(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) **1-0042009**

(51)[7] **C07K 16/28**; A61K 39/395; A61P 35/00; A61K 39/00; A61K 47/68

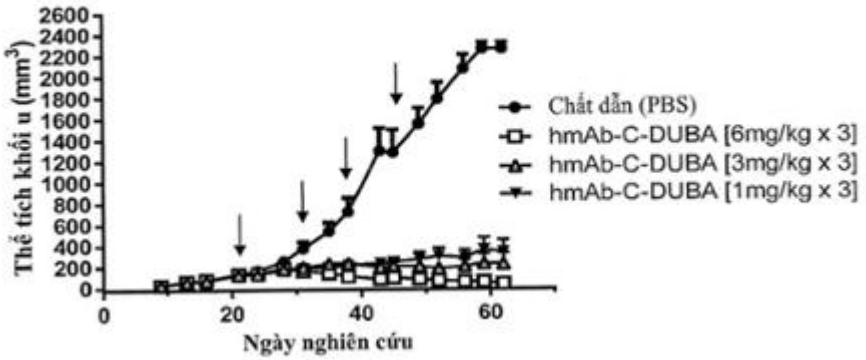
(13) **B**

(21) 1-2018-05004 (22) 13/04/2017
(86) PCT/US2017/027317 13/04/2017 (87) WO 2017/180813 19/10/2017
(30) 62/323,228 15/04/2016 US; 62/323,249 15/04/2016 US; 62/432,314 09/12/2016 US
(45) 25/12/2024 441 (43) 25/03/2019 372A
(73) MACROGENICS, INC. (US)
9704 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, United States of America
(72) LOO, Deryk, T. (CA); HUANG, Ling (US); JOHNSON, Leslie, S. (US); SON, Thomas (US); SCRIBNER, Juniper (US); BONVINI, Ezio (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) THỂ TIẾP HỢP DƯỢC CHẤT KHÁNG THỂ KHÁNG B7-H3, PHÂN TỬ GẮN KẾT B7-H3 VÀ DƯỢC PHẨM BAO GỒM PHÂN TỬ GẮN KẾT NÀY

(57) Sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết B7-H3 mới có khả năng gắn kết với B7-H3 của người và không phải của người, và cụ thể là tới các phân tử mà có tính phản ứng chéo với B7-H3 của động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ, khỉ cynomolgus). Sáng chế còn đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm các miền chuỗi nhẹ thay đổi và/hoặc chuỗi nặng thay đổi (VH) đã được làm tương thích với người và/hoặc được khử miễn dịch sao cho thể hiện tính gây miễn dịch giảm đi khi sử dụng cho các đối tượng tiếp nhận. Cụ thể, sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết B7-H3 hai đặc hiệu, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu, bao gồm các diabody hai đặc hiệu, các BiTE, các kháng thể hai đặc hiệu, các phân tử gắn kết hoá trị ba, v.v. mà bao gồm: (i) các miền thay đổi gắn kết-B7-H3 này và (ii) miền có khả năng gắn kết với epitop của phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng. Sáng chế cũng đề cập tới phân tử mà bao gồm miền gắn kết-B7-H3 của người của kháng thể kháng-B7-H3 của người được làm tương thích với người được tiếp hợp với ít nhất một gốc dược chất ("B7-H3-ADC").

Nghiên cứu hiệu quả *in vivo* liều chia nhiều lần của các tế bào hmAb-C-DUBA - Calu-6



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 mới có khả năng gắn kết với B7-H3 của người và không phải của người, và cụ thể là tới các phân tử mà có tính phản ứng chéo với B7-H3 của động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ, khỉ cynomolgus). Sáng chế còn đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm các miền chuỗi nhẹ thay đổi và/hoặc chuỗi nặng thay đổi đã được làm tương thích với người và/hoặc được khử miễn dịch sao cho thể hiện tính gây miễn dịch giảm đi khi sử dụng cho các đối tượng tiếp nhận. Cụ thể, sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 hai đặc hiệu, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu, bao gồm diabody hai đặc hiệu, các BiTE, các kháng thể hai đặc hiệu, các phân tử gắn kết hoá trị ba, *v.v.* bao gồm: (i) các miền thay đổi gắn kết-B7-H3 và (ii) miền có khả năng gắn kết với epitop của phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng. Sáng chế cũng đề cập tới các dược phẩm mà có chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết-B7-H3 này, và tới các phương pháp bao gồm việc sử dụng phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết-B7-H3 này trong điều trị bệnh ung thư và các bệnh và tình trạng bệnh khác. Cụ thể, sáng chế cũng đề cập tới phân tử mà bao gồm miền gắn kết-B7-H3 của người của kháng thể kháng-B7-H3 của người được làm tương thích với người được tiếp hợp với ít nhất một nhóm dược chất ("B7-H3-ADC"). Sáng chế cũng đề cập tới các dược phẩm mà có chứa các B7-H3-ADC này, và tới các phương pháp bao gồm việc sử dụng phân tử bất kỳ trong số các B7-H3-ADC này trong điều trị bệnh ung thư và các bệnh và tình trạng bệnh khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự phát triển và di căn của các khối u tùy thuộc phần lớn vào khả năng lẩn tránh được sự giám sát miễn dịch của vật chủ và vượt qua được sự phòng vệ của vật chủ của chúng. Phần lớn các khối u biểu hiện các kháng nguyên mà có thể được nhận biết ở mức độ khác nhau bởi hệ miễn dịch của vật chủ, nhưng trong nhiều trường hợp, có đáp ứng miễn dịch không đầy đủ do kích hoạt kém hiệu quả các tế bào T hiệu ứng ("*Cytokine, Chemokine, and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the*

Immunotherapy of Solid Tumors," Exper. Pharmacol. 181:291-328 của Khawli, L.A. *et al.* (2008)).

I. Siêu họ B7 và B7-H3

B7-H3 là một thành viên của siêu họ B7-CD28 và được biểu hiện trên các tế bào trình diện-kháng nguyên. Nó gắn kết với các tế bào T, tuy nhiên, thụ thể-đối ứng B7-H3 trên bề mặt của các tế bào T này chưa được xác định đặc tính một cách đầy đủ.

B7-H3 là độc nhất ở chỗ dạng chính của người có chứa 2 miền IgV-IgC sóng đôi (tandem) ngoại bào (có nghĩa là, IgV–IgC–IgV–IgC) ("*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*," Genome Biol. 6:223.1-223.7, của Collins, M. *et al.* (2005)). Mặc dù, ban đầu nó được cho là chỉ bao gồm 2 miền Ig (IgV–IgC), đã nhận diện được một biến thể miền ngoại bào 4 globulin miễn dịch ("4Ig-B7-H3") và xác định được đó là dạng phổ biến ở người của protein này ("*The B7-CD28 Superfamily*," Nature Rev. Immunol. 2:116-126, của Sharpe, A.H. *et al.* (2002)). Tuy nhiên, dạng tự nhiên của chuột (2Ig) và dạng 4Ig của người thể hiện chức năng tương tự nhau ("*The Contrasting Role Of B7-H3*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278, của Hofmeyer, K. *et al.* (2008)). Phân tử 4Ig-B7-H3 ức chế quá trình phân giải các tế bào ung thư qua trung gian tế bào-giết tự nhiên (NK) ("*Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma -Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(34): 12640-12645, của Castriconi, R. *et al.*). Đã có báo cáo là B7-H3 (dạng 2Ig) thúc đẩy kích hoạt tế bào T và sản sinh IFN-γ bằng cách gắn kết với thụ thể giả định trên các tế bào T đã được kích hoạt ("*B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γ Production*," Nature Immunol. 2:269–274, của Chapoval, A. *et al.* (2001)). Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây chỉ ra vai trò ức chế của B7-H3 của chuột và của người ("*Murine B7-H3 Is A Negative Regulator Of T Cells*, J Immunol. 173:2500-2506, của Prasad, D.V., *et al.* (2004); "*B7-H3 Is A Potent Inhibitor Of Human T-Cell Activation: No Evidence For B7-H3 and TREML2 Interaction*." Eur. J. Immunol. 39:1754-1764, của Leitner, J., *et al.* (2009); "*B7-H3 expression in Dnor T Cells and Host Cells Negatively Regulates Acute Graft-Versus-Host Disease Lethality*," Blood

125:3335-3346., của Veenstra, R.G., *et al.* (2015)). Đã tìm thấy có biểu hiện ARN thông tin của B7-H3 ở tim, thận, tinh hoàn, phổi, gan, tụy, tuyến tiền liệt, ruột kết, và các nguyên bào xương ("*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*," Genome Biol. 6:223.1-223.7, (2005) của Collins, M. *et al.*). Ở mức độ protein, B7-H3 được tìm thấy ở gan, phổi, bàng quang, tinh hoàn, tuyến tiền liệt, vú, nhau thai và các cơ quan lympho của người ("*The Contrasting Role Of B7-H3*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278, của Hofmeyer, K. *et al.* (2008)).

Mặc dù B7-H3 không được biểu hiện trên các tế bào không hoạt động B hoặc các tế bào T, các bạch cầu đơn nhân, các tế bào dạng nhánh, phân tử này được gây cảm ứng trên các tế bào dạng nhánh bởi IFN-γ và trên các bạch cầu đơn nhân bởi GM-CSF ("*The B7-CD28 Superfamily*," Nature Rev. Immunol. 2:116-126, của Sharpe, A.H. *et al.* (2002)). Cơ chế hoạt động của B7-H3 là phức tạp, và protein này được báo cáo là điều tiết cả quá trình đồng-kích thích và đồng-ức chế tế bào T ("*The Contrasting Role Of B7-H3*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278, của Hofmeyer, K. *et al.* (2008); "*Inhibitory Costimulation and Anti-Tumor Immunity*," Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298, của Martin-Orozco, N. *et al.* (2007); "*The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition*," J. Mol. Med. 83:193-202, của Subudhi, S.K. *et al.* (2005)). B7-H3 gắn kết với (các) thụ thể hiện vẫn chưa được nhận diện để điều tiết quá trình đồng-ức chế các tế bào T. Ngoài ra, B7-H3, thông qua các tương tác với (các) thụ thể chưa biết, là chất ức chế đối với các tế bào NK và các nguyên bào xương ("*The Contrasting Role Of B7-H3*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278, của Hofmeyer, K. *et al.* (2008)). Việc ức chế này có thể hoạt động thông qua các tương tác với các thành viên của các con đường tín hiệu chủ yếu, mà thông qua đó thụ thể tế bào T (TCR) điều hoà quá trình phiên mã gen (ví dụ, các yếu tố NFTA, NF-κB, hoặc AP-1). B7-H3 cũng được cho là ức chế Th1, Th2, hoặc Th17 *in vivo* ("*Murine B7–H3 Is A Negative Regulator Of T Cells*," J. Immunol. 173:2500-2506, của Prasad, D.V. *et al.* (2004); "*B7–H3 Regulates The Development Of Experimental Allergic Conjunctivitis In Mice*," Immunol. Lett. 113:52-57, của Fukushima, A. *et al.* (2007); "Fine *Tuning The Immune Response Through B7-H3 and B7-H4*," Immunol. Rev. 229:145-151, của Yi. K.H. *et al.* (2009)).

II. Các khối u biểu hiện B7-H3

B7-H3 cũng đã biết là được biểu hiện ở nhiều loại tế bào ung thư (ví dụ, u nguyên bào thần kinh, các bệnh ung thư dạ dày, ung thư buồng trứng, ung thư phổi không tế bào nhỏ, xem, ví dụ, "*Monoclonal Antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors*," Cancer Res 61:4048-54, của Modak, S., *et al.* (2001)) và các tế bào tương tự-tế bào gốc ung thư được nuôi cấy. Một số nghiên cứu độc lập đã cho thấy là các tế bào khối u ác tính ở người thể hiện gia tăng đáng kể biểu hiện protein B7-H3 và mức biểu hiện gia tăng này có liên quan đến mức độ nghiêm trọng của bệnh gia tăng ("*The B7 Family and Cancer Therapy: Costimulation and Coinhibition*," Clin. Cancer Res. 13:5271-5279, của Zang, X. *et al.* (2007); "*B7-H3 và B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer*," Lung Cancer 53:143-51, của Sun, Y., *et al.* (2006); "*B7-H3 Contributes To The Metastatic Capacity Of U melanin Cells By Modulation Of Known Metastasis-Associated Genes*," Int. J. Cancer 130:2282-90, của Tekle, C., *et al.* (2012); "*B7-H3 Mediated Tumor Immunology: Friend or Foe?*," Int. J. Cancer 134(12):2764-2771, của Wang, L., *et al.* (2013)), gợi ý là B7-H3 được các khối u khai thác như một con đường lẩn tránh miễn dịch ("*The Contrasting Role Of B7-H3*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278, của Hofmeyer, K. *et al.* (2008)).

Biểu hiện protein B7-H3 cũng đã được phát hiện bằng miễn dịch mô ở các dòng tế bào khối u ("*B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γ Production*," Nature Immunol. 2:269–274, của Chapoval, A. *et al.* (2001); "*Expression Of Genes For B7-H3 and Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation and Activation*," Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 287:L217–L225, của Saatian, B. *et al.* (2004); WO 2004/001381 của Mather, J. *et al.*; "*Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(34):12640-12645), của Castriconi *et al.* (2004); "*Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes*," J. Immunol. 168:6294-6297, của Sun, M. *et al.* (2002)).

Vai trò của B7-H3 trong ức chế hệ miễn dịch và biểu hiện gia tăng của B7-H3 ở các khối u của người gợi ý là phân tử này có thể có vai trò làm đích trị liệu cho điều trị bệnh ung thư. Do đó, đã có đề xuất sử dụng các kháng thể kháng-B7-H3 và các phân tử khác mà điều biến quá trình biểu hiện B7-H3 để điều trị các khối u và/hoặc điều biến tăng đáp ứng miễn dịch (xem, "*Development of an Fc-Enhanced Anti–B7-H3 Monoclonal Antibody with Potent Antitumor Activity*," Clin Cancer Res; 18: 3834-3845, của Loo, D. *et al.* (2012); "*Humanized Affinity-Matured Monoclonal Antibody 8H9 Has Potent Anti-Tumor Activity and Binds to FG Loop of B7-H3*," J. Biol. Chem. 290: 30018-30029, của Ahmed, M. *et al.* (2015); "*Development of DS-5573a: A novel afucosylated monoclonal antibody directed at B7-H3 with potent antitumor activity*," Cancer Sci. 2016, doi: 10.1111/cas.12915, của Nagase-Zembutsu, A. *et al.* (2016); "*Disialoganglioside GD2 and Antigen 8H9: Potential Targets For Antibody-Based Immunotherapy Against Desmoplastic Small Round Cell Tumor (DSRCT) and Rhabdomyosarcoma (RMS)*," Proceedings Of The American Association For Cancer Research Annual Meeting, Vol. 40:474 (9^{0th} Annual Meeting Of The American Association For Cancer Research; Philadelphia, Pennsylvania, US; April 10-14, 1999, của Modak, S. *et al.* (tháng 3 năm 1999); "*Radioimmunotargeting To Human Rhabdomyosarcoma Using Monoclonal Antibody 8H9*," Proc. Am. Assoc. Cancer Res.41:724, của Modak, S. *et al.* (tháng 3 năm 2000); "*Monoclonal Antibody 8H9 Targets A Novel Cell Surface Antigen Expressed By A Wide Spectrum Of Human Solid Tumors*," Cancer Res. 61(10):4048-4054, của Modak, S. *et al.* (2001); "*Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3, a Member of the B7 Family with Four Ig-Like Domains*," J. Immunol. 172(4):2352-2359, của Steinberger, P. *et al.* (2004); "*MicroRNA miR-29 Modulates Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3: Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors*," Cancer Res. 69(15):5275-6281, của Xu, H. *et al.* (2009); tương tự xem các Patent Mỹ số 7,279,567, 7,358,354, 7,368,554, 7,527,969, 7,718,774, 8,216,570, 8,779,098, 8,802,091, 9,150,656, Công bố Patent Mỹ số 2002/0168762; 2005/0202536, 2008/0081346, 2008/0116219, 2009/0018315, 2009/0022747, 2009/0087416, 2013/0078234, 2015/0274838, các Công bố đơn PCT số WO 2008/066691; WO 2006/016276; WO 2008/116219; WO 04/001381, WO 2001/094413, WO 2002/10187, WO 2002/32375, WO

2004/093894, WO 2006/016276, WO 2008/116219, WO 2011/109400; và EP 1292619B.

Cho dù có các thành công trước đây, vẫn có nhu cầu các chất trị liệu bổ sung mà nhằm đích và tiêu diệt các tế bào khối u biểu hiện B7-H3. Sáng chế nhằm vào nhu cầu này và các mục đích khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 mới có khả năng gắn kết với B7-H3 của người và không phải của người, và cụ thể là các phân tử này có tính phản ứng chéo với B7-H3 của động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ, khỉ cynomolgus). Sáng chế còn đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 mà bao gồm các miền chuỗi nhẹ thay đổi và/hoặc chuỗi nặng thay đổi (VH) đã được làm tương thích với người và/hoặc được khử miễn dịch sao cho thể hiện tính gây miễn dịch giảm đi khi sử dụng cho các đối tượng tiếp nhận. Cụ thể, sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 hai đặc hiệu, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu, bao gồm các diabody hai đặc hiệu, các BiTE, các kháng thể hai đặc hiệu, các phân tử gắn kết hoá trị ba, *v.v.* mà bao gồm: (i) các miền thay đổi gắn kết-B7-H3 này và (ii) miền có khả năng gắn kết với epitop của phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng. Sáng chế cũng đề cập tới các dược phẩm có chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết-B7-H3, và tới các phương pháp bao gồm việc sử dụng phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết-B7-H3 này trong điều trị bệnh ung thư và các bệnh và tình trạng bệnh khác. Cụ thể, sáng chế cũng đề cập tới phân tử bao gồm miền gắn kết-B7-H3 của người của kháng thể kháng-B7-H3 của người được làm tương thích với người được tiếp hợp với ít nhất một nhóm dược chất ("B7-H3-ADC"). Sáng chế cũng đề cập tới các dược phẩm mà có chứa các B7-H3-ADC này, và tới các phương pháp bao gồm việc sử dụng phân tử bất kỳ trong số các B7-H3-ADC này trong điều trị bệnh ung thư và các bệnh và tình trạng bệnh khác.

Cụ thể là, một khía cạnh của sáng chế đề xuất phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm miền chuỗi nhẹ thay đổi (VL) và miền chuỗi nặng thay đổi (VH), trong đó miền chuỗi nặng thay đổi này bao gồm miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3, và miền chuỗi nhẹ thay đổi này bao gồm miền CDR_L1, miền CDR_L2, và miền CDR_L3, trong

đó ít nhất 3 trong số các miền này, ít nhất 4 trong số các miền này, ít nhất 5 trong số các miền này hoặc tất cả các miền này được chọn từ nhóm gồm:

(1) miền CDR_H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27;

(2) miền CDR_H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28;

(3) miền CDR_H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29;

(4) miền CDR_L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23;

(5) miền CDR_L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; và

(6) miền CDR_L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25.

Sáng chế còn đề cập đến phương án của phân tử gắn kết B7-H3 nêu trên bao gồm miền chuỗi nhẹ thay đổi (VL) nêu trên mà bao gồm miền CDR_L1, miền CDR_L2, và miền CDR_L3, và miền chuỗi nặng thay đổi (VH) nêu trên mà bao gồm miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3, trong đó:

(1) miền CDR_H1 nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27;

(2) miền CDR_H2 nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28;

(3) miền CDR_H3 nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29.

Sáng chế còn đề cập đến phương án của phân tử gắn kết B7-H3 nêu trên bao gồm miền chuỗi nhẹ thay đổi (VL) nêu trên mà bao gồm miền CDR_L1, miền CDR_L2, và miền CDR_L3, và miền chuỗi nặng thay đổi (VH) nêu trên mà bao gồm miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3, trong đó:

(1) miền CDR_L1 nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23;

(2) miền CDR_L2 nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; và

(3) miền CDR_L3 nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25.

Sáng chế còn đề cập đến phương án của các phân tử gắn kết-B7-H3 nêu trên, trong đó miền chuỗi nặng thay đổi (VH) nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26 hoặc SEQ ID NO:31.

Sáng chế còn đề cập đến phương án của các phân tử gắn kết-B7-H3 nêu trên, trong đó miền chuỗi nhẹ thay đổi (VL) nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:30.

Sáng chế còn đề cập đến các phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm miền VL và miền VH, trong đó miền VL này bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20.

Sáng chế còn đề cập đến các phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm miền VL và miền VH, trong đó miền VH này bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21.

Sáng chế còn đề cập đến các phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm miền VL và miền VH, trong đó miền VL này bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20 và miền VH này bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21.

Sáng chế còn đề cập tới phương án các phân tử gắn kết-B7-H3 nêu trên, trong đó phân tử này là kháng thể hoặc mảnh gắn kết-epitop của nó. Sáng chế còn đề cập tới phương án phân tử gắn kết-B7-H3, trong đó phân tử này là kháng thể hai đặc hiệu hoặc diabody, đặc biệt là diabody, hoặc phức hợp diabody, mà bao gồm hai, ba, bốn hoặc năm chuỗi polypeptit mỗi chuỗi có đầu tận cùng-N và đầu tận cùng-C, trong đó các chuỗi polypeptit này kết hợp với nhau thông qua một hoặc nhiều liên kết cộng hoá trị, và đặc biệt là một hoặc nhiều liên kết disulfua cộng hóa trị. Sáng chế còn đề cập đến phương án phân tử gắn kết-B7-H3, trong đó phân tử này là phân tử gắn kết hoá trị ba, và đặc biệt là, trong đó, phân tử gắn kết hoá trị ba này là phức hợp được liên kết cộng hoá trị mà bao gồm ba, bốn, năm hoặc nhiều chuỗi polypeptit. Sáng chế còn đề cập tới phương án phân tử gắn kết-B7-H3 nêu trên, trong đó phân tử này bao gồm miền Fc. Sáng chế còn đề cập đến phương án các phân tử gắn kết-B7-H3, trong đó phân tử này là diabody và bao gồm miền gắn kết-albumin, và đặc biệt là miền gắn kết-albumin được khử miễn dịch.

Sáng chế còn đề cập tới các phương án của các phân tử gắn kết-B7-H3 mà còn bao gồm miền Fc, và đặc biệt là trong đó miền Fc là miền Fc biến thể mà bao gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin làm giảm ái lực của miền Fc biến thể đối với FcγR và/hoặc làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của phân tử gắn kết-B7-H3 này, và cụ thể hơn là, trong đó các cải biến này bao gồm ít nhất một thay thế được chọn từ nhóm gồm:

(a) L234A;

(b) L235A;

(c) L234A và L235A;

(d) M252Y; M252Y và S254T;

(e) M252Y và T256E;

(f) M252Y, S254T và T256E; và

(g) K288D và H435K;

trong đó cách đánh số là theo chỉ số EU trong tài liệu của Kabat.

Sáng chế còn đề cập tới phương án của các phân tử gắn kết-B7-H3 nêu trên, trong đó phân tử này là hai đặc hiệu, và cụ thể là đề cập tới phương án, trong đó phân tử này bao gồm 2 vị trí gắn kết epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của B7-H3 và 2 vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng, hoặc phương án, trong đó phân tử này bao gồm một vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của B7-H3 và một vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng.

Sáng chế còn đề cập đến phương án của các phân tử gắn kết-B7-H3 nêu trên, trong đó phân tử này là phân tử gắn kết hoá trị ba, và cụ thể là đề cập tới phương án trong đó phân tử này bao gồm một vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của B7-H3, một vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của phân tử thứ nhất có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu

ứng; và một vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của phân tử thứ hai có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng, trong đó các phân tử thứ nhất và thứ hai này không phải là B7-H3.

Sáng chế còn đề cập tới phương án phân tử gắn kết-B7-H3 nêu trên, trong đó phân tử này có khả năng gắn kết đồng thời với B7-H3 và với epitop thứ hai, và cụ thể là đề cập tới phương án, trong đó epitop thứ hai này là epitop của phân tử thứ hai có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng (đặc biệt là, trong đó epitop thứ hai này là epitop của CD2, CD3, CD8, CD16, TCR, hoặc NKG2D, và đặc biệt nhất là, trong đó epitop thứ hai này là epitop của CD3). Sáng chế còn đề cập đến phương án của các phân tử gắn kết-B7-H3 nêu trên, trong đó các tế bào hiệu ứng là tế bào T gây độc tế bào hoặc tế bào giết tự nhiên (NK). Sáng chế còn đề cập đến phương án của các phân tử gắn kết-B7-H3 nêu trên, trong đó phân tử này còn có khả năng gắn kết epitop thứ ba, và cụ thể là đề cập tới phương án, trong đó epitop thứ ba là epitop của CD8. Sáng chế còn đề cập tới các phương án của các phân tử này, trong đó phân tử điều tiết sự gắn kết phối hợp của tế bào biểu hiện B7-H3 và tế bào T gây độc tế bào.

Sáng chế còn đề xuất các dược phẩm bao gồm lượng hữu hiệu của phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết-B7-H3 nêu trên và chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng.

Sáng chế còn đề cập tới việc sử dụng phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết-B7-H3 nêu trên trong điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh kèm theo hoặc đặc trưng bởi có biểu hiện của B7-H3, hoặc trong phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh đặc trưng bởi có biểu hiện của B7-H3, cụ thể là, trong đó bệnh hoặc tình trạng bệnh kèm theo hoặc đặc trưng bởi có biểu hiện của B7-H3 là bệnh ung thư, và cụ thể hơn là, trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm: khối u tuyến thượng thận, bệnh ung thư kèm theo-AIDS, sarcom phần mềm phế nang, khối u tế bào hình sao, bệnh ung thư tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư não và tủy sống, khối u não di căn, bệnh ung thư tế bào-B, bệnh ung thư vú, khối u thân động mạch cảnh, bệnh ung thư cổ tử cung, sarcom sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ nhuộm màu, caxinom tế bào trong, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư đại trực tràng, u mô bào sợi lành tính da, khối u tế bào tròn nhỏ

tạo sợi dính, u màng não thất, khối u Ewing, sarcom sụn dạng niêm dịch ngoài xương, xương bất thường tạo sụn, chứng loạn sản xơ hoá xương, bệnh ung thư túi mật hoặc ống mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh lá nuôi phôi thai kỳ, khối u tế bào mầm, bệnh ung thư đầu và cổ, caxinom tế bào gan, khối u tế bào đảo, bệnh sarcom Kaposi, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, khối u mỡ ác tính/sarcom mỡ, bệnh ung thư gan, u bạch huyết, bệnh ung thư phổi, u nguyên bào tủy, u melanin, u màng não, đa u tuyến nội tiết, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u nguyên bào thần kinh, các khối u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, caxinom tuyến giáp dạng nhú, khối u cận giáp, bệnh ung thư nhi khoa, khối u bao dây thần kinh ngoại vi, u tế bào ưa crôm, khối u tuyến yên, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u hắc tố màng bồ đào sau, bệnh ung thư thận di căn, khối u hình que, sarcom cơ vân, bệnh sarcom, bệnh ung thư da, bệnh sarcom mô mềm, bệnh ung thư tế bào vảy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh sarcom hoạt dịch, bệnh ung thư tinh hoàn, caxinom tuyến ức, u tuyến ức, bệnh ung thư di căn tuyến giáp, và bệnh ung thư tử cung.

Khía cạnh thứ hai của sáng chế là nhằm vào phân tử mà bao gồm miền gắn kết-B7-H3 của người của kháng thể kháng-B7-H3 của người được làm tương thích với người được tiếp hợp với ít nhất một nhóm dược chất ("B7-H3-ADC"). Sáng chế cũng đề cập tới các dược phẩm mà có chứa các B7-H3-ADC này, và tới các phương pháp bao gồm việc sử dụng phân tử bất kỳ trong số các B7-H3-ADC này trong điều trị bệnh ung thư và các bệnh và tình trạng bệnh khác.

