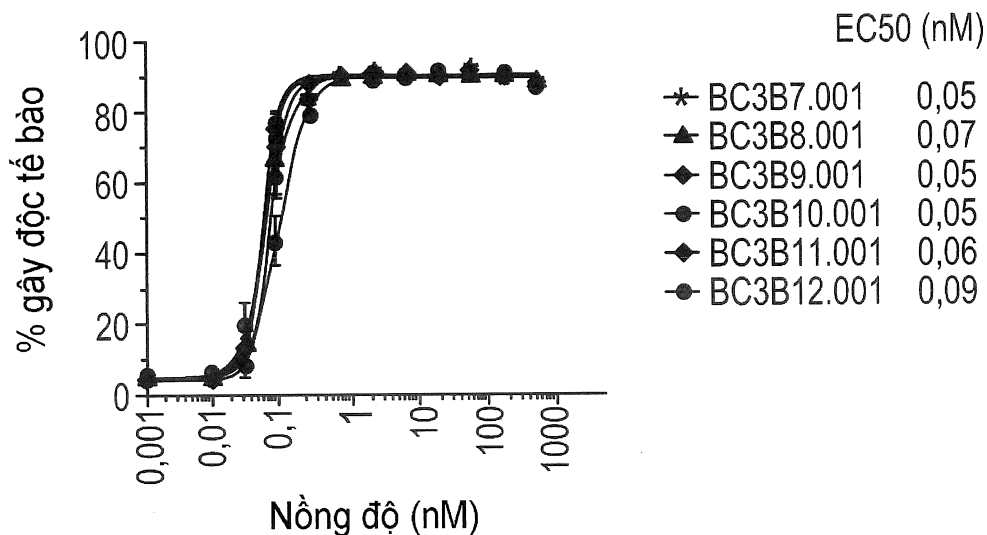
Dòng tế bào	H929 (BCMA-00271)		H929 (BCMA-00273)	
Người hiến tặng	EC50 (nM)	% ly giải tối đa	EC50 (nM)	% ly giải tối đa
M5137	0,2376	90,48	1,1630	75,61
M7197	0,1631	92,02	1,3480	82,56
M6576	~ 0,1405	91,75	0,4301	87,14
M6457	0,2294	79,98	0,8720	82,29
M2550	~ 0,1130	92,48	0,3575	89,63
M6521	0,0973	92,27	không có dữ liệu	không có dữ liệu
M7077	không có dữ liệu	không có dữ liệu	1,7690	80,05
Trung bình	0,1495	89,72	0,8133	83,13
Dòng tế bào	MM.1R (BCMA-00271)		MM.1R (BCMA-00273)	
Người hiến tặng	EC50 (nM)	% ly giải tối đa	EC50 (nM)	% ly giải tối đa
M5137	0,0654	92,97	0,0569	97,23
M7197	0,0824	92,60	0,0945	96,75
M6576	0,0480	90,47	0,0617	95,29
M6457	0,0548	81,00	0,0432	87,92
M2550	0,0595	92,95	0,1212	96,97
M6521	0,0511	87,76	không có dữ liệu	không có dữ liệu
M7077	không có dữ liệu	không có dữ liệu	0,1008	94,98
Trung bình	0,0617	89,62	0,0766	94,87
Dòng tế bào	RPMI 8226 (BCMA-00271)		RPMI 8226 (BCMA-00273)	
Người hiến tặng	EC50 (nM)	% ly giải tối đa	EC50 (nM)	% ly giải tối đa
M5137	0,5044	82,02	1,0670	81,12
M7197	0,7262	82,47	0,8636	78,55
M6576	0,3366	86,65	0,4842	79,81
M6457	0,6967	76,10	1,0700	69,25
M2550	0,5379	89,73	0,6956	84,73
M6521	0,1625	81,03	không có dữ liệu	không có dữ liệu
M7077	không có dữ liệu	không có dữ liệu	1,2050	73,50
Trung bình	0,4531	83,55	0,8543	77,99

HÌNH 11B

Dòng tế bào	U266 (BCMA-00271)		U266 (BCMA-00273)	
Người hiến tặng	EC50 (nM)	% ly giải tối đa	EC50 (nM)	% ly giải tối đa
M5137	0,7610	72,59	1,0180	76,19
M7197	0,7355	76,36	1,1610	77,29
M6576	0,7298	83,86	0,9710	82,34
M6457	0,7734	62,05	1,4320	56,77
M2550	0,6516	83,21	0,9347	85,93
M6521	0,5621	83,09	không có dữ liệu	không có dữ liệu
M7077	không có dữ liệu	không có dữ liệu	1,1580	74,21
Trung bình	0,7046	76,82	1,0800	75,31
Dòng tế bào	MV4-11 (BCMA-00271)		MV4-11 (BCMA-00273)	
Người hiến tặng	EC50 (nM)	% ly giải tối đa	EC50 (nM)	% ly giải tối đa
M5137	2,038	8,425	~ 0,06555	18,31
M7197	~ 157,1	4,79	không áp dụng	không áp dụng
M6576	~ 391461	~ 23049	18,61	9,836
M6457	không áp dụng	không áp dụng	0	-9780
M2550	~ 147,7	8,21	~ 14,70	8,366
M6521	không áp dụng	không áp dụng	không có dữ liệu	không có dữ liệu
M7077	không có dữ liệu	không có dữ liệu	~ 1,247e+022	18,68
Trung bình	~ 157,2	7,658	không áp dụng	không áp dụng

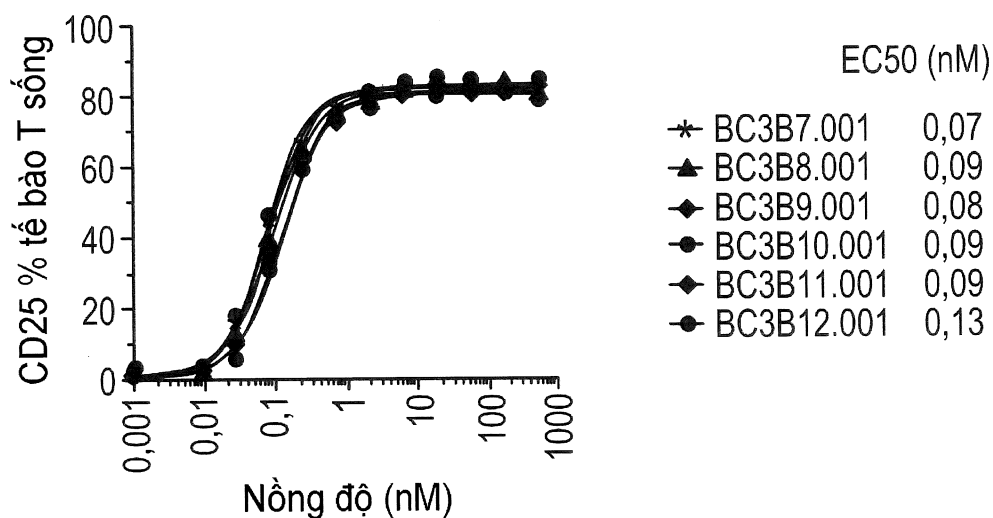
HÌNH 12A

Xét nghiệm cơ chế gây độc tế bào qua trung gian tế bào T
Tế bào H929 (48 giờ): ID người hiến tặng: M 5763 & 6576



HÌNH 12B

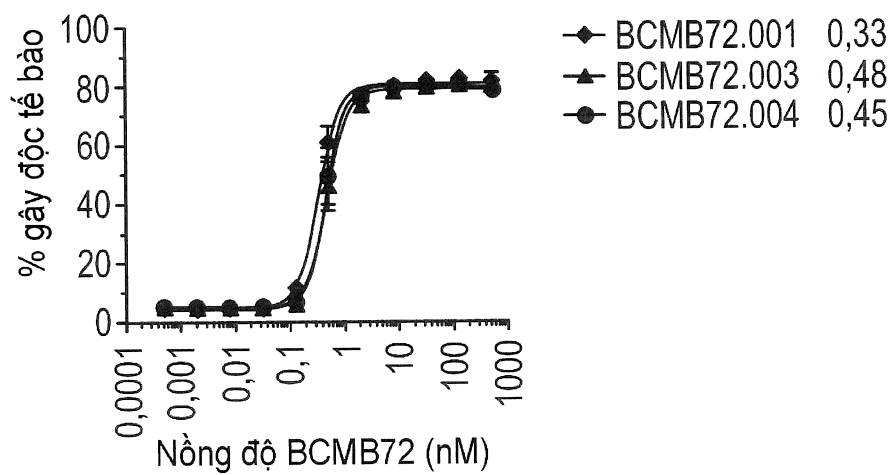
Xét nghiệm sự hoạt hóa tế bào T;
Tế bào H929 (48 giờ); ID người hiến tặng: M 5763 & 6576



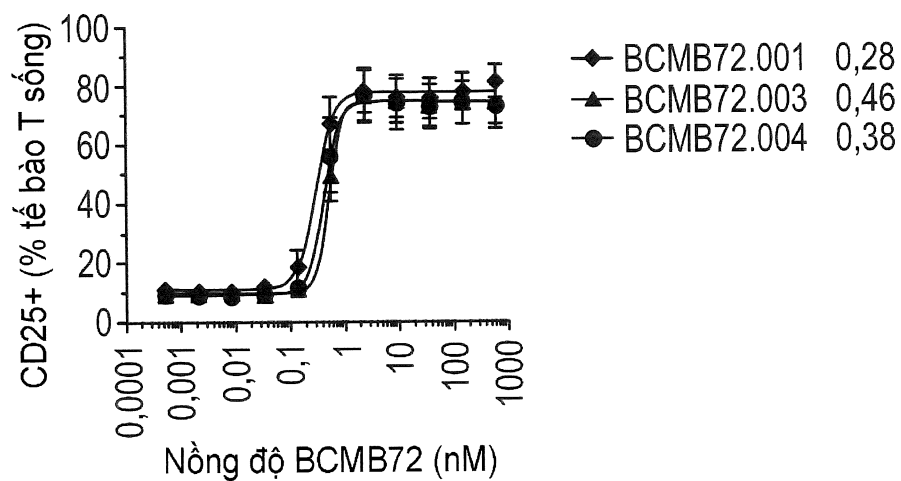
HÌNH 13

Phân tích EC ₅₀ của BCMAXCD3 (nM)						
	M2550	M5137	M6457	M6541	M6576	M7197
IFNg	2,049	~ 2,079	~ 2,112	~ 0,9252	1,366	1,126
TNFa	2,909	2,377	3,717	2,863	1,991	95,15
IL-2	3,262	1,645	2,508	1,297	1,501	1,767
IL-6	2,385	~ 2,054	1,65	~ 0,5650	0,7961	~ 0,5003
IL-8	1,031	0,3267	0,7208	~ 0,1117	0,328	~ 0,4640
IL-10	1,158	~ 0,7865	0,7296	~ 0,5154	~ 0,5217	0,9593