Cụ thể là, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp dược chất kháng thể kháng-B7-H3 (B7-H3-ADC) có công thức:

$$Ab\text{-}(LM)_m\text{-}(D)_n,$$

trong đó:

Ab là kháng thể gắn kết với B7-H3 mà bao gồm miền chuỗi nặng thay đổi (VH) được làm tương thích với người và miền chuỗi nhẹ thay đổi (VL) được làm tương thích với người, hoặc là mảnh gắn kết-B7-H3 của nó, và;

D là nhóm dược chất gây độc tế bào;

LM là phân tử liên kết mà liên kết cộng hoá trị Ab và D;

m là số nguyên trong khoảng từ 0 đến n và chỉ số lượng các phân tử liên kết của B7-H3-ADC này;

và

n là số nguyên trong khoảng từ 1 đến 10 và chỉ số lượng các nhóm dược chất gây độc tế bào được liên kết cộng hoá trị với ADC này.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó phân tử liên kết LM là không có (có nghĩa là, m = 0), và các B7-H3-ADC có nhiều hơn một phân tử liên kết LM (có nghĩa là, m là số nguyên từ 2 đến n), lần lượt từng phân tử liên kết LM liên kết cộng hoá trị nhóm dược chất gây độc tế bào D với Ab của các B7-H3-ADC nêu trên. Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó Ab của phân tử này được liên kết cộng hoá trị với nhiều hơn một Phân tử liên kết LM, trong đó tất cả các Phân tử liên kết này là giống nhau. Các nhóm dược chất gây độc tế bào D mà được liên kết cộng hoá trị với Ab của các B7-H3-ADC nêu trên có thể đều giống nhau hoặc có thể bao gồm 2, 3, 4 hoặc nhiều nhóm dược chất gây độc tế bào không giống nhau D. Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó Ab của phân tử này được liên kết cộng hoá trị với nhiều hơn một phân tử liên kết LM, trong đó tất cả các phân tử liên kết này là khác nhau. Các nhóm dược chất gây độc tế bào D mà được liên kết cộng hoá trị với Ab của các B7-H3-ADC nêu trên có thể đều giống nhau hoặc có thể bao gồm 2, 3, 4 hoặc nhiều nhóm dược chất gây độc tế bào khác nhau D.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó:

(A) (i) miền VL được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:99, và

(ii) miền VH được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:104;

hoặc

(B) (i) miền VL được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20, và

(ii) miền VH được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21;

hoặc

(C) (i) miền VL được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30, và

(ii) miền VH được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó miền VL được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:99 và miền VH được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:104.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó miền VL được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20 và miền VH được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó miền VL được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30 và miền VH được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó Ab là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó B7-H3-ADC bao gồm miền Fc của IgG của người (đặc biệt là IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người).

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó B7-H3-ADC bao gồm miền Fc biến thể mà bao gồm:

(a) một hoặc nhiều cải biến axit amin làm giảm ái lực của miền Fc biến thể đối với FcγR; và/hoặc

(b) một hoặc nhiều cải biến axit amin làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của miền Fc biến thể.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên mà bao gồm miền Fc biến thể, trong đó các cải biến này làm giảm ái lực của miền Fc biến thể đối với FcγR bao gồm thay thế của L234A; L235A; hoặc L234A và L235A, trong đó cách đánh số là theo chỉ số EU trong tài liệu của Kabat.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên mà bao gồm miền Fc biến thể, trong đó các cải biến này làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của miền Fc biến thể, bao gồm thay thế của M252Y; M252Y và S254T; M252Y và T256E; M252Y, S254T và T256E; hoặc K288D và H435K, trong đó cách đánh số là theo chỉ số EU trong tài liệu của Kabat.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó ít nhất một trong số LM là phân tử liên kết, và cụ thể là trong đó phân tử liên kết LM là liên kết peptit và/hoặc liên kết có thể phân cắt.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó phân tử này có công thức:

$$Ab - [V\text{-}(W)_k\text{-}(X)_1\text{-}A] - D$$

trong đó:

V là phân tử liên kết LM có thể phân cắt,

$(W)_k$-$(X)_1$-A là hệ liên kết đệm tự loại bỏ, kéo dài mạch, mà tự loại bỏ thông qua quá trình loại bỏ-l,(4+2n),

mỗi W và X là liên kết đệm dòng thác điện tử l,(4+2n), mà giống nhau hoặc khác nhau,

A là nhóm đệm có công thức $(Y)_m$, trong đó Y là liên kết đệm dòng thác điện tử l,(4+2n), hoặc nhóm có công thức U, mà là liên kết đệm loại bỏ tạo vòng,

k, 1 và m độc lập là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 5 (được bao gồm)),

n là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 10 (được bao gồm),

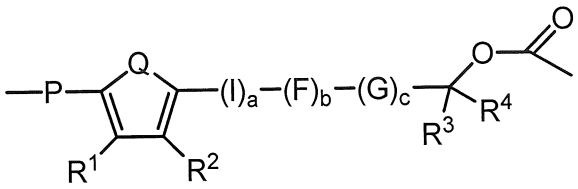
miễn là:

khi A là $(Y)_m$: thì $k+l+m \geq 1$, và

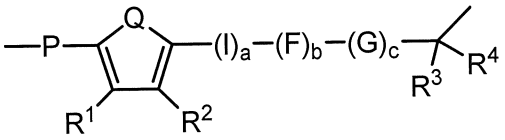
nếu $k+l+m=l$, thì $n>1$;

khi A là U: thì $k+1 \geq 1$.

W, X, và Y độc lập được chọn từ các hợp chất có công thức:



hoặc công thức:

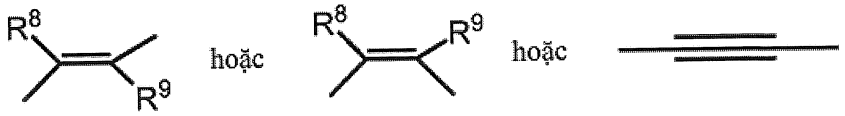


trong đó: Q là $-R^5C=CR^6-$, S, O, NR^5, $-R^5C=N-$, hoặc $-N=CR^5-$

P là NR^7, O hoặc S

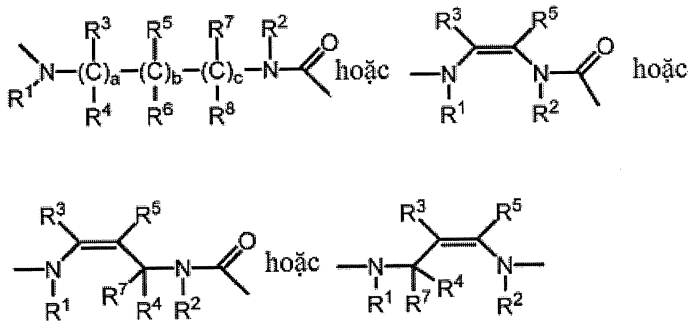
a, b, và c độc lập là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 5 (được bao gồm);

I, F và G độc lập được chọn từ các hợp chất có công thức:



trong đó R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, và R^9 độc lập là H, C_{1-6} alkyl, C_{3-20} heteroxyclyl, C_{5-20} aryl, C_{1-6} alkoxy, hydroxy (OH), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng, imidazolyl, C_{1-6} alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete (SR_x), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_x$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy ($S(=O)OH$), sulphinat ($S(=O)OR_x$), sulphinyl ($S(=O)R_x$), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 độc lập được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl, hai hoặc nhiều nhóm thế R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, hoặc R^9 tùy ý được liên kết với nhau để tạo thành một hoặc nhiều cấu trúc vòng béo hoặc thơm;

U được chọn từ các hợp chất có công thức:



trong đó:

a, b và c độc lập được chọn từ số nguyên là 0 hoặc 1; miễn là a + b + c = 2 hoặc 3;

R^1 và/hoặc R^2 độc lập là H, C1-6 alkyl, alkyl này tùy ý được thế bởi một hoặc nhiều nhóm sau đây: hydroxy (OH), ete (OR_x), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng, imidazolyl, C_{1-6}

alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete (SR_X), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_X$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy (S(=O)OH), sulphinat (S(=O)ORx), sulphinyl (S(=O)Rx), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl; và

R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 và R^8 độc lập là H, C_{1-6} alkyl, C_{3-20} heteroxyclyl, C_{5-20} aryl, C_{1-6} alkoxy, hydroxy (OH), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng, imidazolyl, C_{1-6} alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete (SR_x), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_x$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy (S(=O)OH), sulphinat ($S(=O)OR_x$), sulphinyl ($S(=O)R_x$), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl, và hai hoặc nhiều nhóm thế R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, hoặc R^8 tùy ý được liên kết với nhau để tạo thành một hoặc nhiều cấu trúc vòng béo hoặc thơm.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó phân tử liên kết LM bao gồm:

(1) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(2) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(3) p-ammoxinnamyloxycarbonyl;

(4) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(5) p-amino-benzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

(6) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

(7) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl;

(8) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

(9) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(10) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl;

(11) p-aminobenzyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino) carbonyl;

(12) p-aminoxinnamyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino) carbonyl;

(13) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl(metylamino) etyl(metylamino)carbonyl;

(14) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl (metylamino)etyl(metylamino)carbonyl;

(15) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl (metylamino)etyl(metylamino)-carbonyl;

(16) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl (metylamino)etyl(metylamino)carbonyl;

(17) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

(18) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl -p-aminobenzyl;

(19) p-aminoxinnamyl;

(20) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

(21) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

(22) p-amino-xinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

(23) p-aminophenylpentadienyl;

(24) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

(25) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

hoặc

(26) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminophenylpentadienyl.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó phân tử liên kết LM được tiếp hợp với mạch bên của axit amin của chuỗi polypeptit của Ab và gắn kết Ab với phân tử của nhóm dược chất gây độc tế bào D, và cụ thể là, trong đó nhóm dược chất gây độc tế bào D bao gồm độc tố tế bào, đồng vị phóng xạ, chất điều biến miễn dịch, xytokin, lymphokin, chemokin, yếu tố tăng trưởng, yếu tố hoại tử khối u, hormon, chất đối kháng hormon, enzym, oligonucleotit, ADN, ARN, siRNA, RNAi, microRNA, chất trị liệu quang hoạt, chất chống sinh mạch, chất gây chết tế bào theo chương trình, peptit, lipit, hydrat cacbon, chất càng cua, hoặc tổ hợp của chúng.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó phân tử liên kết LM được tiếp hợp với mạch bên của axit amin của chuỗi polypeptit của Ab và gắn kết Ab với phân tử của nhóm dược chất gây độc tế bào D, và cụ thể là, trong đó nhóm dược chất gây độc tế bào D bao gồm độc tố tế bào được chọn từ nhóm gồm tubulysin (đặc biệt là độc tố tế bào tubulysin được chọn từ nhóm gồm tubulysin A, tubulysin B, tubulysin C, và tubulysin D), auristatin (đặc biệt là độc tố tế bào auristatin được chọn từ nhóm gồm MMAE (N-metylvalin-valin-dolaisoleuxin-dolaproin-norephedrin) và MMAF (N-metylvalin-valin-dolaisoleuxin-dolaproin-phenylalanin), maytansinoid (đặc biệt là độc tố tế bào maytansinoid được chọn từ nhóm gồm Mytansin, DM1 và DM4), calicheamixin (đặc biệt là độc tố tế bào calicheamixin được chọn từ nhóm gồm calicheamixin γ1, calicheamixin β1Br, calicheamixin γ1Br, calicheamixin α2I, calicheamixin α3I, calicheamixin β1I, calicheamixin γ1I, và calicheamixin Δ1I),

pyrolobenzodiazepin (đặc biệt là độc tố tế bào pyrolobenzodiazepin được chọn từ nhóm gồm vadastuximab talirin, SJG-136, SG2000, SG2285 và SG2274), và duocarmyxin (đặc biệt là độc tố tế bào duocarmyxin và được chọn từ nhóm gồm duocarmyxin A, duocarmyxin B1, doucarmycin B2, duocarmyxin C1, duocarmyxin C2, duocarmyxin D, duocarmyxin SA, CC-1065, adozelesin, bizelesin, carzelesin (U-80244) và spiro-duocarmyxin (DUBA)).

Sáng chế còn đề xuất các dược phẩm bao gồm lượng hữu hiệu của B7-H3-ADC bất kỳ nêu trên và chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng.

Sáng chế còn đề cập tới việc sử dụng B7-H3-ADC bất kỳ nêu trên trong điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh kèm theo hoặc đặc trưng bởi biểu hiện của B7-H3, hoặc trong phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh đặc trưng bởi có biểu hiện của B7-H3, cụ thể là trong đó bệnh hoặc tình trạng bệnh kèm theo hoặc đặc trưng bởi biểu hiện của B7-H3 là bệnh ung thư, và cụ thể hơn là, trong đó bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm: bệnh bạch cầu tủy cấp, khối u tuyến thượng thận, bệnh ung thư kèm theo-AIDS, sarcom phần mềm phế nang, khối u tế bào hình sao, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư não và tủy sống, khối u não di căn, bệnh ung thư vú, khối u thân động mạch cảnh, bệnh ung thư cổ tử cung, sarcom sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ nhuộm màu, caxinom tế bào trong, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư đại trực tràng, u mô bào sợi lành tính da, khối u tế bào tròn nhỏ tạo sợi dính, u màng não thất, khối u Ewing, sarcom sụn dạng niêm dịch ngoài xương, xương bất thường tạo sụn, chứng loạn sản xơ hoá xương, bệnh ung thư túi mật hoặc ống mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh lá nuôi phôi thai kỳ, khối u tế bào mầm, bệnh ung thư đầu và cổ, caxinom tế bào gan, u nguyên bào đệm, khối u tế bào đảo, bệnh sarcom Kaposi, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu, khối u mỡ ác tính/sarcom mỡ, bệnh ung thư gan, u bạch huyết, bệnh ung thư phổi, u nguyên bào tủy, u melanin, u màng não, u trung biểu mô ác tính, đa u tuyến nội tiết, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u nguyên bào thần kinh, các khối u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư hầu, caxinom tuyến giáp dạng nhú, khối u cận giáp, bệnh ung thư nhi khoa, khối u bao dây thần kinh ngoại vi, u tế bào ưa crôm, khối u tuyến yên, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u hắc tố màng bồ đào sau, caxinom tế bào thận, bệnh ung thư thận di căn,

khối u hình que, sarcom cơ vân, bệnh sarcom, bệnh ung thư da, bệnh sarcom mô mềm, bệnh ung thư tế bào vảy, bệnh ung thư dạ dày, bệnh sarcom hoạt dịch, bệnh ung thư tinh hoàn, caxinom tuyến ức, u tuyến ức, bệnh ung thư di căn tuyến giáp, và bệnh ung thư tử cung.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là hình vẽ minh họa diabody được liên kết cộng hoá trị đại diện có hai vị trí gắn kết-epitop bao gồm hai chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi có miền thúc đẩy dị dime cuộn-E hoặc cuộn-K (các miền thúc đẩy-dị dime khác được đề xuất dưới đây). Gốc xystein có thể có mặt trong liên kết và/hoặc trong miền thúc đẩy-dị dime như thể hiện trên Fig. 3B. Các miền VL và VH mà nhận biết cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô màu hoặc tô đậm.

Fig. 2 là hình vẽ minh họa phân tử diabody được liên kết cộng hoá trị đại diện có hai vị trí gắn kết-epitop bao gồm hai chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi có miền CH2 và CH3, sao cho các chuỗi kết hợp tạo thành toàn bộ hoặc một phần của miền Fc. Các miền VL và VH mà nhận biết cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô màu hoặc tô đậm.

Fig. 3A-Fig. 3C là hình vẽ minh họa các diabody hoá trị bốn được liên kết cộng hoá trị đại diện có bốn vị trí gắn kết-epitop bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit (*nghĩa là*, tổng cộng bốn chuỗi polypeptit). Một polypeptit của mỗi cặp có miền CH2 và CH3, sao cho các chuỗi kết hợp tạo thành toàn bộ hoặc một phần của miền Fc. Các miền VL và VH mà nhận biết cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô màu hoặc tô đậm. Hai cặp chuỗi polypeptit có thể giống nhau. Theo các phương án này, trong đó hai cặp chuỗi polypeptit là giống nhau và các miền VL và VH nhận biết các epitop khác nhau (như thể hiện trên Fig. 3A-Fig. 3B), phân tử thu được có bốn vị trí gắn kết-epitop và là hai đặc hiệu và hoá trị hai đối với mỗi epitop được gắn kết. Theo các phương án này, trong đó các miền VL và VH nhận biết cùng một epitop (ví dụ, các CDR miền VL giống nhau và các CDR miền VH giống nhau được sử dụng trên cả hai chuỗi) phân tử thu được có bốn vị trí gắn kết-epitop và là đơn đặc hiệu và hoá trị bốn đối với một epitop đơn nhất. Theo cách khác, hai cặp polypeptit có thể khác nhau. Theo các phương án này, trong đó hai cặp chuỗi

polypeptit là khác nhau và các miền VL và VH của mỗi cặp polypeptit nhận biết các epitop khác nhau (như được thể hiện bằng cách tô màu đậm nhạt và kiểu tô khác nhau trên Fig. 3C), phân tử thu được có bốn vị trí gắn kết-epitop và bốn đặc hiệu và hoá trị một đối với mỗi epitop được gắn kết. Fig. 3A thể hiện diabody có chứa-miền Fc có chứa miền thúc đẩy-dị dime peptit bao gồm gốc xystein. Fig. 3B thể hiện diabody có chứa-miền Fc, kháng thể này có chứa các miền thúc đẩy-dị dime cuộn-E và cuộn-K bao gồm gốc xystein và liên kết (với gốc xystein tùy ý). Fig. 3C thể hiện diabody có chứa-vùng Fc, kháng thể này có chứa các miền CH1 và CL của kháng thể.

Fig. 4A và Fig. 4B minh họa phân tử diabody được liên kết cộng hoá trị đại diện có hai vị trí gắn kết-epitop bao gồm ba chuỗi polypeptit. Hai trong số các chuỗi polypeptit có một miền CH2 và CH3, sao cho các chuỗi kết hợp tạo thành toàn bộ hoặc một phần của miền Fc. Các chuỗi polypeptit bao gồm miền VL và VH còn bao gồm miền thúc đẩy-dị dime. Các miền VL và VH mà nhận biết cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô màu hoặc tô đậm.

Fig. 5 minh họa phân tử diabody được liên kết cộng hoá trị đại diện có bốn vị trí gắn kết-epitop bao gồm năm chuỗi polypeptit. Hai trong số các chuỗi polypeptit có một miền CH2 và CH3, sao cho các chuỗi kết hợp tạo thành miền Fc mà bao gồm toàn bộ hoặc một phần của miền Fc. Các chuỗi polypeptit bao gồm các miền VL và VH được liên kết còn bao gồm miền thúc đẩy-dị dime. Các miền VL và VH mà nhận biết cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô màu hoặc tô đậm.

Fig. 6A-Fig. 6F minh họa các phân tử gắn kết hoá trị ba có chứa-miền Fc đại diện có ba vị trí gắn kết-epitop. Fig. 6A và Fig. 6B, tương ứng minh họa các miền của các phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm hai miền gắn kết kiểu-diabody và miền gắn kết kiểu-Fab có các hướng miền khác nhau, trong đó các miền gắn kết kiểu-diabody là đầu tận cùng-N hoặc đầu tận cùng-C đối với miền Fc. Các phân tử trên Fig. 6A và Fig. 6B bao gồm bốn chuỗi. Fig. 6C và Fig. 6D, tương ứng minh họa các miền của các phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm hai miền gắn kết kiểu-diabody đầu tận cùng-N đối với miền Fc, và miền gắn kết kiểu-Fab, trong đó chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được liên kết thông qua vùng đệm polypeptit, hoặc miền gắn kết kiểu-scFv. Các phân tử gắn kết hoá trị ba trên Fig. 6E và Fig. 6F, tương ứng minh họa các miền của

các phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm hai miền gắn kết kiểu-diabody đầu tận cùng-C đối với miền Fc, và miền gắn kết kiểu-Fab trong đó chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được liên kết thông qua vùng đệm polypeptit, hoặc miền gắn kết kiểu-scFv. Các phân tử gắn kết hoá trị ba trên Fig. 6C-Fig. 6F bao gồm 3 chuỗi. Các miền VL và VH mà nhận biết cùng một epitop được thể hiện bằng cách sử dụng cùng kiểu tô màu hoặc tô đậm.

Fig. 7 thể hiện kết quả sàng lọc các kháng thể kháng-B7-H3 có khả năng nhập nội bào tế bào ung thư tụy Hs700T.

Fig. 8A-Fig. 8J thể hiện kết quả nghiên cứu khả năng của B7-H3-ADC của sáng chế điều tiết độc tính tế bào *in vitro* chống lại các tế bào ung thư vú JIMT-1 biểu hiện B7-H3 (Fig. 8A), các tế bào ung thư vú MDA-MB-468 (Fig. 8B), các tế bào u melanin A375.52 (Fig. 8C), các tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ Calu-6 (Fig. 8D), các tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ NCI-H1703 (Fig. 8E), các tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ NCI-H1975 (Fig. 8F), các tế bào ung thư buồng trứng PA-1 (Fig. 8G), các tế bào ung thư tụy Hs700T (Fig. 8H), các tế bào ung thư tuyến tiền liệt DU145 (Fig. 8I), và các tế bào u lympho tế bào Raji B âm tính B7-H3 (Fig. 8J).

Fig. 9 thể hiện kết quả nghiên cứu khả năng của B7-H3-ADC của sáng chế điều tiết độc tính tế bào *in vivo* chống lại các tế bào khối u ung thư vú MDA-MB-468 được cấy vào mô đệm mỡ ở vú trên mô hình chuột trụi CD1. Đường đồ thị phát triển khối u được thể hiện đối với chuột được điều trị tiêm trong màng bụng 10 mg/kg chmAb-B-vc-MMAE, chmAb-C-vc-MMAE, và chmAb-D-vc-MMAE hoặc chỉ tiêm chất dẫn vào ngày 25 (được chỉ ra bằng mũi tên).

Fig. 10A-Fig. 10C thể hiện kết quả nghiên cứu khả năng của B7-H3-ADC của sáng chế điều tiết độc tính tế bào *in vivo* chống lại các tế bào khối u ung thư phổi không tế bào nhỏ NCI-H1703 được cấy dưới da trên mô hình chuột trụi CD1. Đường đồ thị phát triển khối u được thể hiện đối với chuột được điều trị tiêm trong màng bụng 10 mg/kg (Fig. 10A), 3 mg/kg (Fig. 10B), 1 mg/kg (Fig. 10C) chmAb-B-vc-MMAE, chmAb-C-vc-MMAE, và chmAb-D-vc-MMAE ở 10 mg/kg hoặc chỉ tiêm chất dẫn vào ngày 52 (được chỉ ra bằng mũi tên).

Fig. 11A-Fig. 11C thể hiện các kết quả nghiên cứu khả năng của B7-H3-ADC của sáng chế điều tiết độc tính tế bào *in vivo* chống lại các tế bào khối u ung thư buồng trứng PA-1 được cấy dưới da trên mô hình chuột trụi CD1. Đường đồ thị phát triển khối u được thể hiện đối với chuột được điều trị tiêm trong màng bụng 10 mg/kg (Fig. 11A), 3 mg/kg (Fig. 11B), 1 mg/kg (Fig. 5C) chmAb-B-vc-MMAE, chmAb-C-vc-MMAE, và chmAb-D-vc-MMAE ở 10 mg/kg hoặc chỉ tiêm chất dẫn vào ngày 42 (được chỉ ra bằng mũi tên).

Fig. 12A-Fig. 12C thể hiện các kết quả nghiên cứu khả năng của B7-H3-ADC của sáng chế điều tiết độc tính tế bào *in vivo* chống lại các tế bào khối u ung thư phổi không tế bào nhỏ Calu-6 được cấy dưới da trên mô hình chuột trụi CD1. Đường đồ thị phát triển khối u được thể hiện đối với chuột được điều trị tiêm trong màng bụng 10 mg/kg (Fig. 12A), 3 mg/kg (Fig. 12B), 1 mg/kg (Fig. 12C) chmAb-B-vc-MMAE, chmAb-C-vc-MMAE, và chmAb-D-vc-MMAE ở 10 mg/kg hoặc chỉ tiêm chất dẫn vào ngày 20 (được chỉ ra bằng mũi tên).

Fig. 13A-Fig. 13C thể hiện các kết quả nghiên cứu khả năng của B-H3-ADC của sáng chế điều tiết độc tính tế bào *in vivo* chống lại tế bào u melanin A375.S2 được cấy dưới da trên mô hình chuột trụi CD1. Đường đồ thị phát triển khối u được thể hiện đối với chuột được điều trị tiêm trong màng bụng 10 mg/kg (Fig. 13A), 3 mg/kg (Fig. 13B), 1 mg/kg (Fig. 13C) chmAb-B-vc-MMAE, chmAb-C-vc-MMAE, và chmAb-D-vc-MMAE ở 10 mg/kg hoặc chỉ tiêm chất dẫn vào ngày 30 (được chỉ ra bằng mũi tên).

Fig. 14A-Fig. 14C thể hiện các kết quả nghiên cứu độ ổn định dược động học của các phân tử B7-H3-ADC. Các đường đồ thị nồng độ kháng thể trong huyết thanh được thể hiện đối với kháng thể toàn phần (ký hiệu hình tròn) và B7-H3-ADC nguyên vẹn (ký hiệu hình vuông) thu được từ chmAb-B (Fig. 14A), chmAb-C (Fig. 14B), và chmAb-D (Fig. 14C).

Fig. 15A-Fig. 15C thể hiện khả năng giữ được hoạt tính sinh học của hmAb-C B7-H3-ADC khi có nhóm duocarmyxin ví dụ (DUBA) được liên kết với gốc axit amin của phần Ab của nó thông qua liên kết có thể phân cắt ("hmAb-C-DUBA"). Fig. 15A, các tế bào Calu-6; Fig. 15B, các tế bào NCI-H1703; Fig. 15C, các tế bào

Hs700T. Phân tử đối chứng gắn kết CD20 và được tiếp hợp với DUBA ("Ctrl-DUBA").

Fig. 16 thể hiện kết quả nghiên cứu *in vivo* hiệu lực của hmAb-C-DUBA đối với các tế bào caxinom phổi không tế bào nhỏ Calu-6. hmAb-C-DUBA được dùng cho các nhóm chuột (n=5) mà đã được chủng nhiễm dưới da các tế bào caxinom phổi không tế bào nhỏ Calu-6. Tiêm trong màng bụng hmAb-C-DUBA (1 mg/kg x 3, 3 mg/kg x 3, hoặc 6 mg/kg x 3) cho chuột vào ngày 24, 31, 38 và 45 (được chỉ ra bằng các mũi tên) sau khi chủng nhiễm, và đánh giá thể tích khối u ở các con chuột này cho đến 62 ngày.

Fig. 17 thể hiện kết quả nghiên cứu *in vivo* hiệu lực của hmAb-C-DUBA đối với các tế bào caxinom phổi không tế bào nhỏ Calu-6. hmAb-C-DUBA được dùng cho các nhóm chuột (n=7) mà đã được chủng nhiễm dưới da các tế bào caxinom phổi không tế bào nhỏ Calu-6. Cho các con chuột dùng hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (3 mg/kg hoặc 10 mg/kg) vào ngày 20 (được chỉ ra bằng mũi tên) sau khi chủng nhiễm, và đánh giá thể tích khối u ở các con chuột này cho đến 55 ngày.

Fig. 18 thể hiện kết quả nghiên cứu *in vivo* hiệu lực của hmAb-C-DUBA đối với các tế bào caxinom buồng trứng PA-1. hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA được dùng cho các nhóm chuột (n=6) mà đã được chủng nhiễm dưới da các tế bào caxinom buồng trứng PA-1. Cho chuột dùng một liều hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (3 mg/kg, 6 mg/kg hoặc 10 mg/kg) vào ngày 25 (được chỉ ra bằng mũi tên) sau khi chủng nhiễm, và đánh giá thể tích khối u ở các con chuột này cho đến 60 ngày.

Fig. 19 thể hiện kết quả nghiên cứu *in vivo* hiệu lực của hmAb-C-DUBA đối với các tế bào u melanin A375.S2. hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA được dùng cho các nhóm chuột (n=7) mà đã được chủng nhiễm dưới da các tế bào u melanin A375.S2. Cho các con chuột này dùng một liều hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (1 mg/kg hoặc 3 mg/kg) vào ngày 25 (được chỉ ra bằng mũi tên) sau khi chủng nhiễm, và đánh giá thể tích khối u ở các con chuột này cho đến 60 ngày.

Fig. 20A-Fig. 20D thể hiện kết quả nghiên cứu *in vivo* hiệu lực của hmAb-C-DUBA đối với mảnh ghép khác loài mô đệm mỡ của tế bào caxinom vú MDA-MB468. hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA được dùng trong màng bụng cho các

nhóm chuột vào ngày 70, 74 và 78 sau khi được chủng nhiễm tế bào caxinom vú MDA-MB468 trong mô đệm mỡ vú. Cho dùng một liều hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (liều duy nhất 3 mg/kg hoặc 6 mg/kg) vào ngày 70 hoặc ba liều 3 mg/kg vào ngày 70, 74 và 78 (được chỉ ra bằng các mũi tên) sau khi chủng nhiễm, và đánh giá thể tích khối u ở các con chuột này cho đến 110 ngày. Fig. 20A thể hiện kết quả đối với chất dẫn, hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA với liều 6 mg/kg (liều duy nhất). Fig. 20B thể hiện kết quả đối với chất dẫn, hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA với liều 3 mg/kg (liều duy nhất). Fig. 20C thể hiện kết quả đối với chất dẫn, hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA với liều 3 mg/kg (ba liều). Fig. 20D thể hiện tất cả các kết quả trên duy nhất một đồ thị.