HÌNH 14A

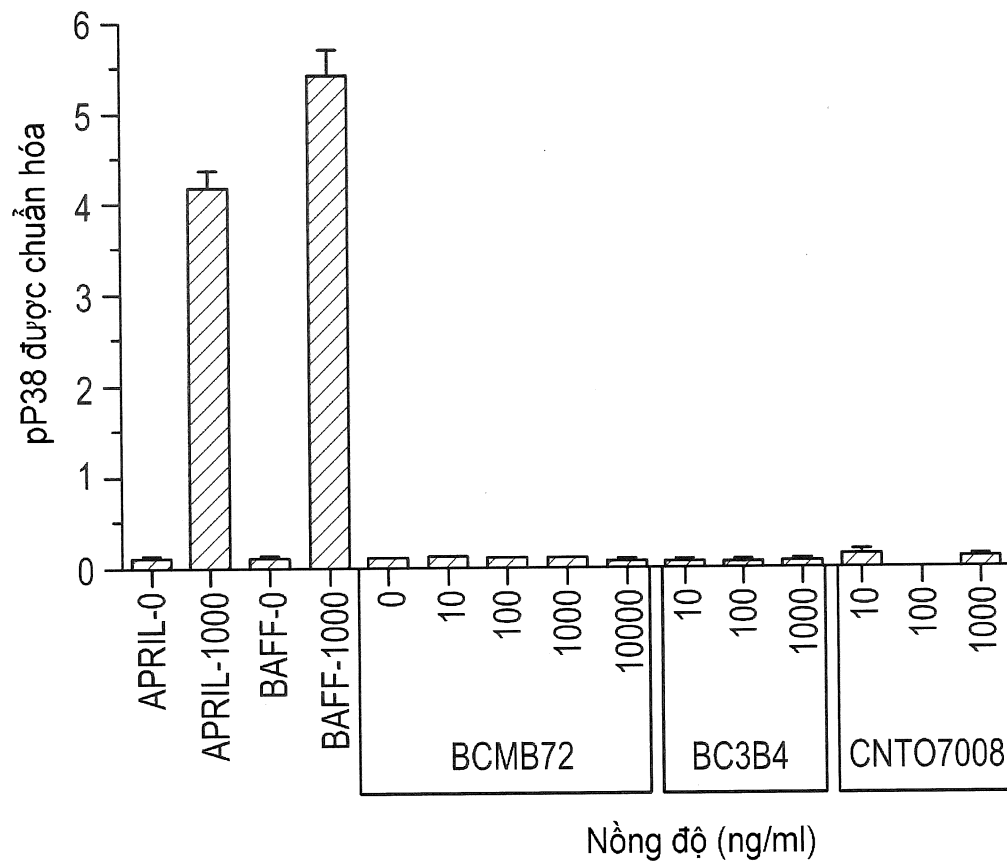


HÌNH 14B

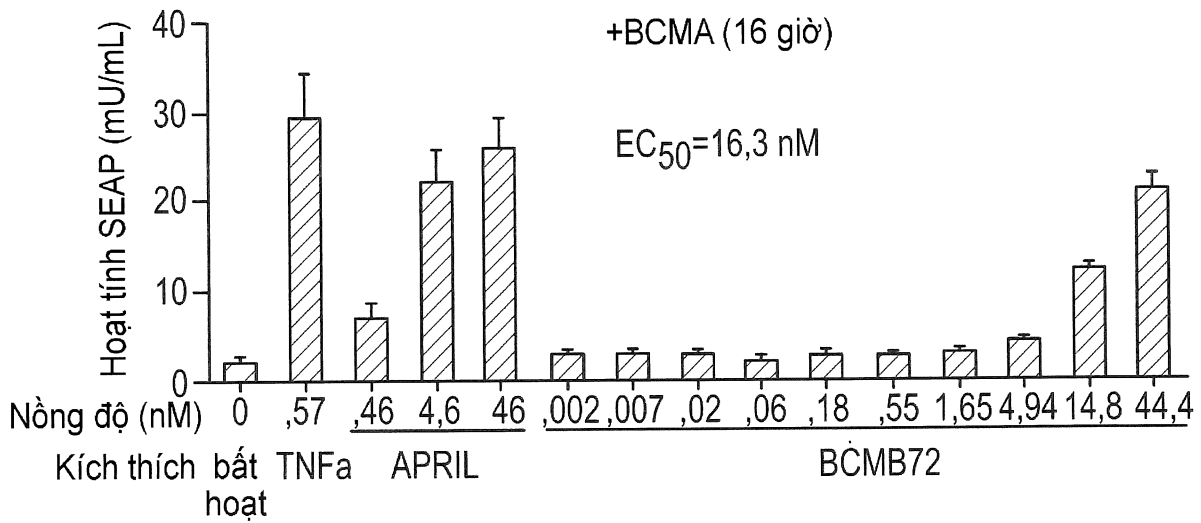


HÌNH 15

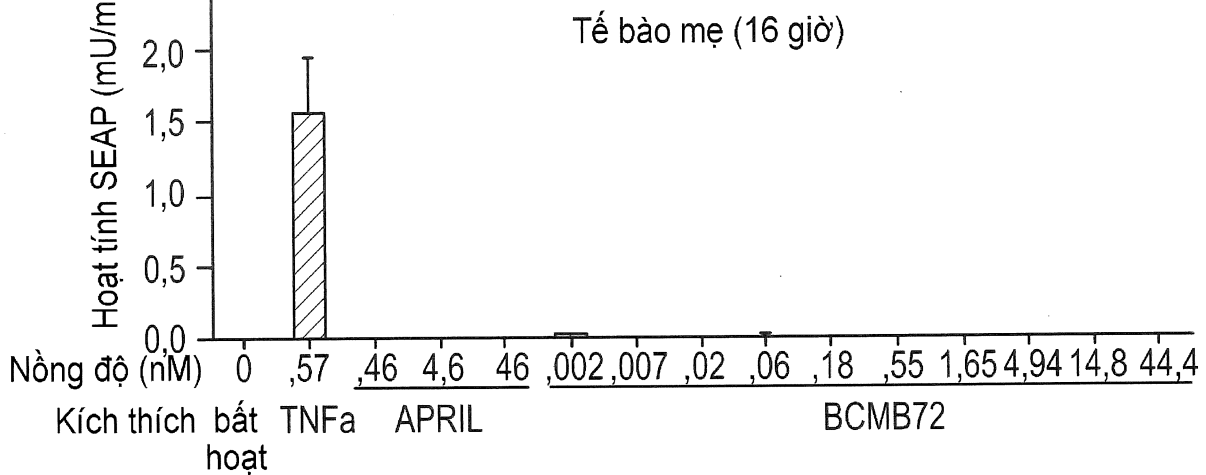
Hoạt hóa P38 trong tế bào H929



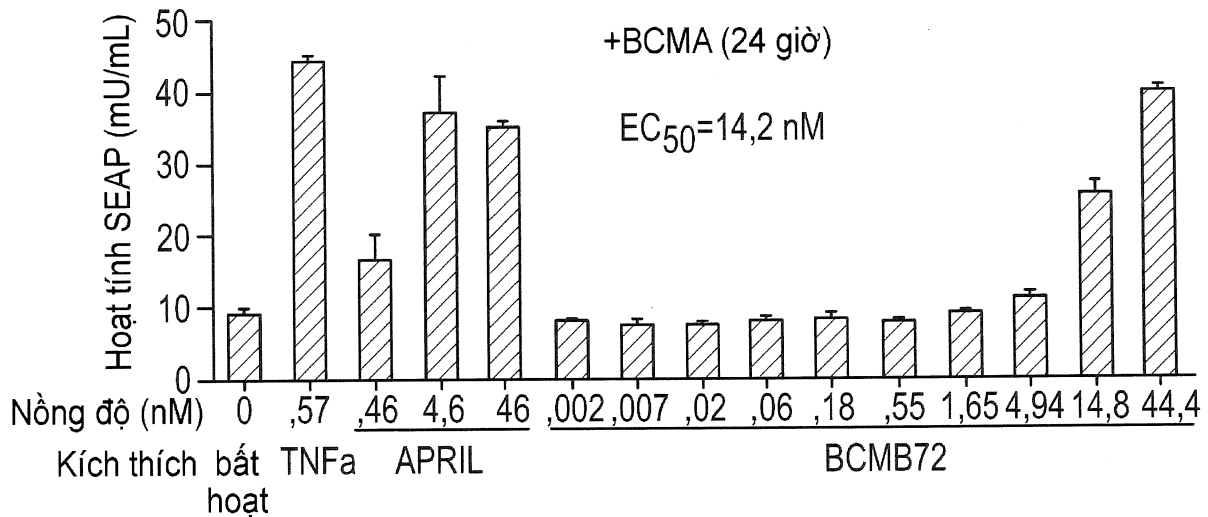
HÌNH 16A



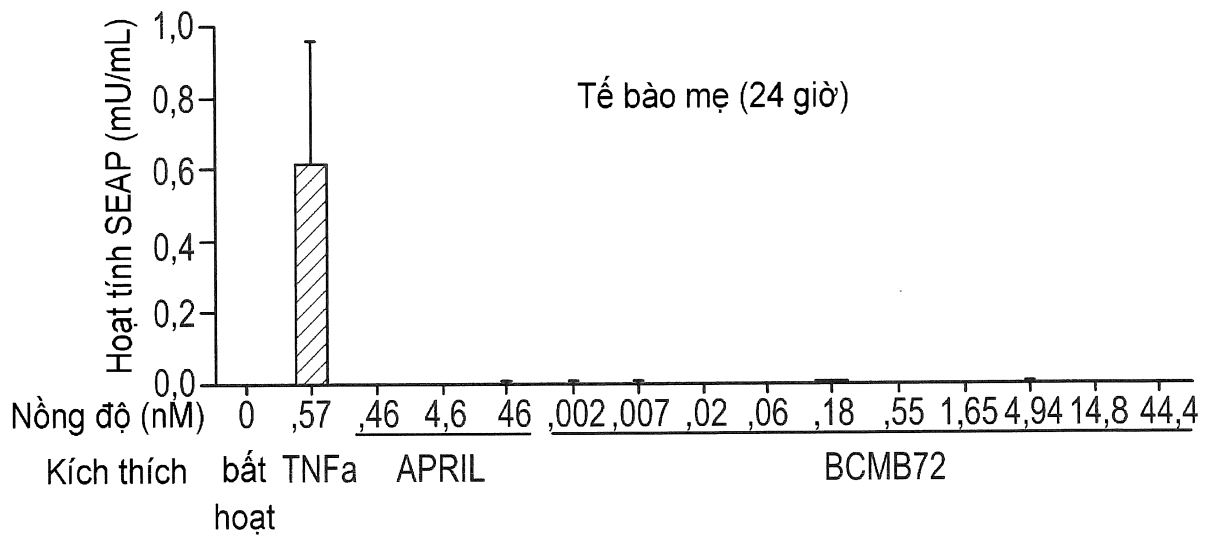