Fig. 21A-Fig. 21D thể hiện kết quả nghiên cứu *in vivo* hiệu lực của hmAb-C-DUBA đối với mảnh ghép khác loài được cấy dưới da của các tế bào caxinom buồng trứng PA-1. hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA được dùng trong màng bụng (liều duy nhất 3 mg/kg, 6 mg/kg hoặc 10 mg/kg) vào ngày 24 sau khi chủng nhiễm, hoặc hai liều dùng 10 mg/kg hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (vào ngày 24 và 28 sau khi chủng nhiễm) hoặc bốn liều 6 mg/kg hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (vào ngày 24, 28, 31 và 35 sau khi chủng nhiễm). Đánh giá thể tích khối u ở các con chuột này cho đến 70 ngày. Fig. 21A thể hiện kết quả đối với chất dẫn, 10 mg/kg hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (liều duy nhất hoặc liều chia đôi). Fig. 21B thể hiện kết quả đối với chất dẫn, hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA ở liều 6 mg/kg (liều duy nhất hoặc liều chia bốn). Fig. 21C thể hiện kết quả đối với chất dẫn, hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA ở liều 3 mg/kg (các liều duy nhất). Fig. 21D thể hiện tất cả các kết quả trên duy nhất một đồ thị.

Fig. 22 thể hiện dược động học khi dùng chmAb-C-DUBA ở chuột. Hình này thể hiện IgG của người toàn phần và ADC nguyên vẹn của chmAb-C-DUBA ở liều 3 mg/kg (n=3).

Fig. 23A-Fig. 23B thể hiện dược động học khi dùng hmAb-C-DUBA ở khỉ cynomolgus. Hình này thể hiện IgG của người toàn phần (Fig. 23A) và ADC nguyên vẹn (Fig. 23B) của hmAb-C-DUBA ở liều 1 mg/kg (1 con đực; 1 con cái), 3 mg/kg

(1 con đực; 1 con cái), 10 mg/kg (1 con đực; 1 con cái) hoặc 27 mg/kg (2 con đực; 2 con cái).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các phân tử gắn kết-B7-H3 mới có khả năng gắn kết với B7-H3 của người và không phải của người, và cụ thể là tới các phân tử này mà có tính phản ứng chéo với B7-H3 của động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ, khỉ cynomolgus). Sáng chế còn đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm các miền chuỗi nhẹ thay đổi và/hoặc chuỗi nặng thay đổi (VH) đã được làm tương thích với người và/hoặc được khử miễn dịch sao cho thể hiện tính gây miễn dịch giảm đi khi sử dụng cho các đối tượng tiếp nhận. Cụ thể, sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 hai đặc hiệu, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu, bao gồm các diabody hai đặc hiệu, các BiTE, các kháng thể hai đặc hiệu, các phân tử gắn kết hoá trị ba, *v.v.* bao gồm: (i) các miền thay đổi gắn kết-B7-H3 này và (ii) miền có khả năng gắn kết với epitop của phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng. Sáng chế cũng đề cập tới các dược phẩm mà có chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết-B7-H3, và tới các phương pháp bao gồm việc sử dụng phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết-B7-H3 này trong điều trị bệnh ung thư và các bệnh và tình trạng bệnh khác. Cụ thể, sáng chế cũng đề cập tới phân tử bao gồm miền gắn kết-B7-H3 của người của kháng thể kháng-B7-H3 của người được làm tương thích với người được tiếp hợp với ít nhất một nhóm dược chất ("B7-H3-ADC"). Sáng chế cũng đề cập tới các dược phẩm mà có chứa các B7-H3-ADC này, và tới các phương pháp bao gồm việc sử dụng phân tử bất kỳ trong số các B7-H3-ADC này trong điều trị bệnh ung thư và các bệnh và tình trạng bệnh khác.

Sáng chế cũng đề cập tới phân tử mà bao gồm miền gắn kết-B7-H3 của người của kháng thể kháng-B7-H3 của người được làm tương thích với người được tiếp hợp với ít nhất một nhóm dược chất ("B7-H3-ADC"). Sáng chế cũng đề cập tới các dược phẩm mà có chứa các B7-H3-ADC này, và tới các phương pháp bao gồm việc sử dụng phân tử bất kỳ trong số các B7-H3-ADC này trong điều trị bệnh ung thư và các bệnh và tình trạng bệnh khác.

Các phân tử B7-H3-ADC của sáng chế có công thức:

$$Ab\text{-}(LM)_m\text{-}(D)_n,$$

trong đó:

Ab là kháng thể gắn kết với B7-H3 mà bao gồm miền chuỗi nặng thay đổi (VH) được làm tương thích với người và miền chuỗi nhẹ thay đổi (VL) được làm tương thích với người, hoặc là mảnh gắn kết-B7-H3 của nó, và;

D là nhóm dược chất gây độc tế bào;

LM là liên kết hoặc phân tử liên kết mà liên kết cộng hoá trị Ab và D;

m là số nguyên trong khoảng từ 0 đến n và chỉ số lượng các phân tử liên kết của B7-H3-ADC;

và

n là số nguyên trong khoảng từ 1 đến 10 và chỉ số lượng các nhóm dược chất gây độc tế bào được liên kết cộng hoá trị với phân tử B7-H3-ADC.

I. Các kháng thể và các miền gắn kết của chúng

Các kháng thể của sáng chế là các phân tử globulin miễn dịch có khả năng gắn kết đặc hiệu với đích, như hydrat cacbon, polynucleotit, lipit, polypeptit, *v.v.*, thông qua ít nhất 1 vị trí nhận biết kháng nguyên, nằm ở miền thay đổi của phân tử globulin miễn dịch. Do đó, các phân tử B7-H3-ADC của sáng chế bao gồm kháng thể gắn kết với B7-H3 hoặc mảnh gắn kết-B7-H3 của nó. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "kháng thể" và "các kháng thể" chỉ các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa đặc hiệu, các kháng thể của người, các kháng thể được làm tương thích với người, các kháng thể tổng hợp, các kháng thể khảm, các kháng thể đa dòng, các kháng thể lạc đà hoá, Fvs chuỗi đơn (scFv), các kháng thể chuỗi đơn, các mảnh Fab, các mảnh F(ab'), Fvs hai đặc hiệu được liên kết-disulfua (sdFv), kháng thể nội bào, và các mảnh gắn kết-epitop của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Cụ thể là, thuật ngữ "kháng thể" bao gồm các phân tử globulin miễn dịch và các mảnh có hoạt tính miễn dịch của các phân tử globulin miễn dịch, *nghĩa là,* các phân tử có chứa vị trí gắn kết-epitop. Các phân tử globulin miễn dịch có thể thuộc loại bất kỳ

(ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), lớp (ví dụ, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 và IgA_2) hoặc phân lớp bất kỳ. Các kháng thể có khả năng "gắn kết đặc hiệu miễn dịch" với polypeptit hoặc protein hoặc phân tử không phải protein (hoặc gắn kết với phân tử này theo "cách đặc hiệu miễn dịch") do có mặt trên phân tử này một miền hoặc gốc hoặc hình dạng cụ thể ("epitop"). Phân tử có chứa-epitop có thể có hoạt tính gây miễn dịch, sao cho phân tử này kích thích đáp ứng sản sinh kháng thể ở động vật; các phân tử này được gọi là "các kháng nguyên". Vài thập kỷ qua đã chứng kiến sự hồi sinh mối quan tâm đến tiềm năng trị liệu của các kháng thể, và các kháng thể trở thành một trong các nhóm thuốc thu được từ-công nghệ sinh học hàng đầu ("*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*," Singapore Med. J. 50(7):663-666, của Chan, C.E. *et al.* (2009)). Trên 200 thuốc dựa trên-kháng thể đã được cấp phép lưu hành hoặc đang trong giai đoạn nghiên cứu.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể, diabody hoặc phân tử gắn kết-epitop khác được cho là gắn kết "theo cách đặc hiệu miễn dịch" với vùng của một phân tử khác (*nghĩa là,* epitop) nếu phân tử này phản ứng hoặc kết hợp thường xuyên hơn, nhanh hơn, kéo dài hơn và/hoặc ái lực lớn hơn với epitop đó so với các epitop khác. Ví dụ, kháng thể gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của virut là kháng thể mà gắn kết epitop của virut với ái lực lớn hơn, tổng ái lực lớn hơn, dễ dàng hơn, và/hoặc kéo dài hơn so với khi nó gắn kết đặc hiệu miễn dịch với các epitop khác của virut hoặc các epitop không phải của virut. Cũng nên hiểu là, theo định nghĩa này, ví dụ, kháng thể (hoặc gốc hoặc epitop) mà gắn kết đặc hiệu miễn dịch với đích thứ nhất có thể hoặc không thể gắn kết đặc hiệu hoặc gắn kết ưu tiên với đích thứ hai. Do đó, "gắn kết đặc hiệu miễn dịch" không nhất thiết đòi hỏi (mặc dù có thể bao gồm) gắn kết độc quyền. Nói chung, nhưng không nhất thiết, dẫn chiếu đến gắn kết nghĩa là gắn kết "đặc hiệu miễn dịch". Hai phân tử được cho là có khả năng gắn kết với nhau theo cách "đặc hiệu sinh lý", nếu việc gắn kết này thể hiện tính đặc hiệu với các thụ thể mà gắn kết với phối tử tương ứng của chúng.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" chỉ một quần thể kháng thể đồng nhất, trong đó kháng thể đơn dòng bao gồm các axit amin (có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên) mà tham gia vào gắn kết chọn lọc của kháng nguyên. Các kháng thể đơn dòng là rất đặc hiệu, nhằm kháng lại một epitop duy nhất (hoặc vị trí kháng nguyên).

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" không chỉ bao gồm các kháng thể đơn dòng nguyên vẹn và các kháng thể đơn dòng có độ dài đầy đủ, mà còn bao gồm các mảnh của chúng (như Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, v.v.), các phân tử gắn kết chuỗi đơn (scFv), các thể đột biến của chúng, các protein dung hợp bao gồm một đoạn kháng thể, các kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người, các kháng thể đơn dòng khảm, và cấu hình được cải biến bất kỳ khác của phân tử globulin miễn dịch này mà bao gồm vị trí nhận biết kháng nguyên có tính đặc hiệu cần thiết và khả năng gắn kết kháng nguyên. Không nhằm giới hạn đối với nguồn gốc kháng thể hoặc cách thức theo đó kháng thể này được điều chế (ví dụ, bằng tế bào lai, chọn lọc thể thực khuẩn, biểu hiện tái tổ hợp, động vật chuyển gen, *v.v.*). Thuật ngữ này bao gồm các globulin miễn dịch toàn vẹn cũng như các mảnh *v.v.* nêu trên trong định nghĩa về "kháng thể". Các phương pháp điều chế các kháng thể đơn dòng là đã biết trong lĩnh vực này. Một phương pháp mà có thể được sử dụng là phương pháp của Kohler, G. *et al.* (1975) trong tài liệu "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*," Nature 256:495-497 hoặc phương pháp cải biến của nó. Thông thường, các kháng thể đơn dòng được phát triển ở chuột nhắt, chuột cống hoặc thỏ. Các kháng thể được sản xuất bằng cách gây miễn dịch một động vật bằng một lượng gây miễn dịch của các tế bào, dịch chiết tế bào hoặc các chế phẩm protein mà có chứa epitop mong muốn. Chất gây miễn dịch có thể là, nhưng không giới hạn ở, các tế bào cấp một, các dòng tế bào nuôi cấy, các tế bào ung thư, các protein, các peptit, các axit nucleic, hoặc mô. Các tế bào được sử dụng để gây miễn dịch có thể được nuôi cấy trong một thời gian (ví dụ, ít nhất là 24 giờ) trước khi sử dụng chúng làm chất gây miễn dịch. Các tế bào có thể được sử dụng luôn làm chính các chất gây miễn dịch hoặc kết hợp với chất phụ trợ không làm biến tính, như Ribi (xem, ví dụ, "*Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production*," ILAR J. 37(3):119-125, của Jennings, V.M. (1995)). Nói chung, các tế bào nên được giữ nguyên vẹn và tốt hơn là còn sống khi được sử dụng làm các chất gây miễn dịch. Các tế bào nguyên vẹn có thể cho phép động vật được gây miễn dịch phát hiện các kháng nguyên tốt hơn là các tế bào bị phá vỡ. Sử dụng các chất phụ trợ làm biến tính hoặc mạnh, ví dụ, chất phụ trợ Freud, có thể phá vỡ các tế bào và do đó không khuyến khích. Chất gây miễn dịch có thể được sử dụng nhiều lần cách quãng chu kỳ, như hai lần/tuần, hoặc một lần/tuần, hoặc có thể được sử dụng theo cách sao cho duy trì khả năng sống còn ở động vật

này (ví dụ, tái tổ hợp mô). Theo cách khác, các kháng thể đơn dòng hiện có và các kháng thể tương đương khác bất kỳ mà đặc hiệu miễn dịch đối với epitop của mầm bệnh mong muốn có thể được xác định trình tự và sản xuất theo cách tái tổ hợp bằng cách bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án, kháng thể này được xác định trình tự và trình tự polynucleotit tiếp đó được tách dòng vào vectơ để biểu hiện hoặc nhân truyền. Trình tự mã hoá kháng thể quan tâm có thể được duy trì trong một vectơ ở tế bào vật chủ và tế bào vật chủ này tiếp đó có thể được nhân rộng và làm đông lạnh để sử dụng trong tương lai. Trình tự polynucleotit của các kháng thể này có thể được sử dụng để xử lý di truyền để tạo ra các phân tử đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu của sáng chế (ví dụ, hai đặc hiệu, ba đặc hiệu và bốn đặc hiệu) cũng như ái lực được tối ưu hoá, kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người, và/hoặc được làm tương thích với giống chó, để cải thiện ái lực, hoặc các đặc tính khác của kháng thể này. Nguyên tắc chung để kháng thể được làm tương thích với người bao gồm giữ lại trình tự cơ bản của đoạn gắn kết-kháng nguyên của kháng thể này, đồng thời hoán đổi phần còn lại không phải của người của kháng thể với các trình tự kháng thể của người.

Các kháng thể tự nhiên (như các kháng thể IgG) gồm có hai "chuỗi nhẹ" được tạo phức với hai "chuỗi nặng". Mỗi chuỗi nhẹ có chứa miền thay đổi ("VL") và miền ổn định ("CL"). Mỗi chuỗi nặng có chứa miền thay đổi (VH), ba miền ổn định ("CH1", "CH2" và "CH3"), và vùng "bản lề" ("H") nằm giữa các miền CH1 và CH2. Do đó, đơn vị cấu trúc cơ bản của các globulin miễn dịch có trong tự nhiên (ví dụ, IgG) là tetrame có hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, thường được biểu hiện dưới dạng glycoprotein khoảng 150.000 Da. Đoạn đầu tận cùng-amino ("đầu tận cùng-N") của mỗi chuỗi bao gồm miền thay đổi khoảng từ 100 đến 110 hoặc nhiều axit amin chủ yếu có vài trò nhận biết kháng nguyên. Đoạn đầu tận cùng-carboxy ("đầu tận cùng-C") của mỗi chuỗi xác định vùng ổn định, với các chuỗi nhẹ có một miền ổn định duy nhất và các chuỗi nặng thường có ba miền ổn định và miền bản lề. Do đó, cấu trúc của các chuỗi nhẹ của phân tử IgG là n-VL-CL-c và cấu trúc các chuỗi nặng của IgG là n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (trong đó n và c tương ứng biểu thị đầu tận cùng-N và đầu tận cùng-C của polypeptit này).

A. Đặc tính của các miền thay đổi kháng thể

Các miền thay đổi của phân tử IgG gồm có các vùng xác định tính bổ trợ ("CDR"), mà có chứa các gốc tiếp xúc với epitop, và các đoạn không phải-CDR, được gọi là các đoạn khung ("FR"), đoạn này nói chung duy trì cấu trúc và xác định vị trí của các quai CDR sao cho cho phép sự tiếp xúc này (mặc dù một số gốc khung nhất định cũng có thể tiếp xúc kháng nguyên). Do đó, các miền VL và VH có cấu trúc n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c. Các polypeptit mà là (hoặc có thể có vai trò như) CDR thứ nhất, thứ hai và thứ ba của chuỗi nhẹ kháng thể trong bản mô tả này được gọi tương ứng là miền CDR_L1, miền CDR_L2, và miền CDR_L3. Tương tự, các polypeptit mà là (hoặc có thể có vai trò như) CDR thứ nhất, thứ hai và thứ ba của chuỗi nặng kháng thể trong bản mô tả này được gọi tương ứng là miền CDR_H1, miền CDR_H2, và miền CDR_H3. Do đó, các thuật ngữ miền CDR_L1, miền CDR_L2, miền CDR_L3, miền CDR_H1, miền CDR_H2, và miền CDR_H3 là đề cập đến các polypeptit mà khi kết hợp vào protein làm cho protein có khả năng gắn kết với epitop đặc hiệu bất kể cho dù protein này là kháng thể có các chuỗi nhẹ và nặng hoặc là diabody hoặc phân tử gắn kết chuỗi đơn (ví dụ, scFv, BiTe, *v.v.*), hoặc một loại protein khác. Do đó, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "mảnh gắn kết-epitop" nghĩa là mảnh phân tử có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop. Mảnh gắn kết-epitop có thể có chứa 1, 2, 3, 4, hoặc 5 miền CDR của kháng thể hoặc có thể có chứa toàn bộ 6 miền CDR của kháng thể và, mặc dù có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop này, có thể thể hiện tính đặc hiệu miễn dịch, ái lực hoặc tính chọn lọc đối với epitop này sao cho khác biệt với đặc tính đó của kháng thể này. Tuy nhiên, ưu tiên mảnh gắn kết-epitop sẽ có chứa toàn bộ 6 miền CDR của kháng thể này. Mảnh gắn kết-epitop của kháng thể có thể là chuỗi polypeptit đơn (ví dụ, scFv), hoặc có thể bao gồm hai hoặc nhiều chuỗi polypeptit, mỗi chuỗi có đầu tận cùng amino và đầu tận cùng carboxy (ví dụ, diabody, mảnh Fab, mảnh Fab_2, *v.v.*). Trừ khi có lưu ý cụ thể khác, thứ tự các miền của các phân tử protein được mô tả ở đây là theo hướng từ "đầu tận cùng-N đến đầu tận cùng-C".

Cụ thể, sáng chế bao gồm các mảnh miền thay đổi chuỗi đơn ("scFv") bao gồm miền VH hoặc VL kháng-B7-H3 được làm thương thích với người của sáng chế và các phân tử gắn kết đa đặc hiệu bao gồm mảnh này. Các mảnh miền thay đổi chuỗi

đơn bao gồm các miền VL và VH được liên kết với nhau bằng cách sử dụng peptit "Liên kết" ngắn. Các liên kết có thể được cải biến cho chức năng bổ sung, như gắn dược chất hoặc gắn với chất nền rắn. Các biến thể chuỗi đơn có thể được sản xuất bằng cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp. Để sản xuất tổng hợp scFv, có thể sử dụng thiết bị tổng hợp tự động. Để sản xuất tái tổ hợp scFv, plasmit thích hợp có chứa polynucleotit mà mã hoá scFv có thể được đưa vào tế bào vật chủ thích hợp, các tế bào có nhân điển hình, như các tế bào nấm men, thực vật, côn trùng hoặc động vật có vú, hoặc các tế bào không có nhân điển hình, như E. coli. Các polynucleotit mã hoá scFv quan tâm có thể được điều chế bằng cách xử lý thông thường như nối các polynucleotit. scFv thu được có thể được phân tách bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein chuẩn đã biết trong lĩnh vực này.

Cụ thể, sáng chế còn bao gồm CDR_H1, CDR_H2, CDR_H3, CDR_L1, CDR_L2, CDR_L3, hoặc miền VL và/hoặc miền VH của các biến thể được làm tương thích với người của các kháng thể B7-H3 của sáng chế, cũng như các phân tử gắn kết-đa đặc hiệu chứa chúng. Thuật ngữ kháng thể "được làm tương thích với người" chỉ phân tử khảm, nói chung được điều chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, có vị trí gắn kết-epitop của globulin miễn dịch từ loài không phải là người và cấu trúc globulin miễn dịch còn lại của phân tử này dựa trên cấu trúc và/hoặc trình tự globulin miễn dịch của người. Các kháng thể kháng-B7-H3 của sáng chế cụ thể bao gồm các biến thể được làm tương thích với người, khảm hoặc được làm tương thích với chó của các kháng thể mAb-A, mAb-B, mAb-C hoặc mAb-D. Trình tự polynucleotit của các miền thay đổi của các kháng thể này có thể được sử dụng để xử lý di truyền nhằm tạo ra các dẫn xuất này và nhằm cải thiện ái lực, hoặc các đặc tính khác của các kháng thể này. Nguyên tắc chung để kháng thể được làm tương thích với người bao gồm giữ lại trình tự cơ bản của đoạn gắn kết-epitop của kháng thể này, đồng thời hoán đổi phần còn lại không phải của người của kháng thể này với các trình tự kháng thể của người. Có 4 bước nói chung để kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người. Đó là: (1) xác định trình tự nucleotit và trình tự axit amin đã dự đoán của các miền thay đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể ban đầu (2) thiết kế kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể được làm tương thích với chó, *nghĩa là,* xác định vùng khung của kháng thể sẽ sử dụng trong quá trình làm tương thích với

người hoặc làm tương thích với chó (3) các kỹ thuật/công nghệ làm tương thích với người hoặc làm tương thích với chó trên thực tế và (4) chuyển nhiễm và biểu hiện kháng thể được làm tương thích với người. Xem, ví dụ các Patent Mỹ số 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; và 6,331,415.

Vị trí gắn kết-epitop có thể bao gồm miền thay đổi toàn vẹn được dung hợp với miền ổn định hoặc chỉ các vùng xác định tính bổ trợ (các gốc CDR) của miền thay đổi này được ghép với các vùng khung thích hợp. Các miền gắn kết-epitop có thể là kiểu hoang hoặc được cải biến bởi một hoặc nhiều thay thế axit amin. Việc cải biến này loại bỏ vùng ổn định là chất gây miễn dịch ở các cá thể người, nhưng vẫn còn khả năng có đáp ứng miễn dịch đối với miền thay đổi lạ ("*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics and Immune Responses*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224, của LoBuglio, A.F. *et al.* (1989)). Một cách khác tập trung không chỉ vào việc tạo ra các vùng ổn định thu được-từ người, mà còn cải biến các miền thay đổi cũng như tạo hình lại các miền này sao cho gần nhất có thể với dạng của người. Đã biết là các miền thay đổi của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chứa ba vùng xác định tính bổ trợ (CDR) các vùng này có thể thay đổi đáp ứng với các kháng nguyên quan tâm và xác định khả năng gắn kết, bên sườn là bốn vùng khung (FR) các vùng này có tính bảo toàn tương đối ở một loài nhất định và các vùng này được cho là tạo giàn giáo cho các CDR. Khi các kháng thể không phải của người được điều chế đối với một kháng nguyên cụ thể, các miền thay đổi có thể "được tạo hình lại" hoặc "được làm tương thích với người" bằng các CDR ghép thu được từ kháng thể không phải của người trên các vùng khung (FR) có mặt trong kháng thể của người sẽ được cải biến. Việc ứng dụng cách này cho nhiều loại kháng thể đã được Sato, K. *et al.* báo cáo trong tài liệu: Cancer Res 53:851-856, (1993). "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*," Nature 332:323-327, của Riechmann, L. *et al.* (1988); "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*," Science 239:1534-1536, của Verhoeyen M. *et al.* (1988); "*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibodies By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*," Protein Engineering 4:773-3783, của Kettleborough, C. A. *et al.* (1991); "*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134, của Maeda, H. *et al.* (1991);

"*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185, của Gorman, S. D. *et al.* (1991); "*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo*," Bio/Technology 9:266-271, của Tempest, P.R. *et al.* (1991); "*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873, của Co, M. S. *et al.* (1991); "*Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289, của Carter, P. *et al.* (1992); và "*Chimeric and Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*," J. Immunol. 148:1149-1154, của Co, M.S. *et al.* (1992). Theo một số phương án, các kháng thể được làm tương thích với người bảo toàn tất cả các trình tự CDR (ví dụ, kháng thể của chuột được làm tương thích với người có chứa tất cả 6 CDR từ các kháng thể của chuột). Theo các phương án khác, các kháng thể được làm tương thích với người có một hoặc nhiều CDR (một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) các CDR này khác biệt về trình tự so với kháng thể ban đầu.

Một số phân tử kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vị trí gắn kết-epitop thu được từ globulin miễn dịch không phải của người đã được mô tả, bao gồm các kháng thể khảm có miền thay đổi của loài gặm nhấm hoặc miền thay đổi của loài gặm nhấm được cải biến và các vùng xác định tính bổ trợ kết hợp của chúng (các CDR) được dung hợp với các miền ổn định của người (xem, ví dụ "*Man-made Antibodies*," Nature 349:293-299, của Winter *et al.* (1991); "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibodies In Man: Kinetics and Immune Response*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989) của Lobuglio *et al.* (1989), "*Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibodies (17-1A) To Colon Cancer Tumor-Associated Antigen*," J. Immunol. 138:4534-4538, của Shaw *et al.* (1987) và "*Tumor-Specific Genetically Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibodies*," Cancer Res. 47:3577-3583, của Brown *et al.* (1987)). Các tài liệu khác mô tả các CDR của loài gặm nhấm được ghép vào vùng khung (FR) nâng đỡ của người trước khi dung hợp với miền ổn định kháng thể của người thích hợp (xem, ví dụ "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*," Nature 332:323-327, của Riechmann, L. *et al.* (1988); "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*," Science 239:1534-1536, của Verhoeyen, M. *et al.* (1988); và

"*Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse*," Nature 321:522-525, của Jones *et al.* (1986)). Một tài liệu khác mô tả các CDR của loài gặm nhấm được nâng đỡ bằng các vùng khung của loài gặm nhấm được bọc ngoài bằng cách tái tổ hợp. Xem, ví dụ Công bố Patent Châu Âu số EP 519,596. Các phân tử "được làm tương thích với người" được thiết kế để giảm tối thiểu đáp ứng miễn dịch không mong muốn đối với các phân tử kháng thể kháng-người của loài gặm nhấm, vấn đề này hạn chế độ dài và độ hữu hiệu của các ứng dụng trị liệu của các gốc đó ở người nhận. Các phương pháp khác của các kháng thể để làm tương thích với người mà cũng có thể được sử dụng được Daugherty *et al.* đề cập trong "*Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, and Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins*," Nucl. Acids Res. 19:2471-2476, (1991) và trong các Patent Mỹ số 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; và 5,866,692.

B. Đặc tính các miền ổn định kháng thể

1. Miền ổn định của chuỗi nhẹ

Như chỉ ra ở trên, mỗi chuỗi nhẹ của kháng thể có chứa miền thay đổi ("VL") và miền ổn định ("CL").

Miền CL được ưu tiên là miền IgG CL Kappa của người. Trình tự axit amin của miền CL Kappa của người ví dụ là (SEQ ID NO:1):

```
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC
```

Theo cách khác, miền CL ví dụ là miền IgG CL Lambda của người. Trình tự axit amin của miền CL Lambda của người ví dụ là (SEQ ID NO:2):

```
QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
TECS
```

2. Các miền ổn định của chuỗi nặng

Như chỉ ra ở trên, các chuỗi nặng của kháng thể có thể bao gồm CH1, miền bản lề, các miền ổn định CH2 và CH3. Các miền CH1 của hai chuỗi nặng của phức hợp kháng thể với vùng ổn định "CL" của chuỗi nhẹ của kháng thể này, và được gắn với các miền CH2 của các chuỗi nặng thông qua miền bản lề can thiệp.

Miền CH1 ví dụ là miền IgG1 CH1 của người. Trình tự axit amin của miền IgG1 CH1 của người ví dụ là (SEQ ID NO:3):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

Miền CH1 ví dụ là miền IgG2 CH1 của người. Trình tự axit amin của miền IgG2 CH1 của người ví dụ là (SEQ ID NO:4):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

Miền CH1 ví dụ là miền IgG3 CH1 của người. Trình tự axit amin của miền IgG3 CH1 của người ví dụ là (SEQ ID NO:5):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRV

Miền CH1 ví dụ là miền IgG4 CH1 của người. Trình tự axit amin của miền IgG4 CH1 của người ví dụ là (SEQ ID NO:6):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

Miền bản lề ví dụ là miền bản lề của IgG1 của người. Trình tự axit amin của miền bản lề của IgG1 của người ví dụ là (SEQ ID NO:7): EPKSCDKTHTCPPCP

Miền bản lề ví dụ khác là miền bản lề của IgG2 của người. Trình tự axit amin của miền bản lề của IgG2 của người ví dụ là (SEQ ID NO:8): ERKCCVECPPCP

Miền bản lề ví dụ khác là miền bản lề của IgG3 của người. Trình tự axit amin của miền bản lề của IgG3 của người ví dụ là (SEQ ID NO:9):

ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK SCDTPPPCPR CP

Miền bản lề ví dụ khác là miền bản lề của IgG4 của người. Trình tự axit amin của miền bản lề của IgG4 của người ví dụ là (SEQ ID NO:10): ESKYGPPCPSCP. Như được mô tả trong bản mô tả này, miền bản lề IgG4 có thể bao gồm đột biến làm ổn định như thay thế S228P. Trình tự axit amin của miền bản lề IgG4 của người được làm ổn định bằng-S228P ví dụ là (SEQ ID NO:11): ESKYGPPCPPCP.

Các miền CH2 và CH3 của hai chuỗi nặng của kháng thể tương tác để tạo thành "miền Fc," đây chính là miền được nhận biết bởi các thụ thể Fc của tế bào, nhưng không giới hạn ở các thụ thể Fc gamma (FcγRs). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "miền Fc" được dùng để xác định vùng đầu tận cùng-C của chuỗi nặng của IgG. Miền Fc được cho là có isotyp, lớp hoặc phân lớp IgG cụ thể, nếu trình tự axit amin tương đồng nhất với isotyp đó so với các isotyp khác. Ngoài các ứng dụng đã biết của chúng trong lĩnh vực chẩn đoán, các kháng thể đã chứng tỏ là hữu ích làm các chất trị liệu.

Trong toàn bộ bản mô tả này, cách đánh số các gốc trong vùng ổn định của chuỗi nặng IgG là cách đánh số theo chỉ số EU (Châu Âu) như trong tài liệu của Kabat *et al.,* Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991) ("Kabat"), được viện dẫn ở đây để tham khảo. Thuật ngữ "chỉ số EU như trong tài liệu của Kabat" chỉ cách đánh số các miền ổn định của kháng thể IgG1 của người của Châu Âu. Các axit amin từ các miền thay đổi của các chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành của các globulin miễn dịch được chỉ định theo vị trí của axit amin trong chuỗi này. Kabat mô tả nhiều trình tự axit amin cho các kháng thể, xác định trình tự đồng thuận axit amin cho mỗi phân nhóm, và gán chỉ số gốc cho mỗi axit amin, và các CDR được xác định như Kabat (nên hiểu là CDR_H1 được xác định theo "*Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins*,". J. Mol. Biol. 196:901-917, (1987) của Chothia, C. & Lesk, A. M. bắt đầu ở 5 gốc sớm hơn). Sơ đồ đánh số của Kabat có thể mở rộng cho các kháng thể không được bao gồm trong tài liệu của ông, bằng cách làm thẳng mạch kháng thể quan tâm với một trong số các trình tự đồng thuận trong tài liệu của Kabat bằng cách dẫn chiếu đến các axit amin được bảo toàn. Phương pháp này nhằm gán các chỉ số gốc đã là phương

pháp chuẩn trong lĩnh vực này và dễ dàng xác định các axit amin ở các vị trí tương đương ở các kháng thể khác nhau, bao gồm các biến thể khảm hoặc được làm tương thích với người. Ví dụ, axit amin ở vị trí 50 của chuỗi nhẹ kháng thể của người chiếm vị trí trương đương với axit amin ở vị trí 50 của chuỗi nhẹ kháng thể của chuột.

Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG1 của người ví dụ là (SEQ ID NO:12):

```
231       240        250        260        270        280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

          290        300        310        320        330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

          340        350        360        370        380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

          390        400        410        420        430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

          440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

được đánh số theo chỉ số EU như đề cập trong tài liệu của Kabat, trong đó X là lysin (K) hoặc là không có.

Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG2 của người ví dụ là (SEQ ID NO:13):

```
231       240        250        260        270        280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD

          290        300        310        320        330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

          340        350        360        370        380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

          390        400        410        420        430
WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

          440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

được đánh số theo chỉ số EU như đề cập trong tài liệu của Kabat, trong đó X là lysin (K) hoặc là không có.

Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG3 của người ví dụ là (SEQ ID NO:14):

```
231       240        250        260        270        280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

          290        300        310        320        330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

          340        350        360        370        380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

          390        400        410        420        430
WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

          440      447
ALHNRFTQKS LSLSPGX
```

được đánh số theo chỉ số EU như đề cập trong tài liệu của Kabat, trong đó X là lysin (K) hoặc là không có.

Trình tự axit amin của miền CH2-CH3 của IgG4 của người ví dụ là (SEQ ID NO:15):

```
231       240        250        260        270        280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

          290        300        310        320        330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

          340        350        360        370        380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

          390        400        410        420        430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

          440      447
ALHNHYTQKS LSLSLGX
```

được đánh số theo chỉ số EU như đề cập trong tài liệu của Kabat, trong đó X là lysin (K) hoặc là không có.

Tính đa hình đã được nhận thấy ở một số vị trí khác nhau trong phạm vi các vùng ổn định của kháng thể (ví dụ, các vị trí Fc, bao gồm nhưng không giới hạn ở các vị trí 270, 272, 312, 315, 356, và 358 được đánh số theo chỉ số EU như đề cập trong tài liệu của Kabat), và do đó có thể có sự khác biệt không đáng kể giữa trình tự được trình bày và các trình tự đã biết. Các dạng đa hình của các globulin miễn dịch của người đã được xác định đặc tính rõ ràng. Hiện nay, 18 alotyp Gm là đã biết: G1m (1, 2, 3, 17) hoặc G1m (a, x, f, z), G2m (23) hoặc G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) hoặc G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) ("*The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function and Regulation.*" Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990), của Lefranc, *et al.*; Hum. Genet.: 50, 199-211, của Lefranc, G. *et al.*, 1979). Sáng chế dự định cụ thể là các kháng thể của sáng chế có thể kết hợp alotyp, isoalotyp, hoặc haplotyp của gen globulin miễn dịch bất kỳ, và không giới hạn ở alotyp, isoalotyp hoặc haplotyp của các trình tự được đề xuất trong bản mô tả này. Hơn nữa, trong một số hệ biểu hiện, gốc axit amin đầu tận cùng-C (in đậm ở trên) của miền CH3 có thể được loại bỏ sau dịch mã. Do đó, gốc đầu tận cùng-C của miền CH3 là gốc axit amin tùy ý trong các phân tử gắn kết-B7-H3 (bao gồm các phân tử B7-H3-ADC) của sáng chế. Cụ thể là, sáng thế bao gồm các phân tử gắn kết-B7-H3 (bao gồm các phân tử B7-H3-ADC) thiếu gốc đầu tận cùng-C của miền CH3. Cũng cụ thể là, sáng chế bao gồm các cấu trúc bao gồm gốc lysin đầu tận cùng-C của miền CH3.

Trong chức năng miễn dịch truyền thống, tương tác của các phức hợp kháng thể-kháng nguyên với các tế bào của hệ miễn dịch dẫn đến một loạt các đáp ứng, từ các chức năng hiệu ứng như độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể, khử hạt tế bào mast, và thực bào cho đến các tín hiệu điều biến miễn dịch như tăng sinh lympho bào điều tiết và bài tiết kháng thể. Tất cả các tương tác này bắt đầu thông qua sự gắn kết của miền Fc của các kháng thể hoặc các phức hợp miễn dịch với các thụ thể bề mặt tế bào chuyên biệt trên các tế bào tạo máu, và cụ thể là với các thụ thể (được gọi riêng là "thụ thể Fc gamma" "FcγR," và gọi chung là "FcγRs") được tìm thấy trên các bề mặt của nhiều loại tế bào của hệ miễn dịch (ví dụ, các lympho bào B, các tế bào dạng nhánh có nang, các tế bào giết tự nhiên, các đại thực bào, các bạch cầu trung tính, các bạch cầu ưa eosin, các bạch cầu ưa bazơ và các tế bào mast). Các thụ thể này có phần

"ngoại bào" (phần này do đó có khả năng nối với miền Fc), phần "xuyên màng" (phần này kéo dài xuyên qua màng tế bào, và phần "bào tương" (ở vị trí bên trong tế bào).

Tính đa dạng của các đáp ứng tế bào được khơi mào bởi các kháng thể và các phức hợp miễn dịch thu được từ tính không đồng nhất về cấu trúc của ba thụ thể Fc: FcγRI (CD64), CD32A (FcγRIIA), FcγRIIB (CD32B), CD16A (FcγRIIIA) và CD16B (FcγRIIIB). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) và FcγRIII (CD16) là các thụ thể kích hoạt sao cho việc nối chúng với miền Fc kích hoạt hệ miễn dịch hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch này. Ngược lại, FcγRIIB (CD32B) là thụ thể ức chế, việc nối với miền Fc ức chế đáp ứng miễn dịch hoặc dập tắt đáp ứng miễn dịch hiện có. Ngoài ra, tương tác của miền Fc với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) điều tiết quá trình tái sử dụng các phân tử IgG từ thể nhân đến bề mặt tế bào và giải phóng vào máu. Trình tự axit amin của miền Fc kiểu hoang ví dụ của IgG1 (SEQ ID NO:12), IgG2 (SEQ ID NO:13), IgG3 (SEQ ID NO:14), và IgG4 (SEQ ID NO:15) được trình bày ở trên.

CD16 là tên chung cho các thụ thể Fc kích hoạt, FcγRIIIA (CD16A) và FcγRIIIB (CD16B). CD16 được biểu hiện bởi các bạch cầu trung tính, các bạch cầu ưa eosin, các tế bào giết tự nhiên (NK), và các đại thực bào mô mà gắn kết IgG của người kết tập nhưng không phải dạng monome ("*Human Fc Gamma RIII: Cloning, Expression, and Identification Of The Chromosomal Locus Of Two Fc Receptors For IgG*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86(3):1013-1017, của Peltz, G.A. *et al.* (1989); "*NK Cells In Therapy Of Cancer*," Crit. Rev. Oncog. 19(1-2):133-141, của Bachanova, V. *et al.* (2014); "*Therapeutic Applications: Natural Killer Cells In The Clinic*," Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2013:247-253, của Miller, J.S. (2013); "*Pathogenic Effects Of Anti-Fc Gamma Receptor IIIB (CD16) On Polymorphonuclear Neutrophils In Non-Organ-Specific Autoimmune Diseases*," Autoimmun Rev. 1(1-2):13-19, của Youinou, P. *et al.* (2002); "*Bispecific Antibodies Targeting Cancer Cells*," Biochem. Soc. Trans. 30(4):507-511), của Peipp, M. *et al.* (2002). Các thụ thể này gắn kết với phần Fc của các kháng thể IgG, nhờ đó khơi mào giải phóng các xytokin. Nếu các kháng thể này được gắn kết với kháng nguyên của các tế bào lạ (ví dụ, các tế bào khối u), thì sự giải phóng này điều tiết việc tiêu diệt tế bào khối u này. Do việc tiêu diệt này phụ thuộc-kháng thể, nên được gọi là độc tính tế bào qua trung gian-tế bào phụ thuộc-kháng thể (ADCC).

CD32A (FcγRIIA) ("Fc Receptor Inside-Out Signaling và Possible Impact On Antibody Therapy," Immunol Rev. 268(1):74-87, của Brandsma, A.M. (2015); "Fcgammar Polymorphisms: Implications For Function, Disease Susceptibility and Immunotherapy," Tissue Antigens 61(3):189-202, của van Sorge, N.M. et al. (2003); "Functional Regulation Of Human Neutrophil Fc Gamma Receptors," Immunol. Res. 29(1-3):219-230, của Selvaraj, P. et al. (2004)) và CD64 (FcγRI) ("Structural Mechanism Of High Affinity FcγRI recognition Of Immunoglobulin G," Immunol. Rev. 268(1):192-200, của Lu, S. et al. (2015); "The Many Faces Of FcγRI: Implications For Therapeutic Antibody Function," Immunol. Rev. 268(1):160-174, của Swisher, J.F. et al. (2015); "Fcgamma Receptor 1 (CD64), A Target Beyond Cancer," Curr. Pharm. Des. 15(23):2712-2718, của Thepen, T. et al. (2009); "Fc Receptors As Targets For Immunotherapy," Int. Rev. Immunol. 16(1-2):147-185, của Rouard, H. et al. (1997)) là các thụ thể Fc kích hoạt mà được biểu hiện trên các đại thực bào, các bạch cầu trung tính, các bạch cầu ưa eosin và các tế bào dạng nhánh (và CD32A, trên tiểu cầu và các tế bào Langerhan). Trái lại, CD32B (FcγRIIB) là thụ thể Fc ức chế trên các tế bào lympho B (các đại thực bào, các bạch cầu trung tính, và các bạch cầu ưa eosin) ("Regulation of Monoclonal Antibody Immunotherapy by FcγRIIB," J. Clin. Immunol. [2016 Feb 27 Epub], pp. 1-7, của Stopforth, R.J. et al. (2016); "Specificity and Affinity Of Human Fcgamma Receptors and Their Polymorphic Variants For Human IgG Subclasses," Blood. 113(16):3716-3725, của Bruhns, P. et al. (2009); "FcγRIIB As A Key Determinant Of Agonistic Antibody Efficacy," Curr. Top. Microbiol. Immunol. 382:355-372, của White, A.L. et al. (2014); "Functional Regulation Of Human Neutrophil Fc Gamma Receptors," Immunol. Res. 29(1-3):219-230, của Selvaraj, P. et al. (2004)).

Khả năng của các FcγR khác nhau điều tiết các chức năng hoàn toàn đối lập phản ánh các khác biệt về cấu trúc của chúng, và cụ thể là phản ánh liệu FcγR có mô-típ kích hoạt dựa vào-tyrosin của thụ thể miễn dịch ("ITAM") hoặc mô-típ ức chế dựa vào-tyrosin của thụ thể miễn dịch ("ITIM"). Việc tuyển mộ các enzym bào chất khác nhau đến các cấu trúc này quyết định kết quả của các đáp ứng tế bào qua trung gian-FcγR. Các FcγR có chứa-ITAM-bao gồm FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, và kích hoạt hệ miễn dịch khi được gắn kết với miền Fc ví dụ, các miền Fc kết tập có mặt

trong phức hợp miễn dịch). FcγRIIB là FcγR có chứa-ITIM tự nhiên hiện đã biết duy nhất; nó có vai trò dập tắt hoặc ức chế hệ miễn dịch khi được gắn kết với các miền Fc kết tập. Các bạch cầu trung tính của người biểu hiện gen FcγRIIA. Cụm FcγRIIA thông qua các phức hợp miễn dịch hoặc liên kết ngang kháng thể đặc hiệu có vai trò kết tập các ITAM cùng với các kinaza-được kết hợp thụ thể mà tạo thuận lợi cho quá trình phosphoryl hoá ITAM. Quá trình phosphoryl hoá ITAM có vai trò là vị trí neo giữ đối với Syk kinaza, kích hoạt enzym này dẫn đến kích hoạt các cơ chất tiếp theo (ví dụ, PI_3K). Kích hoạt tế bào dẫn đến giải phóng các chất trung gian tiền viêm. Gen FcγRIIB được biểu hiện trên các lympho bào B; miền ngoại bào của nó đồng nhất ở mức 96% với FcγRIIA và gắn kết các phức hợp IgG theo cách không phân biệt. Sự có mặt của ITIM trong miền bào chất của FcγRIIB xác định phân lớp ức chế này của FcγR. Gần đây, cơ chế phân tử của việc ức chế này đã được xác định. Khi được đồng-nối với FcγR kích hoạt, ITIM trong FcγRIIB bị phosphoryl hoá và thu hút miền SH2 của inositol polyphosphat 5'-phosphataza (SHIP), enzym này thuỷ phân các chất truyền tin phosphoinositol được giải phóng do kích hoạt tyrosin kinaza qua trung gian-FcγR-có chứa ITAM, do đó ngăn dòng Ca^{++} nhập nội bào. Do đó, liên kết ngang của FcγRIIB dập tắt đáp ứng kích hoạt đối với việc nối FcγR và ức chế tính đáp ứng của tế bào, do đó, sự kích hoạt tế bào-B, tăng sinh tế bào-B và bài tiết kháng thể bị huỷ bỏ.

II. Các kháng thể hai đặc hiệu, diabody đa đặc hiệu và diabody DART®

Khả năng của kháng thể gắn kết epitop của kháng nguyên tùy thuộc vào sự có mặt và trình tự axit amin của các miền VL và VH của kháng thể này. Tương tác của chuỗi nhẹ kháng thể và chuỗi nặng kháng thể và, cụ thể là, tương tác của các miền VL và VH của nó tạo thành một trong hai vị trí gắn kết-epitop của kháng thể tự nhiên, như IgG. Các kháng thể tự nhiên có khả năng gắn kết với chỉ một loại epitop (*nghĩa là,* chúng là đơn đặc hiệu), mặc dù chúng có thể gắn kết nhiều bản sao của loại này (*nghĩa là,* thể hiện hoá trị hai hoặc đa hoá trị).

Chức năng của các kháng thể có thể được tăng cường bằng cách tạo ra các phân tử dựa vào-kháng thể đa đặc hiệu mà có thể gắn kết đồng thời với hai kháng nguyên tách biệt và phân biệt (các epitop khác nhau của cùng một kháng nguyên)

và/hoặc bằng cách tạo ra phân tử dựa vào-kháng thể có hoá trị cao hơn (có nghĩa là, nhiều hơn hai vị trí gắn kết) đối với cùng một epitop và/hoặc kháng nguyên.

Để tạo ra các phân tử có khả năng cao hơn các kháng thể tự nhiên, nhiều loại kiểu kháng thể hai đặc hiệu tái tổ hợp đã được phát triển (xem, ví dụ, các Công bố đơn PCT số WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), phần lớn trong số này sử dụng các peptit liên kết để dung hợp thêm mảnh gắn kết-epitop (ví dụ, scFv, VL, VH, *v.v.*) với, hoặc trong phạm vi lõi kháng thể (IgA, IgD, IgE, IgG hoặc IgM), hoặc dung hợp nhiều mảnh gắn kết-epitop (ví dụ, 2 mảnh Fab hoặc scFv). Các kiểu khác sử dụng các peptit liên kết để dung hợp mảnh gắn kết-epitop (ví dụ, scFv, VL, VH, v.v..) với miền dime hoá như miền CH2-CH3 hoặc các polypeptit khác (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). Các Công bố đơn PCT số WO 2013/174873, WO 2011/133886 và WO 2010/136172 bộc lộ kháng thể ba đặc hiệu trong đó các miền CL và CH1 được chuyển đổi từ các vị trí tự nhiên tương ứng của chúng và các miền VL và VH đã được đa dạng hoá (WO 2008/027236; WO 2010/108127) để cho phép chúng gắn kết với nhiều hơn một kháng nguyên. Các Công bố đơn PCT số WO 2013/163427 và WO 2013/119903 bộc lộ việc cải biến miền CH2 để có chứa sản phẩm cộng protein dung hợp bao gồm miền gắn kết. Các Công bố đơn PCT số WO 2010/028797, WO2010028796 và WO 2010/028795 bộc lộ các kháng thể tái tổ hợp, các miền Fc của chúng đã được thay thế bằng các miền VL và VH bổ sung, để tạo thành các phân tử gắn kết hoá trị ba. Các Công bố đơn PCT số WO 2003/025018 và WO2003012069 bộc lộ các diabody tái tổ hợp, các chuỗi riêng rẽ của chúng có chứa các miền scFv. Công bố đơn PCT số WO 2013/006544 bộc lộ các phân tử Fab đa hóa trị mà được tổng hợp dưới dạng chuỗi polypeptit đơn và tiếp đó được thuỷ phân protein để cho các cấu trúc dị dime. Các Công bố đơn PCT số WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 và WO 1991/003493 bộc lộ việc bổ sung các miền gắn kết bổ sung hoặc các nhóm chức năng cho kháng thể hoặc đoạn kháng thể (ví dụ, bổ sung diabody vào chuỗi nhẹ của kháng thể này, hoặc bổ sung các miền VL và VH vào các chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể

này, hoặc bổ sung protein dung hợp khác loài hoặc nối chuỗi nhiều miền Fab với nhau).

Lĩnh vực này còn ghi nhận khả năng sản xuất diabody mà khác biệt với các kháng thể tự nhiên ở khả năng gắn kết hai hoặc nhiều loại epitop khác nhau (*nghĩa là,* thể hiện tính hai đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu ngoài hoá trị hai hoặc đa hoá trị) (xem, ví dụ, "*Diabodies": Small Bivalent and Bispecific Antibody Fragments,*" Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448, của Holliger *et al.* (1993); US 2004/0058400 (Hollinger *et al.*); US 2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens *et al.*); FEBS Lett. 454(1-2):90-94, của Alt *et al.* (1999); "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor and The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,*" J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672, của Lu, D. *et al.* (2005); WO 02/02781 (Mertens *et al.*); "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation and Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,*" Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27, của Olafsen, T. *et al.* (2004); "*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange,*" Protein Engineering 14(2):1025-1033, của Wu, A. *et al.* (2001); "*A Diabody For Cancer Immunotherapy and Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain,*" Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992, của Asano *et al.* (2004); "*Construction Of Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*" Protein Eng. 13(8):583-588, của Takemura, S. *et al.* (2000); "*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy,*" Cancer Res. 69(12):4941-4944, của Baeuerle, P.A. *et al.* (2009)).

Việc thiết kế diabody là dựa trên dẫn xuất kháng thể được gọi là mảnh miền thay đổi chuỗi đơn (scFv). Các phân tử được tạo ra bằng cách liên kết các miền thay đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng bằng cách sử dụng peptit liên kết ngắn. Bird *et al.* (1988) ("*Single-Chain Antigen-Binding Proteins,*" Science 242:423-426) mô tả ví dụ về các peptit liên kết cầu nối khoảng 3,5 nm giữa đầu tận cùng carboxy của một miền thay đổi và đầu tận cùng amino của miền thay đổi còn lại. Các liên kết của các trình tự khác đã được thiết kế và sử dụng ("*Single-Chain Antigen-Binding Proteins,*" Science 242:423-426, của Bird *et al.* (1988)). Các liên kết tiếp đó có thể được cải

biến cho chức năng bổ sung, như gắn các dược chất hoặc gắn với chất nền rắn. Các biến thể chuỗi đơn có thể được sản xuất bằng cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp. Để sản xuất tổng hợp scFv, có thể sử dụng thiết bị tổng hợp tự động. Để sản xuất tái tổ hợp scFv, plasmit thích hợp có chứa polynucleotit mà mã hoá scFv có thể được đưa vào tế bào vật chủ thích hợp, các tế bào có nhân điển hình, như nấm men, các tế bào thực vật, côn trùng hoặc động vật có vú, hoặc các tế bào không có nhân điển hình, như E. coli. Các polynucleotit mã hoá scFv quan tâm có thể được điều chế bằng cách xử lý thông thường như nối các polynucleotit. scFv thu được có thể được phân lập bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein chuẩn đã biết trong lĩnh vực này.

Việc tạo ra các phân tử gắn kết hai đặc hiệu (ví dụ, diabody không phải-đơn đặc hiệu) cho một ưu thế đáng kể đối với các kháng thể, bao gồm nhưng không giới hạn ở, khả năng gắn kết "trans" đủ để đồng-nối và đồng-định vị các tế bào khác nhau biểu hiện các epitop khác nhau và/hoặc khả năng gắn kết "cis" đủ để đồng-nối và đồng-định vị các phân tử khác nhau được biểu hiện bởi cùng một tế bào. Các phân tử gắn kết hai đặc hiệu (ví dụ, diabody không phải-đơn đặc hiệu) do đó có các ứng dụng rộng rãi kể cả trị liệu và chẩn đoán miễn dịch. Tính hai đặc hiệu cho phép khả năng linh hoạt lớn trong thiết kế và chế tạo diabody trong nhiều ứng dụng, cung cấp tổng ái lực được gia tăng đối với các kháng nguyên multime, liên kết ngang của các kháng nguyên khác nhau, và nhằm đích đến các loại tế bào cụ thể dựa vào sự có mặt của cả hai kháng nguyên đích. Do hoá trị gia tăng của chúng, tỷ lệ phân ly thấp và thanh thải nhanh chóng từ hệ tuần hoàn (đối với diabody cỡ nhỏ, bằng hoặc < ~50 kDa), các phân tử diabody đã biết trong lĩnh vực này cũng đã chứng tỏ ứng dụng cụ thể trong lĩnh vực chụp khối u (*"Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabody Expressed In Pichia pastoris,"* Protein Eng. 10:1221-1225, của Fitzgerald *et al.* (1997)).

Khả năng sản xuất các diabody hai đặc hiệu đã dẫn đến việc sử dụng chúng (theo kiểu "trans") để đồng-nối hai tế bào với nhau, ví dụ, bằng cách đồng nối các thụ thể có mặt trên bề mặt của các tế bào khác nhau (ví dụ, liên kết ngang tế bào T gây độc tế bào với các tế bào khối u (*"Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,"* Nature 314:628-631, của Staerz *et al.* (1985) và *"Specific Killing Of U lympho Cells By Cytotoxic T-cell Mediated By A Bispecific Diabody,"* Protein Eng.

9:299-305, của Holliger *et al.* (1996); "*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*," Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658, của Marvin *et al.* (2005)). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, diabody hai đặc hiệu (hoặc ba hoặc đa đặc hiệu) có thể được sử dụng để đồng-nối (theo cách "cis") các phân tử, như các thụ thể, v.v., mà có mặt trên bề mặt của cùng một tế bào. Việc đồng nối các tế bào và/hoặc thụ thể khác nhau là hữu ích đối với các chức năng hiệu ứng điều biến và/hoặc tín hiệu của tế bào miễn dịch. Các phân tử đa đặc hiệu (ví dụ, các diabody hai đặc hiệu) bao gồm các vị trí gắn kết-epitop có thể nhắm tới phần quyết định trên bề mặt của tế bào miễn dịch bất kỳ, như CD2, CD3, CD8, CD16, thụ thể tế bào-T (TCR), NKG2D, *v.v.*, các thụ thể này được biểu hiện trên các lympho bào T, các tế bào giết tự nhiên (NK), các tế bào trình diện-kháng nguyên hoặc các tế bào đơn nhân khác. Cụ thể là, các vị trí gắn kết-epitop nhắm tới thụ thể trên bề mặt tế bào mà có mặt trên các tế bào hiệu ứng miễn dịch, là hữu ích để tạo ra các phân tử gắn kết đa đặc hiệu có khả năng điều tiết sự tiêu diệt tế bào được nhắm tới.

Tuy nhiên, ưu thế trên phải trả giá tương đối. Việc tạo thành diabody không phải đơn đặc hiệu này đòi hỏi phải lắp ráp thành công hai hoặc nhiều polypeptit phân biệt và khác nhau (*nghĩa là,* việc tạo thành này đòi hỏi diabody phải được tạo thành thông qua dị dime hoá các loại chuỗi polypeptit khác nhau). Thực tế này trái ngược với diabody đơn đặc hiệu, kháng thể này được tạo thành thông qua homodime hoá chuỗi polypeptit giống nhau. Do ít nhất hai polypeptit không tương tự (*nghĩa là,* hai loại polypeptit) cần phải được tạo ra để tạo thành diabody không phải đơn đặc hiệu, và do quá trình homodime hoá các polypeptit này dẫn đến phân tử không có hoạt tính ("*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*" Protein Eng. 13(8):583-588, của Takemura, S. *et al.* (2000)), việc sản xuất các polypeptit này cần phải đạt được theo cách sao cho ngăn không liên kết cộng hoá trị giữa các polypeptit cùng loại (*nghĩa là,* sao cho ngăn ngừa quá trình homodime hoá) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*" Protein Eng. 13(8):583-588, của Takemura, S. *et al.* (2000)). Do đó, lĩnh vực kỹ thuật này đã đưa ra việc kết hợp không phải cộng hoá trị các polypeptit này (xem, ví dụ, "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation and Radiolabeling For Tumor Targeting*

Applications," Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27, của Olafsen *et al.* (2004); "*A Diabody For Cancer Immunotherapy and Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain,*" Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992, của Asano *et al.* (2004); "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*" Protein Eng. 13(8):583-588, của Takemura, S. *et al.* (2000); "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor and The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,*" J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672, của Lu, D. *et al.* (2005)).

Tuy nhiên, lĩnh vực này đã thừa nhận là diabody hai đặc hiệu bao gồm các polypeptit được kết hợp không phải theo cách cộng hoá trị là không ổn định và dễ bị phân ly thành các monome không hoạt động (xem, ví dụ, "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor and The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,*" J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672, của Lu, D. *et al.* (2005)).