HÌNH 16B



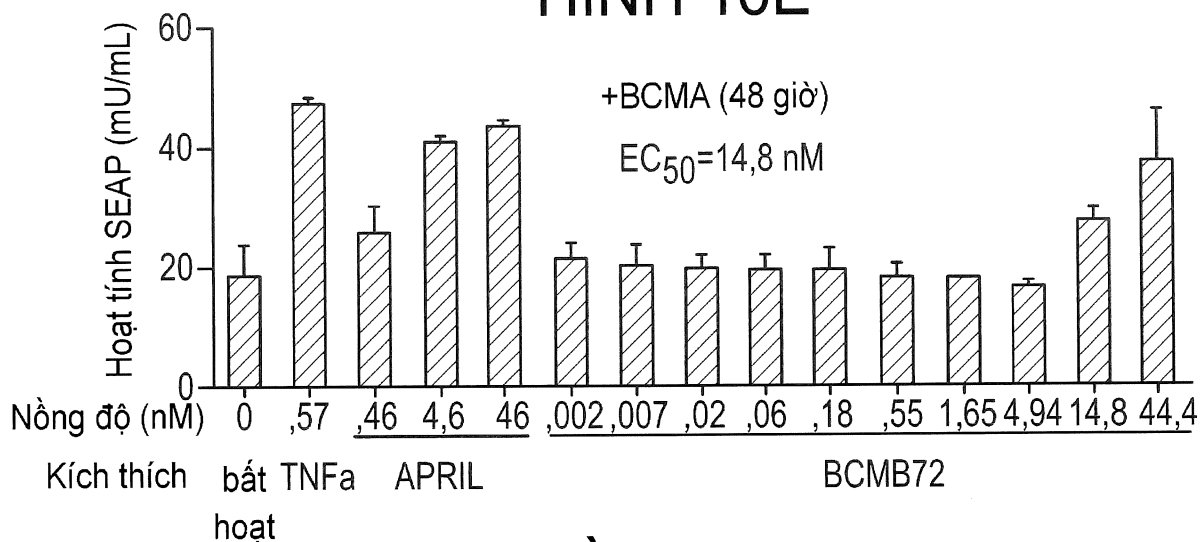
HÌNH 16C



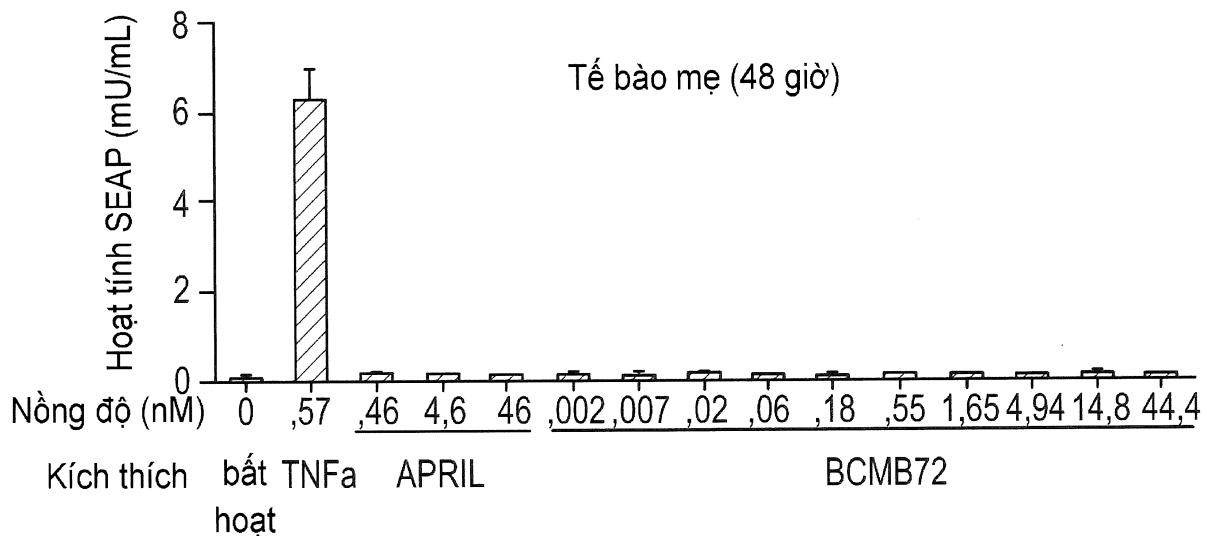
HÌNH 16D



HÌNH 16E



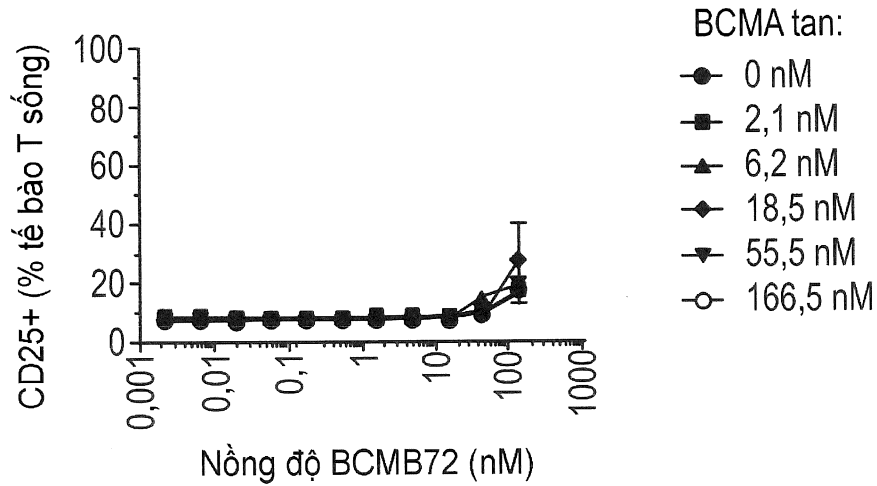
HÌNH 16F



HÌNH 17A

BCMB72; Tế bào T: M7077 và M5137

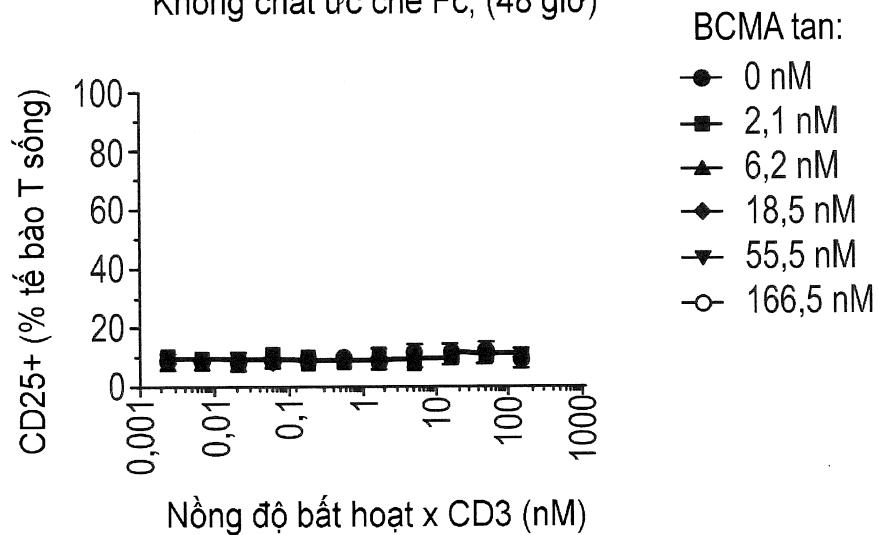
Không chất ức chế Fc, (48 giờ)

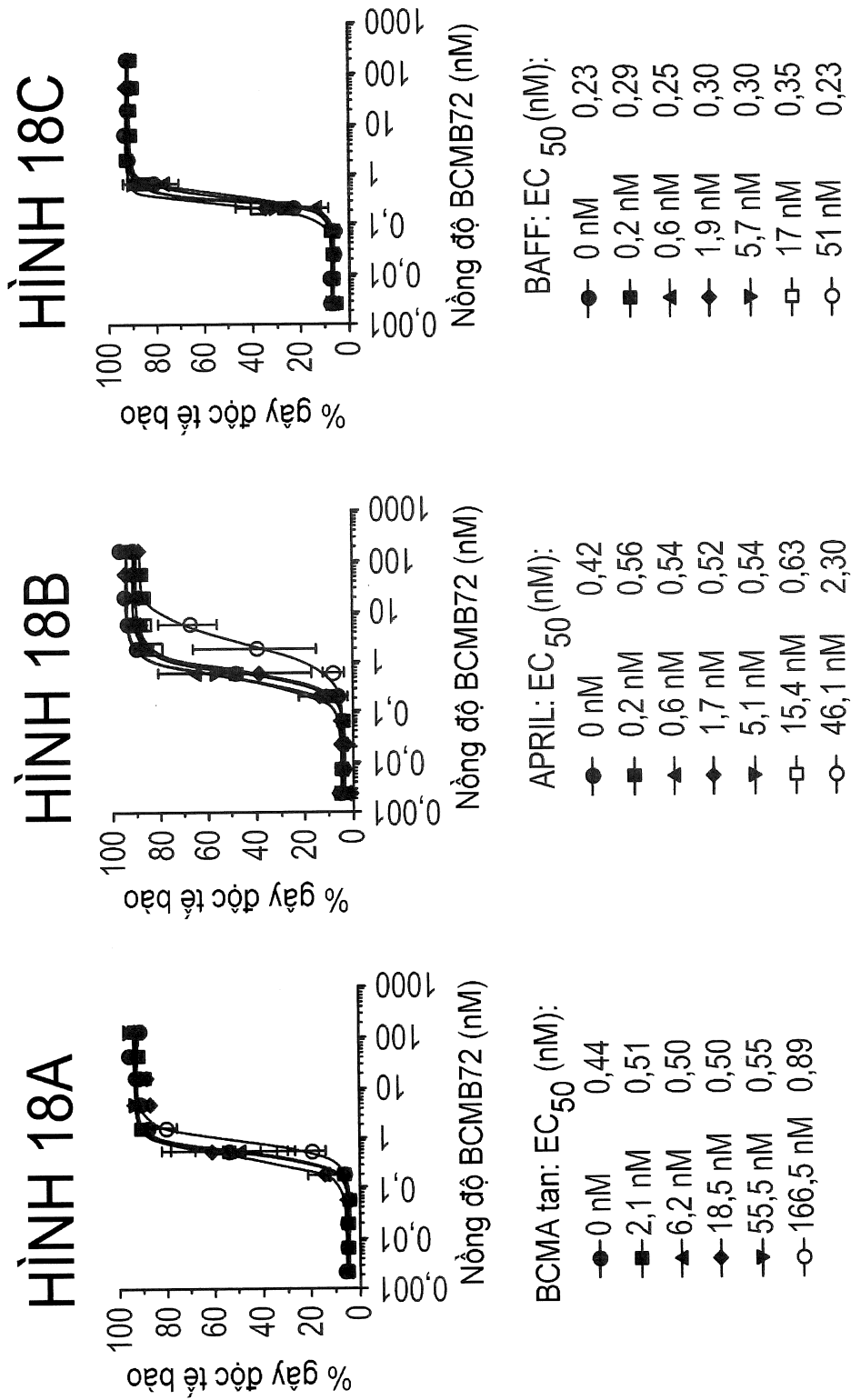


HÌNH 17B

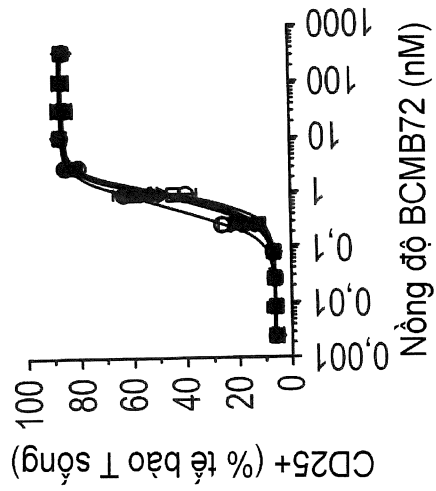
Bất hoạt x CD3; Tế bào T: M7077 và M5137

Không chất ức chế Fc, (48 giờ)



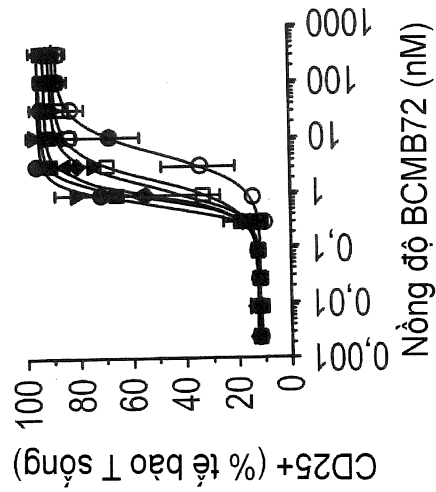


HÌNH 18F

BAFF: EC₅₀ (nM):