Đối mặt với thách thức này, lĩnh vực này đã thành công trong việc phát triển diabody không phải đơn đặc hiệu dị dime được liên kết cộng hoá trị ổn định, được gọi là diabody DART®; xem, ví dụ, các Công bố Patent Mỹ số 2013-0295121; 2010-0174053 và 2009-0060910; các Công bố Patent Châu Âu số EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 và các Công bố đơn PCT số WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; và "*Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells,*" PLoS Pathog. 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233, của Sloan, D.D. *et al.* (2015); "*Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform,*" Blood pii: blood-2014-05-575704, của Al Hussaini, M. *et al.* (2015); "*A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity and Safety In Nonhuman Primates,*" Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82, của Chichili, G.R. *et al.* (2015); "*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell U lympho,*" Blood 117(17):4542-4551, của Moore, P.A. *et al.* (2011); "*Therapeutic*

Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943, của Veri, M.C. *et al.* (2010); "*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis and in vivo B-Cell Depletion*," J. Mol. Biol. 399(3):436-449, của Johnson, S. *et al.* (2010)). Các diabody này bao gồm hai hoặc nhiều polypeptit được tạo phức cộng hoá trị và bao gồm việc thiết kế một hoặc nhiều gốc xystein vào mỗi loại polypeptit được dùng, mà cho phép các liên kết disulfua tạo thành và do đó liên kết theo cách cộng hoá trị một hoặc nhiều cặp chuỗi polypeptit với nhau. Ví dụ, việc bổ sung gốc xystein vào đầu tận cùng-C của các cấu trúc này đã chứng tỏ là cho phép tạo liên kết disulfua giữa các chuỗi polypeptit có liên quan, làm ổn định diabody thu được mà không ảnh hưởng đến các đặc tính gắn kết của diabody này.

Nhiều biến đổi của các phân tử này đã được mô tả (xem, ví dụ, các Công bố Patent Mỹ số 2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318; 2013/0295121; 2010/0174053; 2009/0060910; 2007-0004909; các Công bố Patent Châu Âu số EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221; EP 1868650 và Công bố đơn PCT số WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; WO 2006/113665) và được đề xuất trong bản mô tả này.

Các cấu trúc khác là đã biết trong lĩnh vực này cho các ứng dụng, trong đó phân tử hoá trị bốn là phân tử mong muốn, nhưng Fc là không cần thiết, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng thể tandem hoá trị bốn, còn được gọi là "TandAbs" (xem, ví dụ, các Công bố Patent Mỹ số 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667 2013-0189263; các Công bố Patent Châu Âu số EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 và EP 1293514; các Công bố đơn PCT số WO 1999/057150, WO 2003/025018, và WO 2013/013700), các kháng thể này được tạo thành bằng cách homodime hoá hai chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi chuỗi có mang miền VH1, VL2, VH2, và VL2.

Gần đây, các cấu trúc hoá trị ba kết hợp hai miền gắn kết kiểu-diabody và một miền không phải kiểu-diabody và miền Fc đã được mô tả (xem, ví dụ, các Công bố đơn PCT số WO 2015/184207 và WO 2015/184203). Các phân tử gắn kết hoá trị ba

này có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử đơn đặc hiệu, hai đặc hiệu hoặc ba đặc hiệu. Khả năng gắn kết ba epitop khác nhau tạo ra các khả năng được tăng cường.

III. B7-H3

B7-H3 của người tồn tại dưới dạng "4Ig" và dạng "2Ig". Trình tự axit amin của dạng "4Ig" đại diện của B7-H3 của người (kể cả trình tự tín hiệu gồm 29 gốc axit amin, được thể hiện gạch chân) có trình tự NCBI NP_001019907 (SEQ ID NO:16, trình tự tín hiệu gồm 29 gốc axit amin, được thể hiện gạch chân):

```
MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
LFDVHSILRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHSSVTITPQ RSPTGAVEVQ
VPEDPVVALV GTDATLRCSF SPEPGFSLAQ LNLIWQLTDT KQLVHSFTEG
RDQGSAYANR TALFPDLLAQ GNASLRLQRV RVADEGSFTC FVSIRDFGSA
AVSLQVAAPY SKPSMTLEPN KDLRPGDTVT ITCSSYRGYP EAEVFWQDGQ
GVPLTGNVTT SQMANEQGLF DVHSVLRVVL GANGTYSCLV RNPVLQQDAH
GSVTITGQPM TFPPEALWVT VGLSVCLIAL LVALAFVCWR KIKQSCEEEN
AGAEDQDGEG EGSKTALQPL KHSDSKEDDG QEIA
```

Trình tự axit amin của dạng "2Ig" của B7-H3 của người được bao bọc hoàn toàn trong phạm vi dạng "4Ig" của B7-H3 của người. Trình tự axit amin của dạng "2Ig" đại diện của B7-H3 của người (kể cả trình tự tín hiệu gồm 29 gốc axit amin, được thể hiện gạch chân) có trình tự NCBI là NP_079516 (SEQ ID NO:17):

```
MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL

AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
PNKDLRPGDT VTITCSSYRG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
LFDVHSVLRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHGSVTITGQ PMTFPPEALW
VTVGLSVCLI ALLVALAFVC WRKIKQSCEE ENAGAEDQDG EGEGSKTALQ
PLKHSDSKED DGQEIA
```

Theo các phương án nhất định, các phân tử gắn kết-B7-H3 (ví dụ, scFv, các kháng thể, các diabody hai đặc hiệu, *v.v.*) của sáng chế đặc trưng bởi có một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám hoặc chín tiêu chí bất kỳ trong số các tiêu chí sau:

(1) khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch B7-H3 của người khi được biểu hiện nội sinh trên bề mặt của tế bào ung thư;

(2) gắn kết đặc hiệu B7-H3 của động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ, B7-H3 của khỉ cynomolgus);

(3) gắn kết đặc hiệu B7-H3 của người với hằng số gắn kết cân bằng (K_D) bằng 1 nM hoặc nhỏ hơn;

(4) gắn kết đặc hiệu B7-H3 của động vật linh trưởng không phải là người với hằng số gắn kết cân bằng (K_D) bằng 1 nM hoặc nhỏ hơn;

(5) gắn kết đặc hiệu B7-H3 của người với tốc độ gắn kết (ka) bằng 1×10^6 $M^{-1}min^{-1}$ hoặc cao hơn;

(6) gắn kết đặc hiệu B7-H3 của động vật linh trưởng không phải là người với tốc độ gắn kết (ka) bằng 1×10^6 $M^{-1}min^{-1}$ hoặc cao hơn;

(7) gắn kết đặc hiệu B7-H3 của người với tốc độ phân ly (kd) bằng 15×10^{-4} min^{-1} hoặc nhỏ hơn;

(8) gắn kết đặc hiệu B7-H3 của động vật linh trưởng không phải là người với tốc độ phân ly (kd) bằng 15×10^{-4} min^{-1} hoặc nhỏ hơn;

(9) khả năng điều tiết quá trình tiêu diệt tế bào được nhắm tới (ví dụ, tiêu diệt các tế bào ung thư biểu hiện B7-H3).

Như đã mô tả trong bản mô tả này, các hằng số gắn kết của phân tử gắn kết-B7-H3 có thể được xác định bằng cách sử dụng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt ví dụ, phân tích bằng BIACORE®. Dữ liệu cộng hưởng plasmon bề mặt có thể được khớp vào mô hình gắn kết 1:1 Langmuir (ka kd đồng thời) và hằng số gắn kết cân bằng K_D được tính từ tỷ lệ giữa các hằng số tốc độ kd/ka. Các hằng số gắn kết này có thể được xác định cho phân tử gắn kết-B7-H3 hoá trị một (có nghĩa là, phân tử bao gồm vị trí gắn kết-epitop B7-H3 duy nhất), phân tử gắn kết-B7-H3 hoá trị hai (có nghĩa là, phân tử bao gồm hai vị trí gắn kết-epitop B7-H3), hoặc các phân tử gắn kết-B7-H3 có hoá trị cao hơn (ví dụ, phân tử bao gồm ba, bốn, hoặc nhiều vị trí gắn kết-epitop B7-H3).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tiêu diệt tế bào được nhắm tới" chỉ khả năng của một phân tử điều tiết quá trình tiêu diệt một tế bào đích (ví dụ, tế bào ung thư) bằng cách khu trú tế bào hiệu ứng miễn dịch (ví dụ, tế bào T, tế bào NK, v.v.) đến vị trí của tế bào đích này bằng cách gắn kết các epitop có mặt trên các bề mặt của các tế bào hiệu ứng và đích này, dẫn đến tiêu diệt tế bào đích này. Khả năng của một phân tử gắn kết-B7-H3 (ví dụ, phân tử gắn kết-B7-H3 x CD3 hai đặc hiệu) điều tiết hoạt tính tiêu diệt tế bào được nhắm tới có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm lympho bào T độc tính tế bào (CTL). Các thử nghiệm này là đã biết trong lĩnh vực này và các thử nghiệm được ưu tiên được mô tả dưới đây.

Cụ thể, sáng chế bao gồm các phân tử gắn kết-B7-H3 (ví dụ, các kháng thể, các diabody, các phân tử gắn kết hoá trị ba, v.v.) bao gồm các miền thay đổi kháng-B7-H3 (có nghĩa là, các miền VL và/hoặc VH) mà gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của polypeptit B7-H3 của người. Trừ khi có đề cập khác, tất cả các phân tử gắn kết-B7-H3 có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với B7-H3 của người. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các miền thay đổi B7-H3 này được gọi tương ứng là "kháng-B7-H3-VL" và "kháng-B7-H3-VH".

IV. Các kháng thể của chuột kháng-B7-H3 của người và dẫn xuất được làm tương thích với người của chúng

Bốn kháng thể kháng-B7-H3 ví dụ, được ký hiệu là "mAb-A," "mAb-B," "mAb-C" và "mAb-D," được phân tách từ các tế bào lai mà đã được sản xuất bằng cách gây miễn dịch bằng các tế bào biểu hiện B7-H3 của người, bằng polypeptit B7-H3 hoặc epitop peptit của chúng. Các kháng thể "mAb-B," "mAb-C" và "mAb-D," được làm tương thích với người.

Các kháng thể "mAb-C," và "mAb-D" được xác định là phản ứng chéo với B7-H3 của khỉ cynomolgus. Trình tự axit amin của các miền VL và VH của mAb-C và mAb-D được đề cập dưới đây. Theo một phương án, các phân tử gắn kết kháng-B7-H3 của người được ưu tiên của sáng chế có 1, 2 hoặc tất cả 3 CDR_H của miền VH và/hoặc 1, 2 hoặc tất cả 3 CDR_L của miền VL, của các miền VH và/hoặc VL của kháng thể đơn dòng kháng-B7-H3 của chuột mAb-D, của kháng thể đơn dòng khảm mAb-D ("chmAb-D") hoặc của kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người

mAb-C hoặc mAb-D ("hmAb-C" hoặc "hmAb-D"). Các phân tử gắn kết kháng-B7-H3 của người được ưu tiên bao gồm các kháng thể hai đặc hiệu (hoặc đa đặc hiệu), các kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm tương thích với người, các BiTE, các diabody, *v.v.*, và các phân tử gắn kết này có các miền Fc biến thể. Sáng chế bao gồm việc sử dụng kháng thể bất kỳ trong số mAb-A, mAb-B, mAb-C hoặc mAb-D để tạo thành các phân tử gắn kết B7-H3, và cụ thể là, B7-H3-ADC.

A. Kháng thể của chuột kháng-B7-H3 của người mAb-A

Trình tự axit amin của miền VL của kháng thể kháng-B7-H3 của chuột được ký hiệu là "mAb-A" (SEQ ID NO:95) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIAMTQSQKF MSTSVGDRVS VTC**KASQNVD** **TNVA**WYQQKP GQSPKALIY**S**
ASYRYSGVPD RFTGSGSGTD FTLTINNVQS EDLAEYFC**QQ** **YNNYPFT**FGS
GTKLEIK

Trình tự axit amin của miền VH của mAb-A (SEQ ID NO:96) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS **SFGMH**WVRQA PEKGLEWVA**Y**
ISSDSSAIYY **ADTVKG**RFTI SRDNPKNTLF LQMTSLRSED TAMYYCGR**GR**
ENIYYGSRLD **Y**WGQGTTLTV SS

B. Kháng thể của chuột kháng-B7-H3 của người mAb-B

Trình tự axit amin của miền VL của kháng thể kháng-B7-H3 của chuột được ký hiệu là "mAb-B" (SEQ ID NO:97) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISC**RASQDIS** **NYLN**WYQQKP DGTVKLLIY**Y**
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTIDNLEQ EDIATYFC**QQ** **GNTLPPT**FGG
GTKLEIK

Trình tự axit amin của miền VH của mAb-B (SEQ ID NO:98) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

QVQLQQSGAE LARPGASVKL SCKASGYTFT **SYWMQ**WVKQR PGQGLEWIG**T**
IYPGDGDTRY **TQKFKG**KATL TADKSSSTAY MQLSSLASED SAVYYCAR**RG**
IPRLWYFDVW GAGTTVTVSS

C. Kháng thể kháng-B7-H3 của người được làm tương thích với người hmAb-B

Trình tự axit amin của miền VL của hmAb-B (SEQ ID NO:99) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
GTKLEIK

Theo một số phương án, trình tự axit amin của CDR_L1 của hmAb-B (RASQ*D*IS*N*YLN) (SEQ ID NO:100) có thể được thay thế bằng CDR_L1 khác có trình tự axit amin RASQ*S*IS*S*YLN (SEQ ID NO:101). Tương tự, trình tự axit amin của CDR_L2 của hmAb-B (YTSRL*H*S) (SEQ ID NO:102) có thể được thay thế bằng CDR_L2 khác có trình tự axit amin YTSRL*Q*S (SEQ ID NO:103).

Trình tự axit amin của miền VH của hmAb-B (SEQ ID NO:104) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT
IYPGDGDTRY TQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG
IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS

Theo một số phương án, trình tự axit amin của CDR_H2 của hmAb-B (TIYPG*D*GDTRYTQKF*K*G) (SEQ ID NO:105) có thể được thay thế bằng CDR_H2 khác có trình tự axit amin: TIYPG*G*GDTRYTQKF*Q*G (SEQ ID NO:106)

D. Kháng thể của chuột kháng-B7-H3 của người mAb-C

Trình tự axit amin của miền VL của kháng thể kháng-B7-H3 của chuột được ký hiệu là "mAb-C" (SEQ ID NO:18) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIQMTQSPAS LSVSVGETVT ITCRASESIY SYLAWYQQKQ GKSPQLLVYN
TKTLPEGVPS RFSGSGSGTQ FSLKINSLQP EDFGRYYCQH HYGTPPWTFG
GGTNLEIK

Trình tự axit amin của miền VH của mAb-C (SEQ ID NO:19) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

EVQQVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS **SYGMS**WVRQT PDKRLEWVA**T**
INSGGSNTYY **PDSLKG**RFTI SRDNAKNTLY LQMRSLKSED TAMYYCAR**HD**
GGAMDYWGQG TSVTVSS

E. Kháng thể kháng-B7-H3 của người được làm tương thích với người hmAb-C

Các miền thay đổi của kháng thể kháng-B7-H3 mAb-C được làm tương thích với người. Trong một số trường hợp, các miền thay đổi được làm tương thích với người khác được tạo ra để tối ưu hoá hoạt tính gắn kết và/hoặc loại bỏ các epitop kháng nguyên và/hoặc loại bỏ các gốc axit amin có khả năng không bền vững.

Trình tự axit amin của miền VL của hmAb-C (SEQ ID NO:20) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASESIY** **SYLA**WYQQKP GKAPKLLVY**N**
TKTLPEGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QH** **HYGTPPWT**FG
QGTRLEIK

Trình tự axit amin của miền VH của hmAb-C (SEQ ID NO:21) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYGMS**WVRQA PGKGLEWVA**T**
INSGGSNTYY **PDSLKG**RFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAR**HD**
GGAMDYWGQG TTVTVSS

F. Kháng thể của chuột kháng-B7-H3 của người mAb-D

Trình tự axit amin của miền VL của kháng thể kháng-B7-H3 của chuột được ký hiệu là "mAb-D" (SEQ ID NO:22) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTC**KASQNVD TNVA**WYQQKQ GHSPEALIY**S**
ASYRYSGVPA RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFC**QQ YNNYPFT**FGG
GTKLEIK

Trình tự axit amin của miền CDR_L1 của mAb-D là (SEQ ID NO:23): **KASQNVDTNVA**.

Trình tự axit amin của miền CDR_L2 của mAb-D là (SEQ ID NO:24): **SASYRYS**

Trình tự axit amin của miền CDR_L3 của mAb-D là (SEQ ID NO:25): QQYNNYPFT.

Trình tự axit amin của miền VH của mAb-D (SEQ ID NO:26) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

DVQLAESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY
ISSGSGTIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNSLF LQMTSLRSED TAMYYCARHG
YRYEGFDYWG QGTTLTVSS

Trình tự axit amin của miền CDR_H1 của mAb-D là (SEQ ID NO:27): SFGMH.

Trình tự axit amin của miền CDR_H2 của mAb-D là (SEQ ID NO:28): YISSGSGTIYYADTVKG.

Trình tự axit amin của miền CDR_H3 của mAb-D là (SEQ ID NO:29): HGYRYEGFDY.

G. Kháng thể kháng-B7-H3 của người được làm tương thích với người mAb-D

Các miền thay đổi của kháng thể kháng-B7-H3 mAb-D được làm tương thích với người. Trong một số trường hợp, các miền thay đổi được làm tương thích với người khác được tạo ra để tối ưu hoá hoạt tính gắn kết và/hoặc để loại bỏ các epitop kháng nguyên và/hoặc để loại bỏ các gốc axit amin có khả năng không bền vững.

Trình tự axit amin của miền VL của hmAb-D (SEQ ID NO:30) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân).

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFAEYFCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIK

Trình tự axit amin của miền VH của hmAb-D (SEQ ID NO:31) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân).

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSGSGTIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHG
YRYEGFDYWG QGTTVTVSS

V. Các thụ thể kháng nguyên khảm

Các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế có thể là các phân tử chuỗi đơn đơn đặc hiệu như các mảnh thay đổi chuỗi đơn ("kháng-B7-H3-scFv") hoặc các thụ thể kháng nguyên khảm ("kháng-B7-H3-CAR"). Như đề cập ở trên, scFv được điều chế bằng cách liên kết các miền thay đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng với nhau bằng peptit liên kết đoạn ngắn. Các CAR thế hệ đầu tiên thường có miền nội bào từ chuỗi-CD3 ζ, đây là chất truyền tín hiệu cấp một từ các TCR nội sinh. Các CAR thế hệ thứ hai có các miền tín hiệu nội bào bổ sung từ các thụ thể protein đồng kích thích khác nhau (ví dụ, CD28, 41BB, ICOS, v.v.) cho đến phần đuôi bào tương của CAR để cung cấp các tín hiệu bổ sung cho tế bào T. Các CAR thế hệ thứ ba tổ hợp các miền đa tín hiệu, như CD3z-CD28-41BB hoặc CD3z-CD28-OX40, để tăng cường cường độ tín hiệu hơn nữa ("*Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric* Antigen *Receptor*," Br. J. Haematol. 161:389-401, của Tettamanti, S. *et al.* (2013); "*Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia and Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T cells*," Blood 123(15): 2343-2354, của Gill, S. *et al.* (2014); "*T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions and Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia*," Blood 122:3138-3148, của Mardiros, A. *et al.* (2013); "*Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo*," Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62, của Pizzitola, I. *et al.* (2014)).

Các kháng-B7-H3-CAR của sáng chế bao gồm kháng-B7-H3-scFv được dung hợp với miền nội bào của thụ thể. Các miền chuỗi nhẹ thay đổi và các miền chuỗi nặng thay đổi của kháng-B7-H3-scFv tốt hơn là hmAb-C VL (SEQ ID NO:20) và hmAb-C VH (SEQ ID NO:21) hoặc tốt hơn là hmAb-D VL (SEQ ID NO:30) và hmAb-D VH (SEQ ID NO:31).

Miền nội bào của các kháng-B7-H3-CAR theo sáng chế tốt hơn là được chọn từ miền nội bào của thụ thể bất kỳ trong số: 41BB-CD3ζ, b2c-CD3ζ, CD28, CD28-4-1BB-CD3ζ, CD28-CD3ζ, CD28-FcεRIγ, CD28mut-CD3ζ, CD28-OX40-CD3ζ,

CD28-OX40-CD3ζ, CD3ζ, CD4-CD3ζ, CD4-FcεRIγ, CD8-CD3ζ, FcεRIγ, FcεRIγCAIX, Heregulin-CD3ζ, IL-13-CD3ζ, hoặc Ly49H-CD3ζ ("*Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric* Antigen *Receptor*," Br. J. Haematol. 161:389-401, (2013) của Tettamanti, S. *et al.*; "*Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia and Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T cells*," Blood 123(15): 2343-2354, (2014) của Gill, S. *et al.*; "*T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions and Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia*," Blood 122:3138-3148, (2013) của Mardiros, A. *et al.*; "*Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo*," Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62, (2014)của Pizzitola, I. *et al.*).

VI. Các phân tử gắn kết-B7-H3 đa đặc hiệu

Sáng chế cũng đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 đa đặc hiệu (ví dụ, hai đặc hiệu, ba đặc hiệu, v.v.) phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm vị trí gắn kết-epitop (tốt hơn là bao gồm 1, 2 hoặc tất cả 3 CDR_H của miền kháng-B7-H3-VH của sáng chế và/hoặc 1, 2 hoặc tất cả 3 CDR_L của miền kháng-B7-H3-VL của sáng chế, hoặc miền kháng-B7-H3-VH và/hoặc miền kháng-B7-H3-VL) và còn bao gồm vị trí gắn kết-epitop thứ hai mà gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop thứ hai, trong đó epitop thứ hai này là (i) epitop khác của B7-H3, hoặc (ii) epitop của phân tử mà không phải là B7-H3. Các phân tử gắn kết-B7-H3 đa đặc hiệu ưu tiên bao gồm tổ hợp các vị trí gắn kết-epitop mà nhận biết một bộ các kháng nguyên độc nhất của các tế bào đích hoặc loại mô đích. Cụ thể là, sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 đa đặc hiệu mà có khả năng gắn kết với epitop của B7-H3 và epitop của phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng, đặc biệt là lympho bào T, tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc tế bào đơn nhân khác. Ví dụ, các phân tử gắn kết-B7-H3 này của sáng chế có thể được tạo cấu trúc để bao gồm vị trí gắn kết-epitop mà gắn kết đặc hiệu miễn dịch CD2, CD3, CD8, CD16, thụ thể tế bào T (TCR), hoặc NKG2D.

Một phương án của sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 hai đặc hiệu mà có khả năng gắn kết với "epitop thứ nhất" và "epitop thứ hai", các epitop này không giống nhau. Các phân tử hai đặc hiệu này bao gồm các miền "VL1" / "VH1" mà có khả năng gắn kết với epitop thứ nhất và các miền "VL2" / "VH2" mà có khả năng gắn kết với epitop thứ hai. Các ký hiệu "VL1" và "VH1" tương ứng chỉ miền thay đổi chuỗi nhẹ và miền thay đổi chuỗi nặng mà gắn kết epitop "thứ nhất" của phân tử hai đặc hiệu này. Tương tự, các ký hiệu "VL2" và "VH2" tương ứng chỉ miền thay đổi chuỗi nhẹ và miền thay đổi chuỗi nặng mà gắn kết epitop "thứ hai" của các phân tử hai đặc hiệu này. Không liên quan đến việc epitop cụ thể được chỉ định làm epitop thứ nhất so với epitop thứ hai; các ký hiệu này chỉ có ý nghĩa đối với sự có mặt và hướng của các miền của các chuỗi polypeptit của các phân tử gắn kết của sáng chế. Theo một phương án, một epitop trong số các epitop này là epitop của B7-H3 của người và epitop còn lại là epitop khác với B7-H3, hoặc là epitop của phân tử mà không phải là B7-H3. Theo các phương án cụ thể, một epitop trong số các epitop này là epitop của B7-H3 của người và epitop còn lại là epitop của phân tử (ví dụ, CD2, CD3, CD8, CD16, thụ thể tế bào T (TCR), NKG2D, v.v..) có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng, như lympho bào T, tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc tế bào đơn nhân khác. Theo các phương án nhất định, phân tử hai đặc hiệu bao gồm nhiều hơn 2 vị trí gắn kết-epitop. Các phân tử hai đặc hiệu này sẽ gắn kết ít nhất một epitop của B7-H3 và ít nhất một epitop của phân tử mà không phải là B7-H3, và có thể còn gắn kết các epitop bổ sung của B7-H3 và/hoặc các epitop bổ sung của phân tử mà không phải là B7-H3.

Cụ thể, sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 hai đặc hiệu, ba đặc hiệu và đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể hai đặc hiệu, các diabody hai đặc hiệu, các phân tử gắn kết hoá trị ba, v.v..) mà có các mảnh gắn kết-epitop của các kháng thể (ví dụ, các miền VL và VH) làm cho chúng có khả năng gắn kết phối hợp với ít nhất một epitop của B7-H3 và ít nhất một epitop của phân tử thứ hai mà không phải là B7-H3. Việc chọn lọc các miền VL và VH của các miền polypeptit của các phân tử này được phối hợp sao cho các chuỗi polypeptit tạo thành các phân tử gắn kết-B7-H3 đa đặc hiệu lắp ghép để tạo thành ít nhất một vị trí gắn kết-epitop hoạt động mà đặc hiệu đối với ít nhất một epitop của B7-H3 và ít nhất một vị trí gắn kết-epitop hoạt động

mà đặc hiệu đối với ít nhất một epitop của phân tử mà không phải là B7-H3. Tốt hơn là, các phân tử gắn kết-B7-H3 đa đặc hiệu bao gồm 1, 2 hoặc tất cả 3 CDR_H của miền kháng-B7-H3-VH của sáng chế và/hoặc 1, 2 hoặc tất cả 3 CDR_L của miền kháng-B7-H3-VL của sáng chế, hoặc miền kháng-B7-H3-VH và/hoặc miền kháng-B7-H3-VL, như đề xuất trong bản mô tả này.

A. Các kháng thể hai đặc hiệu

Sáng chế bao gồm các kháng thể hai đặc hiệu có khả năng gắn kết đồng thời với epitop của B7-H3 và epitop của phân tử mà không phải là B7-H3. Theo một số phương án, kháng thể hai đặc hiệu có khả năng gắn kết đồng thời với B7-H3 và phân tử thứ hai mà không phải là B7-H3 được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả trong các Công bố đơn PCT số WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873, và WO 2014/022540, được viện dẫn ở đây để tham khảo.

B. Các diabody hai đặc hiệu thiếu các miền Fc

Một phương án của sáng chế đề cập tới các diabody hai đặc hiệu mà có khả năng gắn kết với epitop thứ nhất và epitop thứ hai, trong đó epitop thứ nhất là epitop của B7-H3 của người và epitop thứ hai là epitop của phân tử mà không phải là B7-H3, ưu tiên là phân tử (ví dụ, CD2, CD3, CD8, CD16, thụ thể tế bào T (TCR), NKG2D, v.v.) có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng, như lympho bào T, tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc tế bào đơn nhân khác. Các diabody này bao gồm, và ưu tiên nhất là bao gồm, chuỗi polypeptit thứ nhất và chuỗi polypeptit thứ hai, các trình tự của các chuỗi này cho phép các chuỗi polypeptit gắn kết cộng hoá trị với nhau để tạo thành diabody được kết hợp cộng hoá trị mà có khả năng gắn kết đồng thời với epitop của B7-H3 và epitop thứ hai.

Chuỗi polypeptit thứ nhất của phương án này của các diabody hai đặc hiệu bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng-N đến đầu tận cùng-C: đầu tận cùng-N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với epitop thứ nhất hoặc thứ hai (có nghĩa là, $VL_{kháng\text{-}B7\text{-}H3\text{-}VL}$ hoặc $VL_{Epitop\ 2}$), peptit đệm can thiệp thứ nhất (Liên kết 1), miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với epitop thứ hai (nếu chuỗi polypeptit thứ nhất này có chứa $VL_{kháng\text{-}B7\text{-}H3\text{-}VL}$) hoặc B7-H3 (nếu chuỗi polypeptit thứ nhất này có chứa $VL_{Epitop\ 2}$), peptit đệm can thiệp thứ hai (Liên kết 2) tùy ý có chứa gốc xystein, miền thúc đẩy-dị dime và đầu tận cùng-C (Fig. 1).