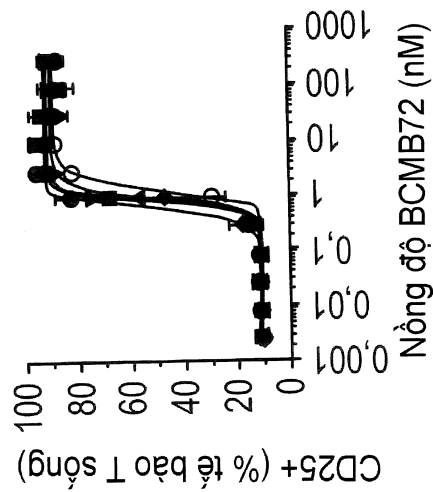
●	0 nM	0,37
■	0,2 nM	0,50
▲	0,6 nM	0,44
◆	1,9 nM	0,48
▼	5,7 nM	0,53
□	17 nM	0,62
○	51 nM	0,33

HÌNH 18E

APRIL: EC₅₀ (nM):

●	0 nM	0,40
■	0,2 nM	0,51
▲	0,6 nM	0,49
◆	1,7 nM	0,59
▼	5,1 nM	0,70
□	15,4 nM	0,96
○	46,1 nM	2,73

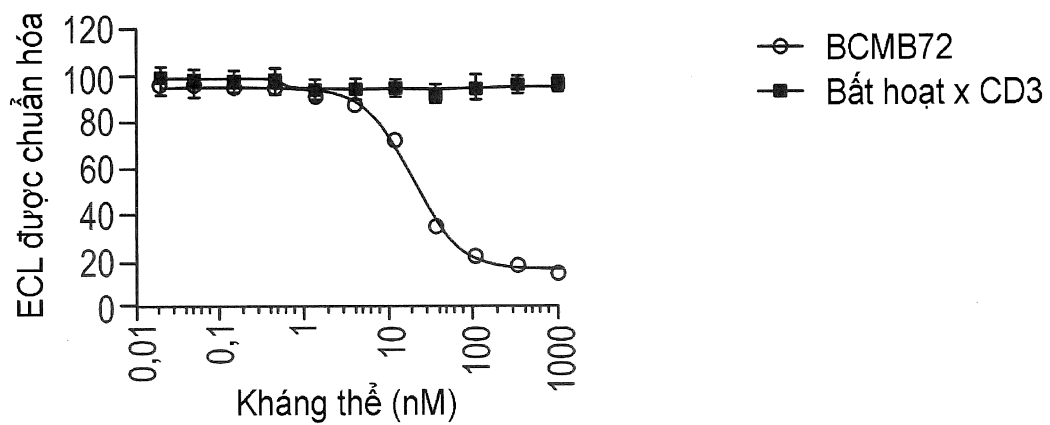
HÌNH 18D

BCMA tan: EC₅₀ (nM):

●	0 nM	0,42
■	2,1 nM	0,52
▲	6,2 nM	0,54
◆	18,5 nM	0,51
▼	55,5 nM	0,58
○	166,5 nM	0,80

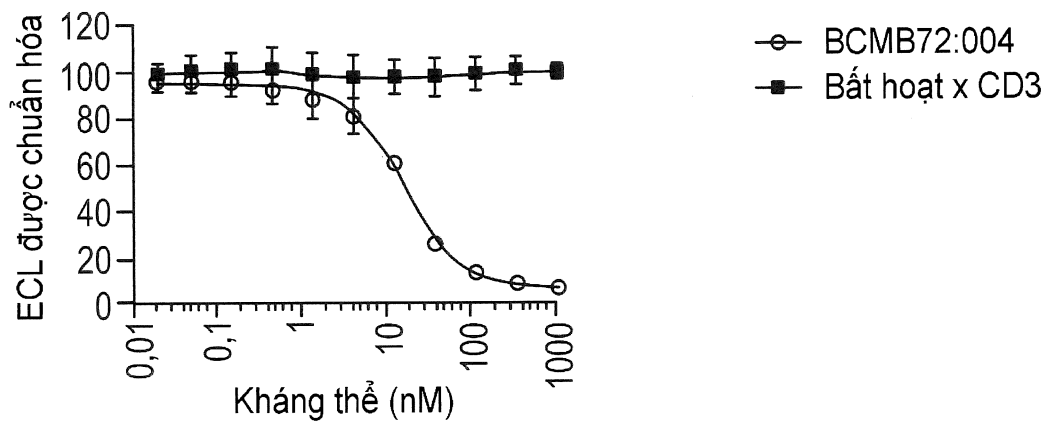
HÌNH 19A

BCMA liên kết với APRIL trong đĩa (n=2)



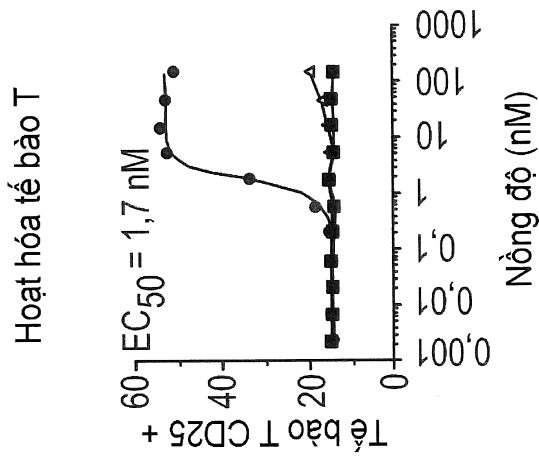
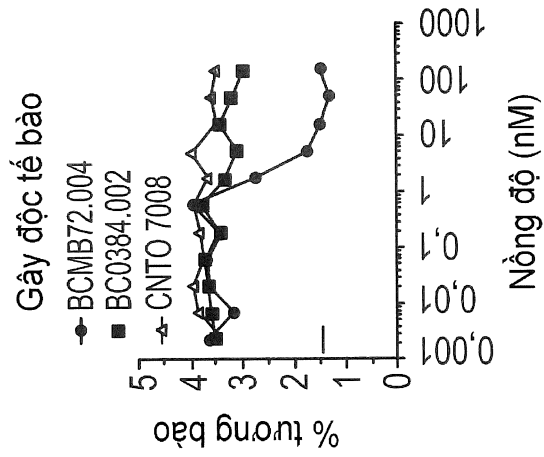
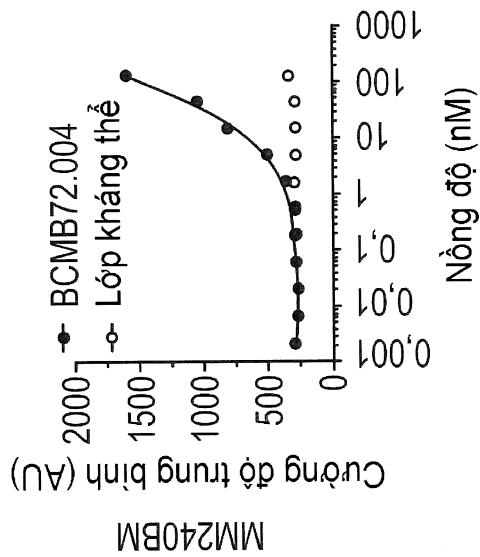
HÌNH 19B