Chuỗi polypeptit thứ hai của phương án này của các diabody hai đặc hiệu bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng-N đến đầu tận cùng-C: đầu tận cùng-N, miền VL của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với epitop thứ nhất hoặc thứ hai (có nghĩa là, $VL_{kháng\text{-}B7\text{-}H3\text{-}VL}$ hoặc $VL_{Epitop\ 2}$, và là miền VL không được chọn để đưa vào chuỗi polypeptit thứ nhất của diabody này), peptit đệm can thiệp (Liên kết 1), miền VH của kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với epitop thứ hai (nếu chuỗi polypeptit thứ hai có chứa $VL_{kháng\text{-}B7\text{-}H3\text{-}VL}$) hoặc với B7-H3 (nếu chuỗi polypeptit thứ hai này có chứa$VL_{Epitop\ 2}$), peptit đệm can thiệp thứ hai (Liên kết 2) tùy ý có chứa gốc xystein, miền thúc đẩy-dị dime, và đầu tận cùng-C (Fig. 1).

Miền VL của chuỗi polypeptit thứ nhất tương tác với miền VH của chuỗi polypeptit thứ hai để tạo thành vị trí gắn kết-epitop hoạt động thứ nhất mà đặc hiệu đối với kháng nguyên thứ nhất (có nghĩa là, B7-H3 hoặc phân tử có chứa epitop thứ hai). Tương tự, miền VL của chuỗi polypeptit thứ hai tương tác với miền VH của chuỗi polypeptit thứ nhất để tạo thành vị trí gắn kết-epitop hoạt động thứ hai mà đặc hiệu đối với kháng nguyên thứ hai (có nghĩa là, phân tử mà bao gồm epitop thứ hai hoặc B7-H3). Do đó, việc chọn lọc các miền VL và VH của các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai được phối hợp, sao cho hai chuỗi polypeptit của diabody này tập hợp lại bao gồm các miền VL và VH có khả năng gắn kết với cả hai epitop của B7-H3 và với epitop thứ hai (có nghĩa là, các chuỗi này tập hợp lại bao gồm $VL_{kháng\text{-}B7\text{-}H3\text{-}VL}/VH_{kháng\text{-}B7\text{-}H3\text{-}VH}$ và $VL_{Epitop\ 2}/VH_{Epitop\ 2}$).

Tốt nhất là, độ dài của peptit đệm can thiệp (có nghĩa là, "Liên kết 1," tách riêng các miền VL và VH này) được chọn để ngăn ngừa hoàn toàn hoặc một cách

đáng kể các miền VL và VH của chuỗi polypeptit gắn kết với nhau (ví dụ gồm từ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9 gốc axit amin liên kết can thiệp). Do đó, các miền VL và VH của chuỗi polypeptit thứ nhất hoàn toàn hoặc về cơ bản không có khả năng gắn kết với nhau. Tương tự, các miền VL và VH của chuỗi polypeptit thứ hai hoàn toàn hoặc về cơ bản không có khả năng gắn kết với nhau. Peptit đệm can thiệp được ưu tiên (Liên kết 1) có trình tự (SEQ ID NO:32): GGGSGGGG.

Độ dài và thành phần của peptit đệm can thiệp thứ hai ("Liên kết 2") được lựa chọn dựa vào chọn một hoặc miền polypeptit mà thúc đẩy sự dime hoá này (có nghĩa là, "Miền thúc đẩy-dị dime"). Thông thường, peptit đệm can thiệp thứ hai (Liên kết 2) sẽ bao gồm từ 3 đến 20 gốc axit amin. Cụ thể là, trong trường hợp (các) Miền thúc đẩy-dị dime được sử dụng không bao gồm gốc xystein peptit đệm can thiệp thứ hai có chứa-xystein (Liên kết 2) được sử dụng. Peptit đệm can thiệp thứ hai có chứa-xystein (Liên kết 2) có chứa 1, 2, 3 hoặc nhiều xystein. Peptit đệm can thiệp có chứa-xystein (Liên kết 2) được ưu tiên có trình tự GGCGGG (SEQ ID NO:33). Theo cách khác, Liên kết 2 không bao gồm xystein (ví dụ, GGG, GGGS (SEQ ID NO:34), LGGGSG (SEQ ID NO:35), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:36), ASTKG (SEQ ID NO:37), LEPKSS (SEQ ID NO:38), APSSS (SEQ ID NO:39), v.v..) và miền thúc đẩy-dị dime có chứa-xystein, như được mô tả dưới đây được sử dụng. Tùy ý, cả liên kết 2 có chứa-xystein và miền thúc đẩy-dị dime có chứa-xystein được sử dụng.

Các miền thúc đẩy-heterodim có thể là GVEPKSC (SEQ ID NO:40) hoặc VEPKSC (SEQ ID NO:41) hoặc AEPKSC (SEQ ID NO:42) trên một chuỗi polypeptit và GFNRGEC (SEQ ID NO:43) hoặc FNRGEC (SEQ ID NO:44) trên chuỗi polypeptit còn lại (US2007/0004909).

Theo một phương án được ưu tiên, các miền thúc đẩy-dị dime sẽ bao gồm các miền cuộn lặp lại tandem mang điện trái dấu, ví dụ, các miền xoắn "cuộn-E" (SEQ ID NO:45: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), mà các gốc glutamat của nó sẽ có điện tích âm ở pH 7, và các miền "cuộn-K" (SEQ ID NO:46: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE), các gốc lysin của nó sẽ có điện tích dương ở pH 7. Sự có mặt các miền tích điện này thúc đẩy việc kết hợp giữa các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai, và do đó nuôi dưỡng việc tạo thành dị dime. Các miền

thúc đẩy-dị dime mà bao gồm các cải biến của các trình tự cuộn-E và cuộn-K nêu trên để đưa vào một hoặc nhiều gốc xystein có thể được sử dụng. Sự có mặt của các gốc xystein này cho phép cuộn có mặt trên một chuỗi polypeptit trở thành liên kết cộng hoá trị với cuộn bổ trợ trên chuỗi polypeptit khác, do đó liên kết cộng hoá trị các chuỗi polypeptit với nhau và gia tăng độ ổn định của diabody. Các ví dụ được đặc biệt ưu tiên là các miền thúc đẩy-dị dime bao gồm cuộn-E được cải biến có trình tự axit amin EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:47), và cuộn-K được cải biến có trình tự axit amin KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:48).

Như đề cập trong WO 2012/018687, để cải thiện các tính chất dược động học *in vivo* của diabody, diabody có thể được cải biến để có chứa đoạn polypeptit của protein gắn kết-huyết thanh ở một hoặc nhiều đầu tận cùng của diabody này. Tốt nhất là, đoạn polypeptit này của protein gắn kết-huyết thanh sẽ được lắp ở đầu tận cùng-C của chuỗi polypeptit của diabody này. Albumin là protein sẵn có nhất trong huyết thanh và có thời gian bán thải 19 ngày ở người. Albumin có một số vị trí gắn kết phân tử nhỏ mà cho phép nó gắn kết không cộng hoá trị với các protein khác và do đó kéo dài thời gian bán thải huyết thanh của chúng. Miền gắn kết-albumin 3 (ABD3) của protein G của chủng Streptococcus G148 gồm có 46 gốc axit amin tạo thành bó ba-cấu trúc xoắn ổn định và có tính đặc hiệu gắn kết albumin rộng ("*Structure, Specificity, and Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules*," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120, (2002) của Johansson, M.U. *et al.*. Do đó, đoạn polypeptit được đặc biệt ưu tiên của protein gắn kết-huyết thanh để cải thiện các tính chất dược động học *in vivo* của diabody là miền gắn kết-albumin (ABD) từ protein *Streptococcus* G, và tốt hơn nữa là, miền gắn kết-albumin 3 (ABD3) của protein G của chủng *Streptococcus* G148 (SEQ ID NO:49): LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

Như được đề cập trong WO 2012/162068 (được viện dẫn ở đây để tham khảo), các biến thể "được khử miễn dịch" của SEQ ID NO:49 có khả năng làm giảm bớt hoặc loại bỏ gắn kết MHC lớp II. Dựa vào các kết quả gây đột biến tổ hợp, các tổ hợp thay thế sau đây được xem là các thay thế được ưu tiên để tạo thành ABD được khử miễn dịch: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A;

64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. Các ABD biến thể có các cải biến L64A, I65A và D79A hoặc các cải biến N66S, T70S và D79A. ABD được khử miễn dịch biến thể có trình tự axit amin:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI**D**$_{66}$NAK**S**$_{70}$ **A**$_{71}$EGVKALIDE ILAALP **(SEQ ID NO:50),**

hoặc trình tự axit amin:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKN**A**$_{64}$**A**$_{65}$NNAKT VEGVKALI**A**$_{79}$E ILAALP **(SEQ ID NO:51),**

hoặc trình tự axit amin:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLI**S**$_{66}$NAK**S**$_{70}$ VEGVKALI**A**$_{79}$E ILAALP **(SEQ ID NO:52),**

là được đặc biệt ưu tiên làm ABD được khử miễn dịch thể hiện khả năng gắn kết về cơ bản kiểu hoang đồng thời cung cấp khả năng gắn kết MHC lớp II giảm bớt. Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất của diabody này có ABD có chứa liên kết thứ ba (Liên kết 3) tốt hơn là ở vị trí đầu tận cùng-C so với miền cuộn-E (hoặc cuộn-K) của chuỗi polypeptit này sao cho can thiệp vào giữa miền cuộn-E (hoặc cuộn-K) và ABD (mà tốt hơn là ABD được khử miễn dịch). Trình tự được ưu tiên cho liên kết 3 này là SEQ ID NO:34: GGGS.

C. Các diabody đa đặc hiệu có chứa các miền Fc

Một phương án của sáng chế đề cập tới các diabody đa đặc hiệu có khả năng gắn kết đồng thời với epitop của B7-H3 và epitop thứ hai (có nghĩa là, epitop khác của B7-H3 hoặc epitop của phân tử mà không phải là B7-H3) mà bao gồm miền Fc. Việc bổ sung miền CH2-CH3 của IgG vào một hoặc cả hai chuỗi polypeptit của diabody này, sao cho việc tạo phức các chuỗi diabody dẫn đến tạo thành miền Fc, gia tăng thời gian bán thải sinh học và/hoặc thay đổi hoá trị của diabody này. Các diabody này bao gồm, hai hoặc nhiều chuỗi polypeptit, các trình tự của các chuỗi này cho phép các chuỗi polypeptit gắn kết cộng hoá trị với nhau để tạo thành diabody được kết hợp cộng hoá trị mà có khả năng gắn kết đồng thời với epitop của B7-H3 và

epitop thứ hai. Kết hợp các miền CH2-CH3 của IgG vào cả hai polypeptit của diabody cho phép tạo thành diabody có chứa-vùng-Fc hai đặc hiệu hai-chuỗi (Fig. 2).

Theo cách khác, việc kết hợp các miền CH2-CH3 của IgG chỉ vào một trong số các polypeptit của diabody sẽ cho phép tạo thành diabody có chứa-miền Fc hai đặc hiệu bốn-chuỗi phức tạp hơn (Fig. 3A-Fig. 3C). Fig. 3C thể hiện diabody bốn-chuỗi đại diện có miền nhẹ ổn định (CL) và miền nặng ổn định CH1, tuy nhiên các mảnh của các miền này cũng như các polypeptit khác có thể được sử dụng (xem, ví dụ, Fig. 3A và Fig. 3B, các Công bố Patent Mỹ số 2013-0295121; 2010-0174053 và 2009-0060910; các Công bố Patent Châu Âu số EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 và các Công bố đơn PCT số WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Do đó, ví dụ, thay vì miền CH1, có thể sử dụng peptit có trình tự axit amin GVEPKSC (SEQ ID NO:40), VEPKSC (SEQ ID NO:41), hoặc AEPKSC (SEQ ID NO:42), thu được từ miền bản lề của IgG của người, và thay vì miền CL, có thể sử dụng 6 axit amin đầu tận cùng-C của chuỗi nhẹ kappa của người, GFNRGEC (SEQ ID NO:43) hoặc FNRGEC (SEQ ID NO:44). Diabody bốn-chuỗi có chứa peptit đại diện được thể hiện trên Fig. 3A. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, có thể sử dụng peptit bao gồm các miền cuộn tandem điện tích trái dấu như các miền xoắn "cuộn-E" (SEQ ID NO:45: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK hoặc SEQ ID NO:47: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); và các miền "cuộn-K" (SEQ ID NO:46: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE hoặc SEQ ID NO:48: KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE). Diabody bốn-chuỗi có chứa miền cuộn đại diện được thể hiện trên Fig. 3B.

Các phân tử có chứa-miền Fc của sáng chế có thể bao gồm các peptit đệm can thiệp bổ sung (các Liên kết), nói chung các Liên kết này sẽ được kết hợp giữa miền thúc đẩy-dị dime (ví dụ, cuộn-E hoặc cuộn-K) và miền CH2-CH3 và/hoặc giữa miền CH2-CH3 và miền thay đổi (nghĩa là, VH hoặc VL). Thông thường, các Liên kết bổ sung sẽ bao gồm 3-20 gốc axit amin và có thể tùy ý có chứa toàn bộ hoặc một đoạn của miền bản lề của IgG (ưu tiên là đoạn có chứa xystein của miền bản lề của IgG). Các liên kết có thể được sử dụng trong các phân tử diabody có chứa-miền Fc hai đặc hiệu của sáng chế bao gồm: GGGS (SEQ ID NO:34), LGGGSG (SEQ ID NO:35), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO:36), ASTKG (SEQ ID NO:37), LEPKSS (SEQ ID

NO:38), APSSS (SEQ ID NO:39), APSSSPME (SEQ ID NO:53), VEPKSADKTHTCPPCP (SEQ ID NO:54), LEPKSADKTHTCPPC (SEQ ID NO:55), DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:56), GGC, và GGG. LEPKSS (SEQ ID NO:38) có thể được sử dụng thay vì GGG hoặc GGC để dễ tách dòng. Ngoài ra, các axit amin GGG, hoặc LEPKSS (SEQ ID NO:38) có thể được tiếp sau ngay bằng DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:56) để tạo thành các liên kết luân phiên: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:57); và LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:58). Phân tử có chứa-miền Fc hai đặc hiệu của sáng chế có thể kết hợp vùng bản lề của IgG thêm ngoài một liên kết hoặc thay vì một liên kết. Các vùng bản lề ví dụ bao gồm: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:7) từ IgG1, ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO:8) từ IgG2, ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO:10) từ IgG4, và ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:11) biến thể bản lề của IgG4 bao gồm thay thế S228P (được đánh số theo chỉ số EU như trong tài liệu của Kabat) làm ổn định để giảm thiểu trao đổi sợi.

Như đề xuất trên Fig. 3A-Fig. 3C, diabody có chứa miền Fc của sáng chế có thể bao gồm 4 chuỗi. Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba của diabody này có chứa 3 miền: (i) miền có chứa-VL1, (ii) miền có chứa-VH2, (iii) miền thúc đẩy-dị dime và (iv) miền có chứa trình tự CH2-CH3. Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ tư có chứa: (i) miền có chứa-VL2, (ii) miền có chứa-VH1 và (iii) miền thúc đẩy-dị dime, trong đó các miền thúc đẩy-dị dime thúc đẩy quá trình dime hoá chuỗi polypeptit thứ nhất/thứ ba với chuỗi polypeptit thứ hai/thứ tư. Các miền VL và/hoặc VH của chuỗi polypeptit thứ ba và thứ tư, và các miền VL và/hoặc VH của chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai có thể giống nhau hoặc khác nhau để cho phép gắn kết hoá trị bốn mà là đơn đặc hiệu, hai đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu. Ký hiệu "VL3" và "VH3" tương ứng chỉ miền chuỗi nhẹ thay đổi và miền chuỗi nặng thay đổi mà gắn kết epitop "thứ ba" của diabody này. Tương tự, ký hiệu "VL4" và "VH4" tương ứng chỉ miền chuỗi nhẹ thay đổi và miền chuỗi nặng thay đổi mà gắn kết epitop "thứ tư" của diabody này. Cấu trúc chung của chuỗi polypeptit của diabody có chứa-miền Fc hai đặc hiệu bốn-chuỗi đại diện của sáng chế được đề xuất trong Bảng 1:

Bảng 1		
Hai đặc hiệu	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
Bốn đặc hiệu	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ tư	NH_2-VL4-VH3-HPD-COOH

HPD = Miền thúc đẩy-dị dime

Theo phương án cụ thể, các diabody của sáng chế là diabody có chứa-Fc hai đặc hiệu, hoá trị bốn (nghĩa là, có bốn vị trí gắn kết-epitop) mà gồm có tổng cộng bốn chuỗi polypeptit (Fig. 3A-Fig. 3C). Diabody có chứa-Fc, hai đặc hiệu, hoá trị bốn của sáng chế bao gồm hai vị trí gắn kết-epitop đặc hiệu miễn dịch đối với B7-H3 (mà có khả năng gắn kết với epitop giống nhau của B7-H3 hoặc với các epitop khác nhau của B7-H3), và hai vị trí gắn kết-epitop đặc hiệu miễn dịch đối với phân tử thứ hai (mà có khả năng gắn kết với epitop giống nhau của phân tử thứ hai hoặc với các epitop khác nhau của phân tử thứ hai). Ưu tiên là, phân tử thứ hai là phân tử (ví dụ, CD2, CD3, CD8, CD16, thụ thể tế bào T (TCR), NKG2D, v.v..) có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng, như lympho bào T, tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc tế bào đơn nhân khác.

Theo một phương án khác, diabody có chứa-miền-Fc của sáng chế có thể bao gồm ba chuỗi polypeptit. Polypeptit thứ nhất của diabody này có chứa ba miền: (i) miền có chứa-VL1, (ii) miền có chứa-VH2 và (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3. Polypeptit thứ hai của diabody này có chứa: (i) miền có chứa-VL2, (ii) miền có chứa-VH1 và (iii) miền thúc đẩy dị dime hoá và tạo liên kết cộng hoá trị với chuỗi polypeptit thứ nhất của diabody này. Polypeptit thứ ba của diabody này bao gồm trình tự CH2-CH3. Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai của diabody này kết hợp với nhau để tạo thành vị trí gắn kết VL1/VH1 mà có khả năng gắn kết với kháng nguyên thứ nhất (nghĩa là, B7-H3 hoặc phân tử mà bao gồm epitop thứ hai), cũng như vị trí gắn kết VL2/VH2 mà có khả năng gắn kết với kháng nguyên thứ hai (nghĩa

là, phân tử có chứa epitop thứ hai hoặc B7-H3). Polypeptit thứ nhất và thứ hai liên kết với nhau thông qua liên kết disulfua gồm các gốc xystein ở các miền thứ ba tương ứng của chúng. Đáng chú ý là, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba tạo phức với nhau để tạo thành miền Fc được làm ổn định nhờ liên kết disulfua. Diabody hai đặc hiệu này có hiệu lực tăng cường. Fig. 4A và Fig. 4B minh họa các cấu trúc của diabody này. Diabody có chứa-vùng-Fc hai đặc hiệu này có thể có một trong hai hướng (Bảng 2):

Bảng 2		
Hướng thứ nhất	chuỗi thứ ba	NH_2-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
Hướng thứ hai	chuỗi thứ ba	NH_2-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH

HPD = Miền thúc đẩy-dị dime

Theo phương án cụ thể, diabody của sáng chế là diabody có chứa-Fc hoá trị hai (nghĩa là, có hai vị trí gắn kết-epitop), hai đặc hiệu mà gồm có tổng cộng ba chuỗi polypeptit (Fig. 4A-Fig. 4B). Diabody có chứa-miền Fc hoá trị hai, hai đặc hiệu của sáng chế bao gồm một vị trí gắn kết-epitop đặc hiệu miễn dịch đối với B7-H3, và một vị trí gắn kết-epitop đặc hiệu miễn dịch đối với phân tử thứ hai. Ưu tiên là, phân tử thứ hai là phân tử (ví dụ, CD2, CD3, CD8, CD16, thụ thể tế bào T (TCR), NKG2D, v.v..) có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng, như lympho bào T, tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc tế bào đơn nhân khác.

Theo một phương án khác, diabody có chứa-miền-Fc có thể bao gồm tổng cộng năm chuỗi polypeptit. Theo một phương án cụ thể, hai trong số năm chuỗi polypeptit này có cùng trình tự axit amin. Chuỗi polypeptit thứ nhất của diabody này có chứa: (i) miền có chứa-VH1, (ii) miền có chứa-CH1, và (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3. Chuỗi polypeptit thứ nhất có thể là chuỗi nặng của kháng thể có chứa VH1 và vùng ổn định chuỗi nặng. Chuỗi polypeptit thứ hai và thứ năm của diabody này có chứa: (i) miền có chứa-VL1, và (ii) miền có chứa-CL. Chuỗi polypeptit thứ

hai và/hoặc thứ năm của diabody này có thể là các chuỗi nhẹ của kháng thể có chứa VL1 bổ trợ cho VH1 của chuỗi polypeptit thứ nhất/thứ ba. Chuỗi polypeptit thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ năm có thể được phân lập từ kháng thể có trong tự nhiên. Theo cách khác, các chuỗi này có thể được tạo cấu trúc bằng cách tái tổ hợp. Chuỗi polypeptit thứ ba của diabody này có chứa: (i) miền có chứa-VH1, (ii) miền có chứa-CH1, (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3, (iv) miền có chứa-VL2, (v) miền có chứa-VH3 và (vi) miền thúc đẩy-dị dime, trong đó các miền thúc đẩy-dị dime thúc đẩy quá trình dime hoá của chuỗi thứ ba với chuỗi thứ tư. Polypeptit thứ tư của diabody này có chứa: (i) miền có chứa-VL3, (ii) miền có chứa-VH2 và (iii) miền thúc đẩy dị dime hoá và tạo liên kết cộng hoá trị với chuỗi polypeptit thứ ba của diabody này.

Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai, và thứ ba và thứ năm của diabody này kết hợp với nhau để tạo thành hai vị trí gắn kết-epitop VL1/VH1 có khả năng gắn kết epitop thứ nhất. Chuỗi polypeptit thứ ba và thứ tư của diabody này kết hợp với nhau để tạo thành vị trí gắn kết VL2/VH2 mà có khả năng gắn kết với epitop thứ hai, cũng như vị trí gắn kết VL3/VH3 mà có khả năng gắn kết với epitop thứ ba. Polypeptit thứ nhất và thứ ba liên kết với nhau thông qua liên kết disulfua gồm các gốc xystein trong các vùng ổn định tương ứng của chúng. Đáng chú ý là, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba tạo phức với nhau để tạo thành miền Fc. Diabody đa đặc hiệu này có hiệu lực tăng cường. Fig. 5 minh họa cấu trúc của diabody này. Nên hiểu là các miền VL1/VH1, VL2/VH2, và VL3/VH3 có thể giống nhau hoặc khác nhau để cho phép việc gắn kết là đơn đặc hiệu, hai đặc hiệu hoặc ba đặc hiệu. Như đề xuất trong bản mô tả này, các miền này ưu tiên được chọn để gắn kết epitop của B7-H3, epitop của phân tử thứ hai và tùy ý epitop của phân tử thứ ba.

Các miền VL và VH của chuỗi polypeptit được chọn sao cho tạo thành vị trí gắn kết VL/VH đặc hiệu đối với epitop mong muốn. Các vị trí gắn kết VL/VH được tạo thành bằng cách kết hợp chuỗi polypeptit có thể giống nhau hoặc khác nhau để cho phép gắn kết hoá trị bốn mà là đơn đặc hiệu, hai đặc hiệu, ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu. Cụ thể là, các miền VL và VH có thể được chọn sao cho diabody đa hóa trị có thể bao gồm hai vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất và hai vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai, hoặc ba vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất và một vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai, hoặc hai vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất, một vị trí gắn kết

đối với epitop thứ hai và một vị trí gắn kết đối với epitop thứ ba (như mô tả trên Fig. 5). Cấu trúc chung của chuỗi polypeptit của diabody có chứa-miền Fc năm-chuỗi đại diện của sáng chế được đề xuất trong Bảng 3:

Bảng 3		
Hai đặc hiệu (2x2)	chuỗi thứ hai	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH
	chuỗi thứ năm	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ tư	NH_2-VL2-VH2-HPD-COOH
Hai đặc hiệu (3x1)	chuỗi thứ hai	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	chuỗi thứ năm	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ tư	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
Ba đặc hiệu (2x1x1)	chuỗi thứ hai	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH
	chuỗi thứ năm	NH_2-VL1-CL-COOH
	chuỗi thứ tư	NH_2-VL3-VH2-HPD-COOH

HPD = Miền thúc đẩy-dị dime

Theo phương án cụ thể, diabody của sáng chế là diabody có chứa-Fc hai đặc hiệu, hoá trị bốn (nghĩa là, có bốn vị trí gắn kết-epitop), mà gồm có tổng cộng năm chuỗi polypeptit có hai vị trí gắn kết epitop đặc hiệu miễn dịch đối với B7-H3 (mà có khả năng gắn kết với cùng một epitop của B7-H3 hoặc các epitop khác nhau của B7-H3) và hai vị trí gắn kết epitop đặc hiệu đối với phân tử thứ hai (mà có khả năng gắn kết với cùng một epitop của phân tử thứ hai hoặc các epitop khác nhau của phân tử thứ hai). Theo một phương án khác, diabody có chứa-Fc, hoá trị bốn, hai đặc hiệu của sáng chế bao gồm ba vị trí gắn kết-epitop đặc hiệu miễn dịch đối với B7-H3 (mà có khả năng gắn kết với epitop giống nhau của B7-H3 hoặc với hai hoặc ba epitop

khác nhau của B7-H3), và một vị trí gắn kết-epitop đặc hiệu đối với phân tử thứ hai. Theo một phương án khác, diabody có chứa-Fc, hoá trị bốn, hai đặc hiệu của sáng chế bao gồm một vị trí gắn kết-epitop đặc hiệu miễn dịch đối với B7-H3, và ba vị trí gắn kết-epitop đặc hiệu đối với phân tử thứ hai (mà có khả năng gắn kết với cùng một epitop của phân tử thứ hai hoặc với hai hoặc ba epitop khác nhau của phân tử thứ hai). Như đề xuất ở trên, các miền VL và VH có thể được chọn để cho phép gắn kết ba đặc hiệu. Do đó, sáng chế cũng bao gồm diabody có chứa-Fc, hoá trị bốn, ba đặc hiệu. Diabody có chứa-Fc, hoá trị bốn, ba đặc hiệu của sáng chế bao gồm hai vị trí gắn kết-epitop đặc hiệu miễn dịch đối với B7-H3, một vị trí gắn kết-epitop đặc hiệu miễn dịch đối với phân tử thứ hai, và một vị trí gắn kết-epitop đặc hiệu miễn dịch đối với phân tử thứ ba. Theo các phương án nhất định, phân tử thứ hai là phân tử (ví dụ, CD2, CD3, CD8, CD16, thụ thể tế bào T (TCR), NKG2D, v.v..) có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng, như lympho bào T, tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc tế bào đơn nhân khác. Theo các phương án nhất định, phân tử thứ hai là CD3 và phân tử thứ ba là CD8.

D. Các phân tử gắn kết hoá trị ba có chứa các miền Fc

Một phương án khác của sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm miền Fc, và có khả năng gắn kết đồng thời với epitop thứ nhất, epitop thứ hai và epitop thứ ba, trong đó ít nhất một trong số các epitop này không giống nhau. Các phân tử gắn kết hoá trị ba này bao gồm 3 vị trí gắn kết-epitop, 2 trong số 3 vị trí này là các miền gắn kết kiểu-diabody, mà cung cấp vị trí gắn kết A và vị trí gắn kết B, và một trong số các miền này là miền gắn kết kiểu-Fab hoặc miền gắn kết kiểu-scFv, mà cung cấp vị trí gắn kết C (xem, ví dụ, Fig. 6A- Fig. 6F, và Đơn PCT số: PCT/US15/33081; và PCT/US15/33076). Các phân tử gắn kết hoá trị ba này do đó bao gồm các miền "VL1" / "VH1" mà có khả năng gắn kết với epitop thứ nhất, các miền "VL2" / "VH2" mà có khả năng gắn kết với epitop thứ hai và các miền "VL3" / "VH3" mà có khả năng gắn kết với epitop thứ ba của phân tử gắn kết hoá trị ba này. "Miền gắn kết kiểu-diabody" là loại vị trí gắn kết-epitop có mặt trong diabody, và đặc biệt là, diabody DART®, như được mô tả ở trên. Mỗi miền trong số "miền gắn kết kiểu-Fab" và "miền gắn kết kiểu-scFv" là các vị trí gắn kết-epitop mà được tạo thành bằng tương tác giữa miền VL của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch và miền VH

bổ trợ của chuỗi nặng globulin miễn dịch. Các miền gắn kết kiểu-Fab khác biệt với các miền gắn kết kiểu-diabody ở chỗ hai chuỗi polypeptit mà tạo thành miền gắn kết kiểu-Fab chỉ bao gồm một vị trí gắn kết-epitop duy nhất, trong khi đó hai chuỗi polypeptit mà tạo thành miền gắn kết kiểu-diabody bao gồm ít nhất hai vị trí gắn kết-epitop. Tương tự, các miền gắn kết kiểu-scFv cũng khác biệt với các miền gắn kết kiểu-diabody ở chỗ chúng chỉ bao gồm một vị trí gắn kết-epitop duy nhất. Do đó, như được sử dụng trong bản mô tả này, các miền gắn kết kiểu-Fab và kiểu-scFv là khác biệt với các miền gắn kết kiểu-diabody.

Thông thường, các phân tử gắn kết hoá trị ba của sáng chế bao gồm bốn chuỗi polypeptit khác nhau (xem Fig. 6A-Fig. 6B), tuy nhiên, các phân tử này có thể bao gồm số chuỗi polypeptit ít hơn hoặc nhiều hơn, ví dụ bằng cách dung hợp chuỗi polypeptit này với nhau (ví dụ, thông qua liên kết peptit) hoặc bằng cách phân chia chuỗi polypeptit này để tạo thành chuỗi polypeptit bổ sung, hoặc bằng cách kết hợp ít đi hoặc thêm chuỗi polypeptit bổ sung thông qua các liên kết disulfua. Fig. 6C-Fig. 6F minh họa khía cạnh này của sáng chế bằng cách mô tả lược đồ các phân tử này có ba chuỗi polypeptit. Như đề xuất trên Fig. 6A-Fig. 6F, các phân tử gắn kết hoá trị ba của sáng chế có thể có các hướng khác, trong đó các miền gắn kết kiểu-diabody là đầu tận cùng-N (Fig. 6A, Fig. 6C và Fig. 6D) hoặc đầu tận cùng-C (Fig. 6B, Fig. 6E và Fig. 6F) so với miền Fc.

Theo các phương án nhất định, chuỗi polypeptit thứ nhất của các phân tử gắn kết hoá trị ba này của sáng chế có chứa: (i) miền có chứa-VL1, (ii) miền có chứa-VH2, (iii) miền thúc đẩy-dị dime, và (iv) miền có chứa trình tự CH2-CH3. Các miền VL1 và VL2 nằm ở đầu tận cùng-N hoặc đầu tận cùng-C so với miền có chứa-CH2-CH3 được trình bày trong Bảng 3 (xem Fig. 6A và Fig. 6B). Chuỗi polypeptit thứ hai của các phương án này có chứa: (i) miền có chứa-VL2, (ii) miền có chứa-VH1, và (iii) miền thúc đẩy-dị dime. Chuỗi polypeptit thứ ba của các phương án này có chứa: (i) miền có chứa-VH3, (ii) miền có chứa-CH1 và (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3. Chuỗi polypeptit thứ ba có thể là chuỗi nặng của kháng thể có chứa VH3 và vùng ổn định chuỗi nặng, hoặc polypeptit có chứa các miền này. Polypeptit thứ tư của các phương án này có chứa: (i) miền có chứa-VL3 và (ii) miền có chứa-CL. Chuỗi polypeptit thứ tư có thể là chuỗi nhẹ của kháng thể có chứa VL3 bổ trợ cho

VH3 của chuỗi polypeptit thứ ba, hoặc polypeptit có chứa các miền này. Chuỗi polypeptit thứ ba hoặc thứ tư có thể được phân lập từ các kháng thể có trong tự nhiên. Theo cách khác, các chuỗi này có thể được tạo cấu trúc theo cách tái tổ hợp, tổng hợp hoặc theo cách khác.

Miền thay đổi chuỗi nhẹ của các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai được tách khỏi các miền thay đổi chuỗi nặng của chuỗi polypeptit này bằng peptit đệm can thiệp có độ dài quá ngắn để cho phép các miền VL1/VH2 của chúng (hoặc VL2/VH1 của chúng) kết hợp với nhau để tạo thành vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết với epitop thứ nhất hoặc epitop thứ hai. Peptit đệm can thiệp (Liên kết 1) được ưu tiên cho mục đích này có trình tự (SEQ ID NO:32): GGGSGGGG. Các miền khác của các phân tử gắn kết hoá trị ba có thể được tách riêng bằng một hoặc nhiều peptit đệm can thiệp (các liên kết), tùy ý bao gồm gốc xystein. Cụ thể là, như đề xuất ở trên, các liên kết này thông thường sẽ được kết hợp giữa các miền thay đổi (nghĩa là, VH hoặc VL) và các miền thúc đẩy-dị dime peptit (ví dụ, cuộn-E hoặc cuộn-K) và giữa các miền thúc đẩy-dị dime peptit này (ví dụ, cuộn-E hoặc cuộn-K) và các miền CH2-CH3. Các liên kết ví dụ hữu ích để tạo ra các phân tử gắn kết hoá trị ba được đề xuất ở trên và cũng được đề xuất trong các Đơn PCT số: PCT/US15/33081; và PCT/US15/33076. Do đó, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai của các phân tử gắn kết hoá trị ba này kết hợp với nhau để tạo thành vị trí gắn kết VL1/VH1 có khả năng gắn kết epitop thứ nhất, cũng như vị trí gắn kết VL2/VH2 mà có khả năng gắn kết với epitop thứ hai. Chuỗi polypeptit thứ ba và thứ tư của các phân tử gắn kết hoá trị ba này kết hợp với nhau để tạo thành vị trí gắn kết VL3/VH3 mà có khả năng gắn kết với epitop thứ ba.

Như được mô tả ở trên, các phân tử gắn kết hoá trị ba của sáng chế có thể bao gồm ba polypeptit. Các phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm ba chuỗi polypeptit có thể thu được bằng cách liên kết các miền của đầu tận cùng-N của polypeptit thứ tư với miền có chứa-VH3 của polypeptit thứ ba (ví dụ, bằng cách sử dụng peptit đệm can thiệp (Liên kết 4)). Theo cách khác, chuỗi polypeptit thứ ba của phân tử gắn kết hoá trị ba của sáng chế có chứa các miền sau đây được sử dụng: (i) miền có chứa-VL3, (ii) miền có chứa-VH3, và (iii) miền có chứa trình tự CH2-CH3, trong đó VL3 và VH3 ở cách xa nhau do peptit đệm can thiệp mà đủ dài (ít nhất là 9 gốc axit amin

hoặc nhiều hơn) sao cho cho phép kết hợp các miền này để tạo thành vị trí gắn kết-epitop. Một peptit đệm can thiệp được ưu tiên cho mục đích này có trình tự: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:59).

Nên hiểu là các miền VL1/VH1, VL2/VH2, và VL3/VH3 của các phân tử gắn kết hoá trị ba này có thể khác nhau để cho phép việc gắn kết là đơn đặc hiệu, hai đặc hiệu hoặc ba đặc hiệu. Cụ thể là, các miền VL và VH có thể được chọn sao cho phân tử gắn kết hoá trị ba bao gồm 2 vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất và 1 vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai, hoặc 1 vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất và 2 vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai, hoặc 1 vị trí gắn kết đối với epitop thứ nhất, 1 vị trí gắn kết đối với epitop thứ hai và 1 vị trí gắn kết đối với epitop thứ ba.

Tuy nhiên, như đề xuất trong bản mô tả này, các miền này ưu tiên được chọn sao cho gắn kết epitop của B7-H3, epitop của phân tử thứ hai, và epitop của phân tử thứ ba. Theo các phương án nhất định, phân tử thứ hai là phân tử (ví dụ, CD2, CD3, CD8, CD16, thụ thể tế bào T (TCR), NKG2D, v.v..) có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng, như lympho bào T, tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc tế bào đơn nhân khác. Theo các phương án nhất định, phân tử thứ ba là CD8.

Cấu trúc chung của các chuỗi polypeptit của các phân tử gắn kết hoá trị ba đại diện của sáng chế được đề xuất trên các Fig. 6A-Fig. 6F và trong Bảng 4:

Bảng 4		
Bốn chuỗi hướng thứ nhất	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ hai	NH_2-VL3-CL-COOH
Bốn chuỗi hướng thứ hai	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ hai	NH_2-VL3-CL-COOH

Bảng 4		
Ba chuỗi hướng thứ nhất	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
Ba chuỗi hướng thứ hai	chuỗi thứ hai	NH_2-VL2-VH1-HPD-COOH
	chuỗi thứ nhất	NH_2-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	chuỗi thứ ba	NH_2-VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH

HPD = Miền thúc đẩy-dị dime

Một phương án của sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết hoá trị ba mà bao gồm 2 vị trí gắn kết-epitop đối với B7-H3 và 1 vị trí gắn kết-epitop đối với phân tử thứ hai. 2 vị trí gắn kết-epitop đối với B7-H3 có thể gắn kết cùng một epitop hoặc các epitop khác nhau. Một phương án khác của sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết hoá trị ba mà bao gồm, 1 vị trí gắn kết-epitop đối với B7-H3 và 2 vị trí gắn kết-epitop đối với phân tử thứ hai. 2 vị trí gắn kết-epitop đối với phân tử thứ hai có thể gắn kết cùng một epitop hoặc các epitop khác nhau của phân tử thứ hai. Một phương án khác của sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết hoá trị ba ba đặc hiệu mà bao gồm, 1 vị trí gắn kết-epitop đối với B7-H3, 1 vị trí gắn kết-epitop đối với phân tử thứ hai, và 1 vị trí gắn kết-epitop đối với phân tử thứ ba. Theo các phương án nhất định, phân tử thứ hai là phân tử (ví dụ, CD2, CD3, CD8, CD16, thụ thể tế bào T (TCR), NKG2D, v.v.) có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng, như lympho bào T, tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc tế bào đơn nhân khác. Theo các phương án nhất định, phân tử thứ hai là CD3 và phân tử thứ ba là CD8. Như đề xuất ở trên, các phân tử gắn kết hoá trị ba này có thể bao gồm 3, 4, 5 hoặc nhiều chuỗi polypeptit.

VII. Cải biến miền Fc

Miền Fc của các phân tử có chứa-miền Fc (ví dụ, các kháng thể, diabody, và các phân tử gắn kết hoá trị ba, v.v.) của sáng chế có thể là miền Fc toàn vẹn (ví dụ, miền Fc toàn vẹn của IgG) hoặc chỉ một đoạn của miền Fc. Tùy ý, miền Fc của các phân tử có chứa-miền Fc của sáng chế thiếu gốc axit amin lysin đầu tận cùng-C.

Trong chức năng miễn dịch truyền thống, tương tác của các phức hợp kháng thể-kháng nguyên với các tế bào của hệ miễn dịch dẫn đến một loạt các đáp ứng, từ

các chức năng hiệu ứng như độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể, khử hạt tế bào mast, và thực bào cho đến các tín hiệu điều biến miễn dịch như tăng sinh lympho bào điều tiết và bài tiết kháng thể. Tất cả các tương tác này bắt đầu thông qua gắn kết của miền Fc của các kháng thể hoặc các phức hợp miễn dịch với các thụ thể bề mặt tế bào chuyên biệt trên các tế bào tạo máu. Tính đa dạng của các đáp ứng tế bào khơi mào bởi các kháng thể và các phức hợp miễn dịch là do tính không đồng nhất về cấu trúc của ba thụ thể Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), và FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) và FcγRIII (CD16) là các thụ thể kích hoạt (nghĩa là, tăng cường hệ miễn dịch); FcγRIIB (CD32B) là thụ thể ức chế (nghĩa là, dập tắt hệ miễn dịch). Ngoài ra, tương tác với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) điều tiết việc tái sinh các phân tử IgG từ thể trong nhân đơn bào đến bề mặt tế bào và giải phóng vào máu. Trình tự axit amin của IgG1 (SEQ ID NO:12), IgG2 (SEQ ID NO:13), IgG3 (SEQ ID NO:14), và IgG4 (SEQ ID NO:15) kiểu hoang ví dụ được trình bày ở trên.

Cải biến miền Fc có thể dẫn đến kiểu hình thay đổi, ví dụ thời gian bán thải huyết thanh thay đổi, độ ổn định thay đổi, độ nhạy với các enzym tế bào thay đổi hoặc chức năng hiệu ứng thay đổi. Có thể mong muốn cải biến các phân tử gắn kết-B7-H3 có chứa miền Fc của sáng chế đối với chức năng hiệu ứng, ví dụ, để tăng cường hiệu lực của phân tử trong điều trị bệnh ung thư. Giảm thiểu hoặc loại bỏ chức năng hiệu ứng là mong muốn trong một số trường hợp nhất định, ví dụ trong trường hợp các kháng thể mà cơ chế tác dụng của nó là phong bế hoặc đối kháng, nhưng không phải là tiêu diệt các tế bào mang kháng nguyên đích. Nói chung mong muốn có chức năng hiệu ứng gia tăng khi nhắm đến các tế bào không mong muốn, như các tế bào khối u và tế bào lạ, trong đó các FcγR được biểu hiện ở các mức thấp, ví dụ, các tế bào B đặc hiệu-khối u với các mức FcγRIIB thấp (ví dụ, u bạch huyết không phải-Hodgkins, CLL, và u bạch huyết Burkitt). Các phân tử của sáng chế được mang lại hoặc thay đổi hoạt tính chức năng hiệu ứng là hữu ích để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh, rối loạn hoặc bệnh nhiễm khuẩn, trong đó mong muốn có hiệu lực tăng cường của hoạt tính chức năng hiệu ứng.

Do đó, theo các phương án nhất định, miền Fc của các phân tử có chứa-miền Fc của sáng chế có thể là miền Fc biến thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền. Mặc dù miền Fc của các phân tử có chứa-miền Fc hai đặc hiệu của sáng chế có thể có khả

năng gắn kết với một hoặc nhiều thụ thể Fc (ví dụ, (các) FcγR), ưu tiên là miền Fc biến thể này có khả năng gắn kết với FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) hoặc FcγRIIIB (CD16b) thay đổi (so với khả năng gắn kết được thể hiện bởi miền Fc kiểu hoang), ví dụ, sẽ có khả năng gắn kết tăng cường với thụ thể kích hoạt và/hoặc sẽ có khả năng gắn kết về cơ bản giảm đi hoặc không có khả năng gắn kết với (các) thụ thể ức chế. Do đó, miền Fc của các phân tử có chứa-miền Fc của sáng chế có thể bao gồm một số hoặc tất cả miền CH2 và/hoặc một số hoặc tất cả miền CH3 của miền Fc toàn vẹn, hoặc có thể bao gồm trình tự CH2 biến thể và/hoặc trình tự CH3 biến thể (mà có thể bao gồm, ví dụ, một hoặc nhiều cài xen và/hoặc một hoặc nhiều khuyết đoạn đối với các miền CH2 hoặc CH3 của miền Fc toàn vẹn). Các miền Fc này có thể bao gồm các đoạn polypeptit không phải là-Fc, hoặc có thể bao gồm các đoạn miền Fc toàn vẹn không có trong tự nhiên, hoặc có thể bao gồm các hướng không-có trong tự nhiên của các miền CH2 và/hoặc CH3 (như, ví dụ, hai miền CH2 hoặc hai miền CH3, hoặc theo hướng từ đầu tận cùng-N đến đầu tận cùng-C, miền CH3 được liên kết với miền CH2, *v.v.*).

Các cải biến miền Fc được nhận diện là làm thay đổi chức năng hiệu ứng là đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các cải biến làm gia tăng khả năng gắn kết với các thụ thể kích hoạt (ví dụ, FcγRIIA (CD16A) và giảm thiểu khả năng gắn kết với các thụ thể ức chế (ví dụ, FcγRIIB (CD32B) (xem, ví dụ, "*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro and Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcgamma Receptors*," Cancer Res. 57(18):8882-8890, (2007) của Stavenhagen, J.B. *et al.*). Bảng 5 liệt kê các thay thế một vị trí duy nhất, thay thế hai vị trí, thay thế ba vị trí, thay thế bốn vị trí và thay thế năm vị trí (cách đánh số và các thay thế là so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12) của cải biến ví dụ mà gia tăng khả năng gắn kết với các thụ thể kích hoạt và/hoặc giảm thiểu khả năng gắn kết với các thụ thể ức chế.

Bảng 5 **Các biến đổi của các miền Fc kích hoạt được ưu tiên**			
Các biến đổi một vị trí duy nhất			
F243L	R292G	D270E	R292P

Bảng 5 Các biến đổi của các miền Fc kích hoạt được ưu tiên			
Y300L	P396L		
Các biến đổi hai vị trí			
F243L và R292P	F243L và Y300L	F243L và P396L	R292P và Y300L
D270E và P396L	R292P và V305I	P396L và Q419H	P247L và N421K
R292P và P396L	Y300L và P396L	R255L và P396L	R292P và P305I
K392T và P396L			
Các biến đổi ba vị trí			
F243L, P247L và N421K		P247L, D270E và N421K	
F243L, R292P và Y300L		R255L, D270E và P396L	
F243L, R292P và V305I		D270E, G316D và R416G	
F243L, R292P và P396L		D270E, K392T và P396L	
F243L, Y300L và P396L		D270E, P396L và Q419H	
V284M, R292L và K370N		R292P, Y300L và P396L	
Các biến đổi bốn vị trí			
L234F, F243L, R292P và Y300L		F243L, P247L, D270E và N421K	
L234F, F243L, R292P và Y300L		F243L, R255L, D270E và P396L	
L235I, F243L, R292P và Y300L		F243L, D270E, G316D và R416G	
L235Q, F243L, R292P và Y300L		F243L, D270E, K392T và P396L	
P247L, D270E, Y300L và N421K		F243L, R292P, Y300L, và P396L	
R255L, D270E, R292G và P396L		F243L, R292P, V305I và P396L	
R255L, D270E, Y300L và P396L		F243L, D270E, P396L và Q419H	
D270E, G316D, P396L và R416G			
Các biến đổi năm vị trí			
L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L		F243L, R292P, V305I, Y300L và P396L	
L235P, F243L, R292P, Y300L và P396L			

Các biến thể ví dụ của các miền Fc của IgG1 của người với khả năng gắn kết giảm thiểu với CD32B và/hoặc khả năng gắn kết gia tăng với CD16A có chứa các thay thế F243L, R292P, Y300L, V305I hoặc P296L. Các thay thế axit amin này có thể có mặt trong miền Fc của IgG1 của người theo tổ hợp bất kỳ. Theo một phương

án, biến thể miền Fc của IgG1 của người có chứa thay thế F243L, R292P và Y300L. Theo một phương án khác, biến thể miền Fc của IgG1 của người có chứa các thay thế F243L, R292P, Y300L, V305I và P296L.

Theo các phương án nhất định, ưu tiên các miền Fc của các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế thể hiện khả năng gắn kết giảm đi (hoặc về cơ bản hầu như không có) đối với FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) hoặc FcγRIIIB (CD16b) (so với khả năng gắn kết được thể hiện bởi miền Fc của IgG1 kiểu hoang (SEQ ID NO:12). Theo phương án cụ thể, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế bao gồm miền Fc của IgG mà thể hiện chức năng hiệu ứng ADCC giảm đi. Theo phương án được ưu tiên, miền CH2-CH3 của các phân tử gắn kết-B7-H3 này bao gồm 1, 2, 3 hoặc 4 thay thế bất kỳ trong số các thay thế: L234A, L235A, D265A, N297Q, và N297G. Theo một phương án khác, các miền CH2-CH3 có chứa thay thế N297Q, thay thế N297G, các thay thế L234A và L235A hoặc thay thế D265A thay thế, vì các đột biến này làm mất khả năng gắn kết FcR. Theo cách khác, miền CH2-CH3 của miền Fc có trong tự nhiên mà vốn đã thể hiện (hoặc về cơ bản hầu như không có) khả năng gắn kết giảm đi với FcγRIIIA (CD16a) và/hoặc chức năng hiệu ứng giảm đi (so với khả năng gắn kết và chức năng hiệu ứng được thể hiện bởi miền Fc của IgG1 kiểu hoang (SEQ ID NO:12) được sử dụng. Theo phương án cụ thể, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế bao gồm miền Fc của IgG2 (SEQ ID NO:13) hoặc miền Fc của IgG4 (SEQ ID:NO:4). Khi sử dụng miền Fc của IgG4, sáng chế cũng bao gồm đưa đột biến làm ổn định, như thay thế vùng bản lề S228P nêu trên (xem, ví dụ, SEQ ID NO:11). Do các thay thế N297G, N297Q, L234A, L235A và D265A làm mất chức năng hiệu ứng, trong các trường hợp trong đó mong muốn có chức năng hiệu ứng, tốt hơn là không sử dụng các thay thế này.

Trình tự IgG1 được ưu tiên đối với các miền CH2 và CH3 của các phân tử có chứa-miền Fc của sáng chế có chức năng hiệu ứng giảm đi hoặc bị mất chức năng hiệu ứng bao gồm các thay thế L234A/L235A (SEQ ID NO:60):

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTOKS LSLSPGX
```

trong đó X là lysin (K) hoặc là không có.

Thời gian bán thải huyết thanh của các protein bao gồm các miền Fc có thể được gia tăng bằng cách làm tăng ái lực gắn kết của miền Fc đối với FcRn. Thuật ngữ "thời gian bán thải" như được sử dụng trong bản mô tả này nghĩa là tính chất dược động học của phân tử mà là chỉ số đo thời gian tồn tại trung bình của phân tử đó sau khi sử dụng. Thời gian bán thải có thể được biểu thị theo thời gian cần thiết để thải trừ năm mươi phần trăm (50%) một lượng đã biết của phân tử này từ cơ thể của một đối tượng (ví dụ, bệnh nhân hoặc động vật có vú khác) hoặc khoang cụ thể của đối tượng này, ví dụ, như được đo trong huyết thanh, nghĩa là, thời gian bán thải trong máu, hoặc các mô khác. Nói chung, gia tăng thời gian bán thải dẫn đến gia tăng thời gian tồn lưu trung bình (MRT) trong máu đối với phân tử đã sử dụng.

Theo một số phương án, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế bao gồm miền Fc biến thể, trong đó miền Fc biến thể này bao gồm ít nhất một cải biến axit amin so với miền Fc kiểu hoang, sao cho phân tử này có thời gian bán thải gia tăng (so với phân tử bao gồm miền Fc kiểu hoang). Theo một số phương án, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế bao gồm miền Fc của IgG biến thể, trong đó miền Fc biến thể này bao gồm thay thế axit amin kéo dài thời gian bán thải ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435, và 436. Nhiều đột biến có khả năng làm tăng thời gian bán thải của phân tử có chứa-miền Fc đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ M252Y, S254T, T256E, và tổ hợp của chúng. Ví dụ, xem các đột biến được mô tả trong các Patent Mỹ số 6,277,375, 7,083,784; 7,217,797, 8,088,376; Các Công bố Patent Mỹ số 2002/0147311; 2007/0148164; và các Công bố đơn PCT số WO 98/23289; WO 2009/058492; và WO 2010/033279, được viện dẫn toàn bộ ở đây để tham khảo. Các phân tử gắn kết-B7-H3 với thời gian bán thải tăng cường cũng bao gồm các phân tử có các miền Fc biến thể bao gồm các thay thế ở hai hoặc nhiều gốc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 và 436 của miền Fc. Cụ thể là, hai hoặc nhiều thay thế được chọn từ: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K, và Y436I.

Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế có miền Fc của IgG biến thể bao gồm các thay thế:

(A) M252Y, S254T và T256E;

(B) M252Y và S254T;

(C) M252Y và T256E;

(D) T250Q và M428L;

(E) T307Q và N434A;

(F) A378V và N434A;

(G) N434A và Y436I;

(H) V308P và N434A; hoặc

(I) K288D và H435K.

Theo phương án được ưu tiên, phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế có miền Fc của IgG biến thể bao gồm 1, 2, hoặc 3 thay thế bất kỳ trong số các thay thế: M252Y, S254T và T256E. Sáng chế còn bao gồm các phân tử gắn kết-B7-H3 có các miền Fc biến thể bao gồm:

(A) một hoặc nhiều đột biến mà làm thay đổi chức năng hiệu ứng và/hoặc FcγR; và

(B) một hoặc nhiều đột biến mà kéo dài thời gian bán thải huyết thanh.

Đối với các kháng thể, các diabody và các phân tử gắn kết hoá trị ba mà các chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ ba có chứa miền Fc của chúng là không tương đồng, sẽ mong muốn giảm thiểu hoặc ngăn ngừa quá trình homodime hoá diễn ra giữa các miền CH2-CH3 của hai chuỗi polypeptit thứ nhất hoặc giữa các miền CH2-CH3 của hai chuỗi polypeptit thứ ba. Các miền CH2 và/hoặc CH3 của chuỗi polypeptit này không nhất thiết tương đồng về trình tự, và có lợi là được cải biến để hỗ trợ tạo phức giữa hai chuỗi polypeptit. Ví dụ, thay thế axit amin (tốt hơn là thay thế bằng axit amin bao gồm mạch bên cồng kềnh tạo thành "nốt phồng", ví dụ, tryptophan) có thể được đưa vào miền CH2 hoặc CH3 sao cho cản trở không gian sẽ ngăn không cho tương tác với miền bị đột biến tương tự và sẽ bắt buộc miền bị đột biến này ghép cặp với miền mà đột biến bổ trợ, hoặc đột biến phù hợp đã được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền vào trong miền này, nghĩa là, "lỗ" (ví dụ, thay thế glyxin). Bộ các đột biến này có thể

được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền ở cặp bất kỳ trong số các polypeptit bao gồm các miền CH2-CH3 tạo thành miền Fc để nuôi dưỡng dị dime hoá. Các phương pháp tạo protein bằng kỹ thuật di truyền ưu tiên dị dime hoá hơn homodime hoá là đã biết trong lĩnh vực này, cụ thể là đối với tạo bằng kỹ thuật di truyền các phân tử tương tự-globulin miễn dịch, và được bao hàm trong bản mô tả này (xem ví dụ, *"'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,"* Protein Engr. 9:617-621, (1996) của Ridgway *et al.*; *"Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,"* J. Mol. Biol. 270: 26-35, (1997) của Atwell *et al.*; và *"A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression and Tumor Cell Lysis,"* J. Immunol. Methods 296:95-101, (2005) của Xie *et al.*; được viện dẫn toàn bộ ở đây để tham khảo).

Nốt phồng được ưu tiên được tạo ra bằng cách cải biến miền Fc của IgG để có chứa cải biến T366W. Lỗ được ưu tiên được tạo ra bằng cách cải biến miền Fc của IgG để có chứa cải biến T366S, L368A và Y407V. Để hỗ trợ tinh chế homodime chuỗi polypeptit thứ ba mang-lỗ từ phân tử có chứa-miền-Fc dị dime hai đặc hiệu cuối cùng, vị trí gắn kết protein A của các miền CH2 và CH3 mang lỗ của chuỗi polypeptit thứ ba tốt hơn là được đột biến bằng cách thay thế axit amin ở vị trí 435 (H435R). Do đó, homodime chuỗi polypeptit thứ ba mang-lỗ sẽ không gắn kết protein A, trong khi đó dị dime hai đặc hiệu sẽ vẫn giữ được khả năng gắn kết protein A của nó thông qua vị trí gắn kết protein A trên chuỗi polypeptit thứ nhất. Theo một phương án khác, chuỗi polypeptit thứ ba mang-lỗ có thể kết hợp các thay thế axit amin ở các vị trí 434 và 435 (N434A/N435K).

Trình tự axit amin IgG1 được ưu tiên cho các miền CH2 và CH3 của chuỗi polypeptit thứ nhất của phân tử có chứa-miền Fc của sáng chế sẽ có trình tự "mang-nốt phồng" (SEQ ID NO:61):

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

trong đó X là lysin (K) hoặc là không có.

Trình tự axit amin IgG được ưu tiên cho các miền CH2 và CH3 của chuỗi polypeptit thứ hai của phân tử có chứa-miền Fc của sáng chế có hai chuỗi polypeptit (hoặc chuỗi polypeptit thứ ba của phân tử có chứa-miền Fc có ba, bốn, hoặc năm chuỗi polypeptit) sẽ có trình tự "mang-lỗ" (SEQ ID NO:62):

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS LSLSPGX
```

trong đó X là lysin (K) hoặc là không có.

Lưu ý là các miền CH2-CH3 của SEQ ID NO:61, và SEQ ID NO:62 bao gồm thay thế ở vị trí 234 bằng alanin và 235 bằng alanin, và do đó tạo thành miền Fc thể hiện khả năng gắn kết giảm đi (hoặc về cơ bản hầu như không có) với FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) hoặc FcγRIIIB (CD16b) (so với khả năng gắn kết được thể hiện bởi miền Fc kiểu hoang (SEQ ID NO:12). Sáng chế cũng bao gồm các miền CH2-CH3 này mà bao gồm các gốc alanin kiểu hoang, các thay thế khác và/hoặc thay thế bổ sung mà cải biến chức năng hiệu ứng và/hoặc hoạt tính gắn kết FγR của miền Fc. Sáng chế cũng bao gồm các miền CH2-CH3 này, còn bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin kéo dài thời gian bán thải. Cụ thể là, sáng chế bao gồm các miền CH2-CH3 mang-lỗ và mang-nốt phồng mà còn bao gồm M252Y/S254T/T256E.