BCMA liên kết với BAFF trong đĩa (n=2)

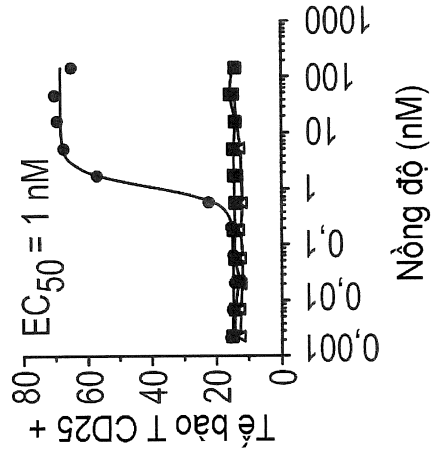
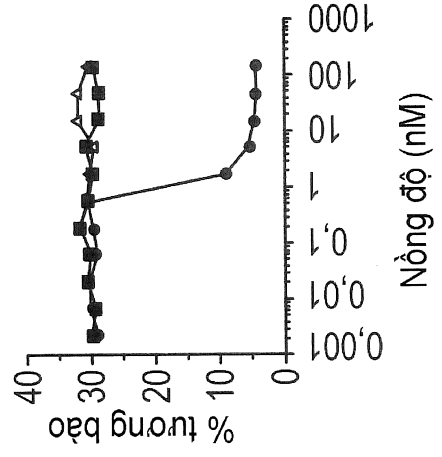
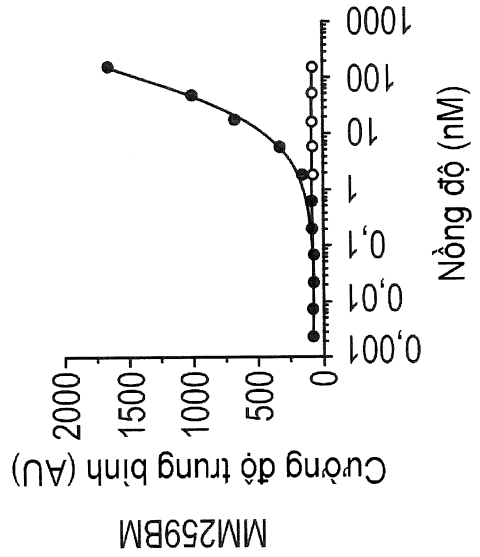


HÌNH 20A

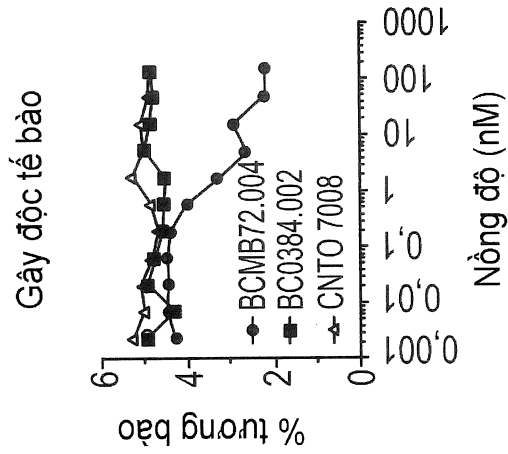
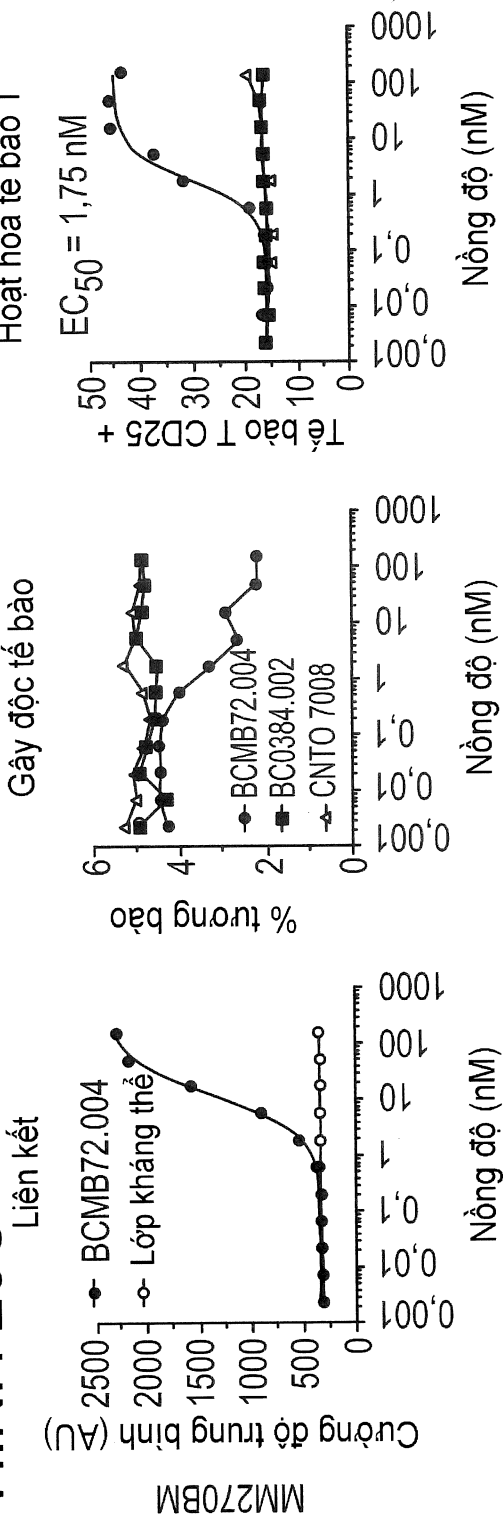
Liên kết



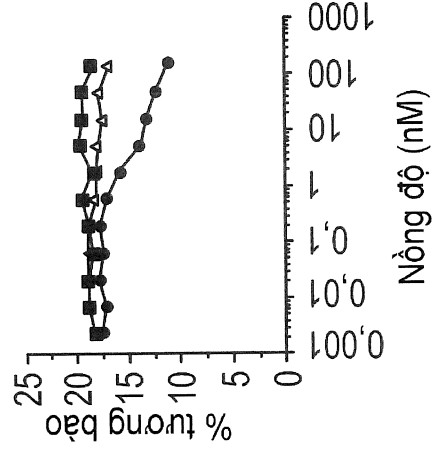
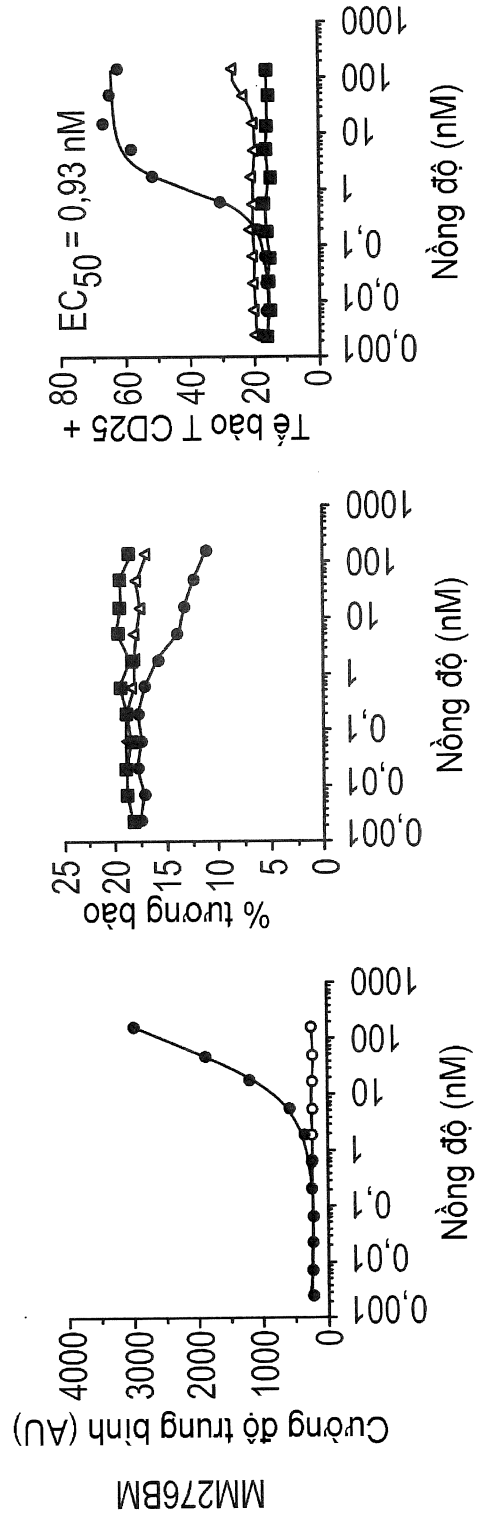
HÌNH 20B



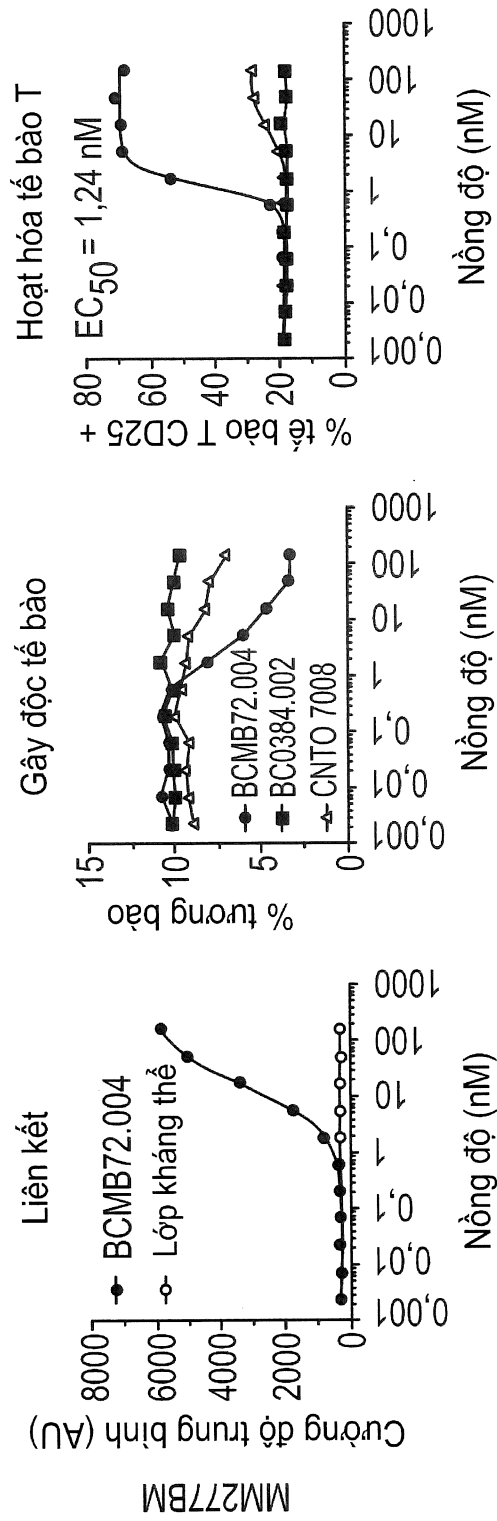
HÌNH 20C



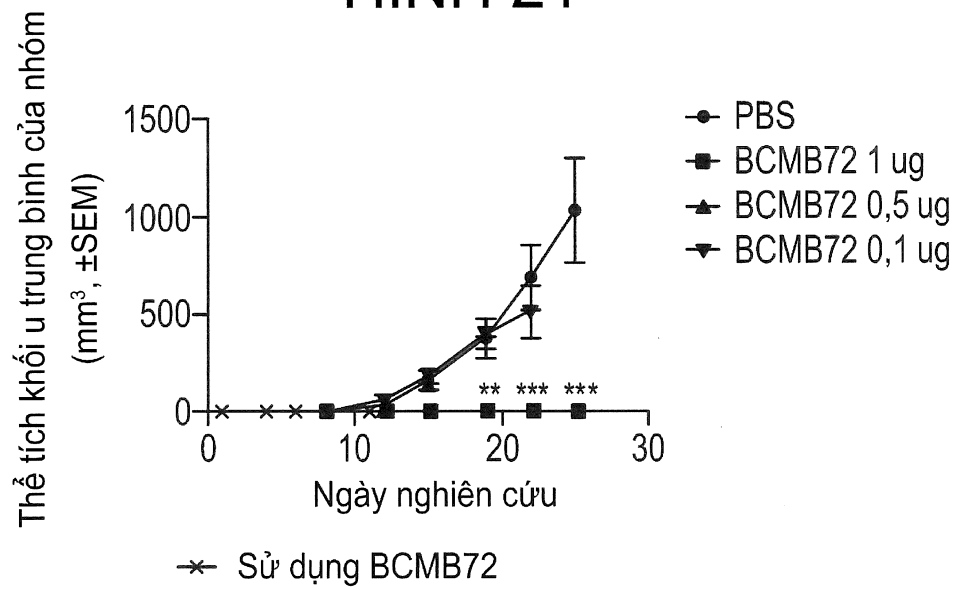
HÌNH 20D



HÌNH 20E



HÌNH 21



HÌNH 22