Ưu tiên là chuỗi polypeptit thứ nhất sẽ có trình tự CH2-CH3 "mang-nốt phồng", như trình tự của SEQ ID NO:61. Tuy nhiên, thừa nhận là miền CH2-CH3 "mang-lỗ" (ví dụ, SEQ ID NO:62) có thể được sử dụng trong chuỗi polypeptit thứ nhất, trong trường hợp này, miền CH2-CH3 "mang-nốt phồng" (ví dụ, SEQ ID NO:61) sẽ được sử dụng trong chuỗi polypeptit thứ hai của phân tử có chứa miền Fc của sáng chế có hai chuỗi polypeptit (hoặc trong chuỗi polypeptit thứ ba của phân tử có chứa miền Fc có ba, bốn, hoặc năm chuỗi polypeptit).

Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm các phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm các miền CH2 và/hoặc CH3 đã được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để ưu tiên dị dime hoá hơn là homodime hoá bằng cách sử dụng các đột biến đã biết trong lĩnh vực này, như các đột biến được đề cập trong các Công bố đơn PCT số WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867, được viện dẫn toàn bộ ở đây để tham khảo.

VIII. Các khả năng gắn kết tế bào hiệu ứng

Như đề xuất trong bản mô tả này, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế, bao gồm các phân tử B7-H3-ADC, có thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để bao gồm tổ hợp các vị trí gắn kết-epitop mà nhận biết một bộ các kháng nguyên độc nhất với tế bào đích hoặc loại mô đích. Cụ thể là, sáng chế đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 đa đặc hiệu có khả năng gắn kết với epitop của B7-H3 và epitop của phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng, như lympho bào T, tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc tế bào đơn nhân khác. Ví dụ, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế có thể là cấu trúc để bao gồm vị trí gắn kết-epitop mà gắn kết đặc hiệu miễn dịch CD2, CD3, CD8, CD16, thụ thể tế bào T (TCR), hoặc NKG2D. Sáng chế cũng đề cập tới các phân tử gắn kết-B7-H3 ba đặc hiệu mà có khả năng gắn kết với epitop của CD3 và epitop của CD8 (xem, ví dụ, Công bố đơn PCT số WO 2015/026894).

A. Các khả năng gắn kết CD2

Theo một phương án, các phân tử gắn kết-B7-H3 hai đặc hiệu, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu của sáng chế có khả năng gắn kết với epitop của B7-H3 và epitop của CD2. CD2 là phân tử bám dính tế bào tìm thấy trên bề mặt của các tế bào T và tế bào giết tự nhiên (NK). CD2 làm tăng cường độc tính tế bào của tế bào NK, có thể là chất thúc đẩy tạo thành nanotube tế bào NK ("*Cell Biological Steps and Checkpoints in Accessing NK Cell Cytotoxicity*," Immunol. Cell. Biol. 92(3):245-255, (2014) của Mace, E.M. *et al.*; "*CD2 Promotes Human Natural Killer Cell Membrane Nanotube Formation*," PLoS One 7(10):e47664:1-12, (2012) của Comerci, C.J. *et al.*). Các phân tử gắn kết đặc hiệu CD2 bao gồm kháng thể kháng-CD2 "Lo-CD2a."

Trình tự axit amin của miền VH của Lo-CD2a (Mã số nộp lưu ATCC: 11423); SEQ ID NO:63) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EVQLQQSGPE LQRPGASVKL SCKASGYIFT **EYYMY**WVKQR PKQGLELVG**R**
IDPEDGSIDY **VEKFKK**KATL TADTSSNTAY MQLSSLTSED TATYFCAR**GK**
FNYRFAYWGQ GTLVTVSS

Trình tự axit amin của miền VL của Lo-CD2a (Mã số nộp lưu ATCC: 11423; SEQ ID NO:64) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DVVLTQTPPT LLATIGQSVS ISC**RSSQSLL** **HSSGNTYLN**W LLQRTGQSPQ
PLIY**LVSKLE** **S**GVPNRFSGS GSGTDFTLKI SGVEAEDLGV YYC**MQFTHYP**
YTFGAGTKLE LK

B. Các khả năng gắn kết CD3

Theo một phương án, các phân tử gắn kết-B7-H3 hai đặc hiệu, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu của sáng chế có khả năng gắn kết với epitop của B7-H3 và epitop của CD3. CD3 là đồng-thụ thể tế bào T gồm có bốn chuỗi phân biệt ("*Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation Of Signaling*," Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140; (2010) các trang 1-14, của Wucherpfennig, K.W. *et al.*). Ở động vật có vú, phức hợp này có chứa chuỗi CD3γ, chuỗi CD3δ, và hai chuỗi CD3ε. Các chuỗi này kết hợp với một phân tử đã biết là thụ thể tế bào T (TCR) để tạo ra tín hiệu kích hoạt ở các lympho bào T. Khi không có CD3, các TCR không lắp ghép đúng và bị phân huỷ ("*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T Cell Receptor Gene Transfer*," Immunology 129(2):170–177, (2010) của Thomas, S. *et al.*). CD3 được tìm thấy gắn kết với các màng của tất cả các tế bào T trưởng thành, và hầu như không ở loại tế bào khác (xem, In: IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE," 6th ed. Garland Science Publishing, NY, (2005), các trang 214- 216, của Janeway, C.A. *et al.*; "*Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling and Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3ε:γ Dị dimer*," Cell 105(7):913-923, (2001) của Sun, Z. J. *et al.*; "*Deconstructing The Form and Function Of The TCR/CD3 Complex*," Immunity. 2006 Feb;24(2):133-139, (2006) của Kuhns, M.S. *et al.*). Các phân tử mà gắn kết đặc hiệu CD3 bao gồm các kháng thể kháng-CD3 "CD3 mAb-1" và "OKT3." Kháng thể kháng-CD3 CD3 mAb-1 có khả năng gắn kết động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ, khỉ cynomolgus).

Trình tự axit amin của miền VH của CD3 mAb-1 VH(1) (SEQ ID NO:65) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

Trình tự axit amin của miền VH khác của CD3 mAb-1 VH(2) (SEQ ID NO:66) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân vạch đơn; các khác biệt so với miền VH của CD3 mAb-1 VH(1) (SEQ ID NO:65) được thể hiện gạch chân vạch kép).

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

Trình tự axit amin của miền VL của CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TC**RSSTGAVT TSNYAN**WVQQ KPGQAPRGLI
G**GTNKRAP**WT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC **ALWYSNLWV**F
GGGTKLTVLG

Miền VH của CD3 mAb-1 VH(1) (SEQ ID NO:65) có thể được sử dụng với miền VL của CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) để tạo thành phân tử gắn kết-CD3 hoạt động theo sáng chế. Tương tự, miền VH của CD3 mAb-1 VH(2) (SEQ ID NO:66) có thể được sử dụng với miền VL của CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) để tạo thành phân tử gắn kết-CD3 hoạt động theo sáng chế.

Như đề cập dưới đây, để minh họa sáng chế, các phân tử gắn kết-B7-H3 x CD3 hai đặc hiệu được sản xuất. Trong một số cấu trúc B7-H3 x CD3, biến thể của CD3 mAb-1 được sử dụng. Biến thể "CD3 mAb-1 (D65G)," bao gồm miền VL của CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) và miền VH CD3 mAb-1 có thay thế D65G (vị trí theo Kabat 65, tương ứng với gốc 68 của SEQ ID NO:65). Trình tự axit amin của miền VH của CD3 mAb-1 (D65G) (SEQ ID NO:68) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân, vị trí được thay thế (D65G) được thể hiện gạch chân vạch kép):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVG**R**
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

Theo cách khác, biến thể ái lực của CD3 mAb-1 có thể được kết hợp. Các biến thể bao gồm biến thể ái lực thấp được ký hiệu là "CD3 mAb-1 Low" và biến thể có tốc độ phân ly nhanh hơn được ký hiệu là "CD3 mAb-1 Fast". Miền VL của CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) là chung đối với CD3 mAb-1 Low và CD3 mAb1 Fast và được đề xuất ở trên. Trình tự axit amin của các miền VH của lần lượt CD3 mAb-1 Low và CD3 mAb-1 Fast được đề xuất dưới đây.

Trình tự axit amin của miền VH của CD3 mAb-1 Low kháng-người (SEQ ID NO:69) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân; các khác biệt so với miền VH của CD3 mAb-1 VH(1) (SEQ ID NO:65) được thể hiện gạch chân vạch kép):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVG**R**
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYV*T* WFAYWGQGTL VTVSS

Trình tự axit amin của miền chuỗi VH CD3 mAb-1 Fast kháng-người (SEQ ID NO:70) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân; các khác biệt so với miền VH của CD3 mAb-1 VH(1) (SEQ ID NO:65) được thể hiện gạch chân vạch kép):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS TYAMN**WVRQA PGKGLEWVG**R**
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
H*K*NFGNSYV*T* WFAYWGQGTL VTVSS

Kháng thể kháng-CD3 khác, mà có thể được sử dụng là kháng thể Muromonab-CD3 "OKT3" (*"In Vitro Characterization Of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies,"* Cell. Immunol. 200:16-26, (2000) của Xu *et al.*); "*Mechanisms Of Action and Overview Of OKT3*," Ther. Drug Monit. 17(6):615-620, (1995) của Norman, D.J.; "*Monoclonal Antilymphocyte Antibody (OKT3) Treatment Of Acute Renal Allograft Rejection*," Pharmacotherapy 7(4):121-124, (1987) của Canafax, D.M. *et al.*; "*OKT3 Monoclonal Antibodies Induce Interleukin-6 và Interleukin-10: A Possible Cause Of Lymphoproliferative Disorders Associated*

With Transplantation," Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 2(4):670-678, (1993) của Swinnen, L.J. *et al.*).

Trình tự axit amin của miền VH của OKT3 (SEQ ID NO:71) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT **RYTMH**WVKQR PGQGLEWIG**Y**
INPSRGYTNY **NQKFKD**KATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCAR**YY**
DDHYCLDYWG QGTTLTVSS

Trình tự axit amin của miền VL của OKT3 (SEQ ID NO:72) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTC**SASSSVS** **YMN**WYQQKSG TSPKRWIY**DT**
SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYC**QQW** **SSNPFTF**GSG
TKLEINR

Các kháng thể kháng-CD3 bổ sung mà có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng thể được mô tả trong các Công bố đơn PCT số WO 2008/119566; và WO 2005/118635.

C. Các khả năng gắn kết CD8

Theo một phương án, các phân tử gắn kết-B7-H3 hai đặc hiệu, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu của sáng chế có khả năng gắn kết với epitop của B7-H3 và epitop của CD8. CD8 là đồng-thụ thể tế bào T bao gồm hai chuỗi phân biệt ("*A Structural View of CD4 and CD8*," FASEB J., 9:17-25, (1995) của Leahy, D.J.) được biểu hiện trên các tế bào T gây độc tế bào. Kích hoạt các tế bào T $CD8^+$ đã được xác định là được điều tiết thông qua các tương tác đồng-kích thích giữa kháng nguyên:phức hợp phân tử tương hợp mô chính lớp I (MHC I) mà được sắp hàng trên bề mặt của tế bào đích và phức hợp của CD8 và thụ thể tế bào T, được sắp hàng trên bề mặt của tế bào T $CD8^+$ ("*Molecular interactions of coreceptor CD8 và MHC class I: the molecular basis for functional coordination with T Cell receptor*". Immunol Today 21: 630–636, (2000) của Gao, G., và Jakobsen, B.). Khác với các phân tử MHC II, mà chỉ được biểu hiện bởi một số tế bào nhất định của hệ miễn dịch, các phân tử MHC I được biểu hiện rất rộng rãi. Do đó, các tế bào T gây độc tế bào có khả năng gắn kết với nhiều loại tế bào. Các tế bào T gây độc tế bào được kích hoạt điều tiết quá trình

tiêu diệt tế bào thông qua giải phóng các độc tố tế bào perforin, granzym, và granulysin. Các kháng thể mà gắn kết đặc hiệu CD8 bao gồm các kháng thể kháng-CD8 "OKT8" và "TRX2."

Trình tự axit amin của miền VH của OKT8 (SEQ ID NO:73) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLLESGPE LLKPGASVKM SCKASGYTFT DYNMHWVKQS HGKSLEWIGY
IYPYTGGTGY NQKFKNKATL TVDSSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARNF
RYTYWYFDVW GQGTTVTVSS

Trình tự axit amin của miền VL của OKT8 (SEQ ID NO:74) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIVMTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYDNSLMHWY QQKPGQPPKV
LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY
TFGGGTKLEI KR

Trình tự axit amin của miền VH của TRX2 (SEQ ID NO:75) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRQA PGKGLEWVAL
IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH
YDGYYHFFDS WGQGTLVTVS S

Trình tự axit amin của miền VL của TRX2 (SEQ ID NO:76) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDIN NYLAWYQQKP GKAPKLLIYN
TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG
TKVEIK

D. Các khả năng gắn kết CD16

Theo một phương án, các phân tử gắn kết-B7-H3 đa đặc hiệu của sáng chế có khả năng gắn kết với epitop của B7-H3 và epitop của CD16. CD16 là thụ thể FcγRIIIA. CD16 được biểu hiện bởi các bạch cầu trung tính, các bạch cầu ưa eosin, tế bào giết tự nhiên (NK), và các đại thực bào mô mà gắn kết IgG đã kết tập mà không phải là IgG của người monome ("*Human Fc Gamma RIII: Cloning, Expression, and Identification Of The Chromosomal Locus Of Two Fc Receptors For IgG*," Proc.

Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86(3):1013-1017, (1989) của Peltz, G.A. *et al.*; "*NK Cells In Therapy Of Cancer*," Crit. Rev. Oncog. 19(1-2):133-141, (2014) của Bachanova, V. *et al.*; "*Therapeutic Applications: Natural Killer Cells In The Clinic*," Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2013:247-253, (2013) của Miller, J.S.; "*Pathogenic Effects Of Anti-Fc Gamma Receptor IIIB (CD16) On Polymorphonuclear Neutrophils In Non-Organ-Specific Autoimmune Diseases*," Autoimmun Rev. 1(1-2):13-19, (2002) của Youinou, P. *et al.*; "*Bispecific Antibodies Targeting Cancer Cells*," Biochem. Soc. Trans. 30(4):507-511, (2002) của Peipp, M. *et al.*). Các phân tử mà gắn kết đặc hiệu CD16 bao gồm các kháng thể kháng-CD16 "3G8" và "A9." Các kháng thể A9 được làm tương thích với người được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 03/101485.

Trình tự axit amin của miền VH của 3G8 (SEQ ID NO:77) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVTLKESGPG ILQPSQTLSL TCSFSGFSLR **TSGMGVG**WIR QPSGKGLEWL
A**HIWWDDDKR** **YNPALKS**RLT ISKDTSSNQV FLKIASVDTA DTATYYCAQ**I**
NPAWFAYWGQ GTLVTVSA

Trình tự axit amin của miền VL của 3G8 (SEQ ID NO:78) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DTVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**KASQSVD** **FDGDSFMN**WY QQKPGQPPKL
LIY**TTSNLES** GIPARFSASG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YC**QQSNEDPY**
TFGGGTKLEI K

Trình tự axit amin của miền VH của A9 (SEQ ID NO:79) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLQQSGAE LVRPGTSVKI SCKASGYTFT **NYWLG**WVKQR PGHGLEWIG**D**
IYPGGGYTNY **NEKFKG**KATV TADTSSRTAY VQVRSLTSED SAVYFCAR**SA**
SWYFDVWGAR TTVTVSS

Trình tự axit amin của miền VL của A9 (SEQ ID NO:80) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

DIQAVVTQES ALTTSPGETV TLTCRSNTGT VTTSNYANWV QEKPDHLFTG
LIGHTNNRAP GVPARFSGSL IGDKAALTIT GAQTEDEAIY FCALWYNNHW
VFGGGTKLTV L

Các kháng thể kháng-CD19 bổ sung mà có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng thể được mô tả trong các Công bố đơn PCT số WO 03/101485; và WO 2006/125668.

E. Các khả năng gắn kết TCR

Theo một phương án, các phân tử gắn kết-B7-H3 hai đặc hiệu, ba đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu của sáng chế có khả năng gắn kết với epitop của B7-H3 và epitop của thụ thể tế bào T (TCR). Thụ thể tế bào T được biểu hiện nguyên thuỷ bởi các tế bào T CD4+ hoặc CD8+, và cho phép các tế bào nhận biết các peptit kháng nguyên mà được gắn kết và trình diện bởi các protein MHC lớp I hoặc lớp II của các tế bào trình diện-kháng nguyên. Nhận biết phức hợp pMHC (peptit–MHC) bởi TCR khởi đầu quá trình lan truyền đáp ứng miễn dịch tế bào mà dẫn đến sản sinh các xytokin và phân giải tế bào trình diện-kháng nguyên này (xem, ví dụ, "*Conformational Changes and Flexibility In T Cell Receptor Recognition Of Peptide–MHC Complexes*," Biochem. J. 415(Pt 2):183–196, (2008) của Armstrong, K.M. *et al.*; "*Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy*," Cytometry A. 73(11):1093-1099, (2008) của Willemsen, R.; "*Master Switches Of T-Cell Activation and Differentiation*," Eur. Respir. J. 29:804-812, (2007) của Beier, K.C. *et al.*; "*Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring and Intervention In Autoimmune Diabetes*," Am. J. Ther. 12(6):534–550, (2005) của Mallone, R. *et al.*). CD3 là thụ thể gắn kết với TCR ("*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T Cell Receptor Gene Transfer*," Immunology 129(2):170-177, (2010) của Thomas, S. *et al.*; "*Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex*," Immunol. Rev. 232(1):7-21, (2009) của Guy, C.S. *et al.*; "*Novel Targeted Therapies For Autoimmunity*," Curr. Opin. Immunol. 21(6):648-657, (Epub 2009 Oct 12) của St. Clair, E.W.; "*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy*," Cancer Res. 69(12):4941-4944, (Epub 2009 Jun 9) của Baeuerle, P.A. *et al.*; "*T Cell Activation*," Annu. Rev. Immunol. 27:591-619, (2009) của Smith-Garvin, J.E. *et al.*; "*Engineered CD3*

Antibodies For Immunosuppression," Clin. Exp. Immunol. 133(3):307-309, (2003) của Renders, L. *et al.*).

Các phân tử gắn kết đặc hiệu với thụ thể tế bào T bao gồm kháng thể kháng-TCR "BMA 031" (EP 0403156; "*BMA 031 – A TCR-Specific Monoclonal Antibody For Clinical Application*," Transplant Proc. 21(1 Pt 1):1017-1019, (1989) của Kurrle, R. *et al.*; "Fine Specificity Of A Panel Of Antibodies Against The TCR/CD3 Complex," Transplant Proc. 19(5):4270-4272, (1987) của Nashan, B. *et al.*; "Construction, Expression, and Biologic Activity Of Murine/Human Chimeric Antibodies With Specificity For The Human α/β T Cell," J. Immunol. 146(3):928-935, (1991) của Shearman, C.W. *et al.*; "*Construction, Expression and Characterization of Humanized Antibodies Directed Against The Human α/β T Cell Receptor*," J. Immunol. 147(12):4366-4373, (1991) của Shearman, C.W. *et al.*).

Trình tự axit amin của miền VH của BMA 031 (SEQ ID NO:81) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_H được thể hiện gạch chân):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYKFT **SYVMH**WVRQA PGQGLEWIG**Y**
INPYNDVTKY NEKFKGRVTI TADKSTSTAY LQMNSLRSED TAVHYCAR**GS**
YYDYDGFVYW GQGTLVTVSS

Trình tự axit amin của miền VL của BMA 031 (SEQ ID NO:82) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC**SATSSVS YMH**WYQQKPG KAPKRWIY**DT**
SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYC**QQW SSNPLT**FGQG
TKLEIK

F. Các khả năng gắn kết NKG2D

Theo một phương án, các phân tử gắn kết-B7-H3 đa đặc hiệu của sáng chế có khả năng gắn kết với epitop của B7-H3 và epitop của thụ thể NKG2D. Thụ thể NKG2D được biểu hiện trên tất cả các tế bào giết tự nhiên của người (và động vật có vú khác) ("*Activation Of NK Cells and T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA*," Science 285(5428):727-729, (1999) của Bauer, S. *et al.*; "*The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation and Natural Killing*," Immunity 17(1):19-29, (2002) của Jamieson, A.M. *et al.*) cũng như trên tất cả các tế

bào T CD8$^+$ ("*Costimulation Of CD8αβ T Cells By NKG2D Via Engagement By MIC Induced On Virus-Infected Cells*," Nat. Immunol. 2(3):255-260, (2001) của Groh, V. *et al.*; "*The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation and Natural Killing*," Immunity 17(1):19-29, (2002) của Jamieson, A.M. *et al.*). Các phối tử gắn kết này, và cụ thể là các phối tử mà không được biểu hiện trên các tế bào bình thường, bao gồm phân tử tương hợp mô 60 (H60), sản phẩm của gen-1 có thể gây cảm ứng sớm axit retinoic (RAE-1), và bản phiên mã tương tự protein gắn kết-UL16 1 (MULT1) ("*Roles Of The NKG2D Immunoreceptor and Its Ligands*," Nature Rev. Immunol. 3:781-790, (2003) của Raulet D.H.; "*Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells*," Blood 106:1711-1717, (2005) của Coudert, J.D. *et al.*). Các phân tử gắn kết đặc hiệu với thụ thể NKG2D bao gồm các kháng thể kháng-NKG2D "KYK-1.0" và "KYK-2.0" ("*Generation, Affinity Maturation, and Characterization Of A Human Anti-Human NKG2D Monoclonal Antibody With Dual Antagonistic and Agonistic Activity*," J. Mol. Biol. 384:1143-1156, (2008) của Kwong, KY *et al.*; và PCT/US09/54911).

Trình tự axit amin của miền VH của KYK-1.0 (SEQ ID NO:83) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR$_H$ được thể hiện gạch chân):

EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS **SYGMH**WVRQA PGKGLEWVA**F**
IRYDGSNKYY **ADSVKG**RFTI SRDNSKNTKY LQMNSLRAED TAVYYCAK**DR**
FGYYLDYWGQ GTLVTVSS

Trình tự axit amin của miền VL của KYK-1.0 (SEQ ID NO:84) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR$_L$ được thể hiện gạch chân):

QPVLTQPSSV SVAPGETARI PC**GGDDIETK** **SVH**WYQQKPG QAPVLVIY**DD**
DDRPSGIPER FFGSNSGNTA TLSISRVEAG DEADYYC**QVW** **DDNNDEWV**FG
GGTQLTVL

Trình tự axit amin của miền VH của KYK-2.0 (SEQ ID NO:85) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR$_H$ được thể hiện gạch chân):

QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYGMH**WVRQA PGKGLEWVA**F**
IRYDGSNKYY **ADSVKG**RFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAK**DR**
GLGDGTYFDY WGQGTTVTVS S

Trình tự axit amin của miền VL của KYK-2.0 (SEQ ID NO:86) được thể hiện dưới đây (các gốc CDR_L được thể hiện gạch chân):

QSALTQPASV SGSPGQSITI SCSGSSSNIG NNAVNWYQQL PGKAPKLLIY
YDDLLPSGVS DRFSGSKSGT SAFLAISGLQ SEDEADYYCA AWDDSLNGPV
FGGGTKLTVL

IX. Các phân tử gắn kết-B7-H3 đa đặc hiệu

A. Các diabody hai chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3

Các miền VL và VH của các phân tử gắn kết B7-H3 nêu trên có thể được sử dụng để tạo cấu trúc các diabody hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 gồm hai chuỗi polypeptit được liên kết cộng hoá trị. Để minh họa khía cạnh này của sáng chế, các miền VL và VH của kháng thể kháng-B7-H3 mAb-D nêu trên được sử dụng để tạo cấu trúc các diabody hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 gồm hai chuỗi polypeptit được liên kết cộng hoá trị và bao gồm các miền VL và VH của chuột hoặc được làm tương thích với người nêu trên của mAb-D. Cấu trúc chung và các trình tự axit amin của các diabody hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 này được đề xuất dưới đây.

Chuỗi polypeptit thứ nhất gồm một diabody hai chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 ví dụ bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng-N đến đầu tận cùng-C: đầu tận cùng-N; miền VL của kháng thể kháng-B7-H3 (ví dụ, mAb-D VL (SEQ ID NO:22), hoặc hmAb-D VL (SEQ ID NO:30); peptit đệm can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)); miền VH của kháng thể kháng-CD3 (ví dụ, CD3 mAb 1 (D65G) (SEQ ID NO:68)); peptit đệm can thiệp có chứa-xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:33)); miền thúc đẩy-dị dime (ví dụ, cuộn-E) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:45)); và đầu tận cùng-C.

Chuỗi polypeptit thứ hai của diabody hai chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 ví dụ này bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng-N đến đầu tận cùng-C: đầu tận cùng-N; miền VL của kháng thể kháng-CD3 tương ứng (ví dụ, miền VL kết hợp với miền VH của chuỗi polypeptit thứ nhất tạo thành vị trí gắn kết-CD3, ví dụ, miền VL của CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67); peptit đệm can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)); miền VH của kháng thể kháng-B7-H3 tương ứng (ví dụ, miền VH kết hợp với miền VL của chuỗi polypeptit thứ nhất tạo thành vị trí gắn kết-B7-H3, ví dụ,

mAb-D VH (SEQ ID NO:26) hoặc hmAb-D VH (SEQ ID NO:31); peptit đệm can thiệp có chứa-xystein (Liên kết 2: GGCGGG (SEQ ID NO:33)); miền thúc đẩy-dị dime (ví dụ, cuộn-K) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:46)); và đầu tận cùng-C.

Như đề xuất trong bản mô tả này, các liên kết khác và/hoặc các miền thúc đẩy-dị dime khác có thể được sử dụng để tạo ra các diabody này. Ví dụ, chuỗi polypeptit thứ nhất của diabody hai chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 khác ví dụ có thể bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng-N đến đầu tận cùng-C: đầu tận cùng-N; miền VL của kháng thể kháng-B7-H3; peptit đệm can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)); miền VH của kháng thể kháng-CD3 hoặc của kháng thể kháng-CD3 tương ứng; peptit đệm can thiệp (Liên kết 2: ASTKG (SEQ ID NO:37)); miền thúc đẩy-dị dime có chứa-xystein (ví dụ, cuộn-K) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:46)); và đầu tận cùng-C. Chuỗi polypeptit thứ hai của diabody ví dụ khác này có thể bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng-N đến đầu tận cùng-C: đầu tận cùng-N; miền VL của kháng thể kháng-CD3 tương ứng; peptit đệm can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)); miền VH của kháng thể kháng-B7-H3 tương ứng (ví dụ, mAb-D VH (SEQ ID NO:26) hoặc hmAb-D VH (SEQ ID NO:31)); peptit đệm can thiệp (Liên kết 2: ASTKG (SEQ ID NO:37)); miền thúc đẩy-dị dime có chứa-xystein (ví dụ, E-coil) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:47)); và đầu tận cùng-C.

1. DART-D1

Diabody hai chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 đại diện bao gồm các miền VH và VL của hmAb-C ("DART-D1") được tạo cấu trúc.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-D1 (SEQ ID NO:87) được thể hiện dưới đây (trình tự của miền hmAb-C VL (SEQ ID NO:20) được gạch chân):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASESIY SYLAWYQQKP GKAPKLLVYN
TKTLPEGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYGTPPWTFG
QGTRLEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFSTYAM
NWVRQAPGKG LEWVGRIRSK YNNYATYYAD SVKGRFTISR DDSKNSLYLQ
MNSLKTEDTA VYYCVRHGNF GNSYVSWFAY WGQGTLVTVS SGGCGGGEVA
ALEKEVAALE KEVAALEKEV AALEK

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai của DART-D1 (SEQ ID NO:88) được thể hiện dưới đây (trình tự của miền hmAb-C VH (SEQ ID NO:21) được gạch chân):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFTFSSY
GMSWVRQAPG KGLEWVATIN SGGSNTYYPD SLKGRFTISR DNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARHDGG AMDYWGQGTT VTVSSGGCGG GKVAALKEKV
AALKEKVAAL KEKVAALKE

2. DART-D2

Diabody hai chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 đại diện bao gồm các miền VH và VL của hmAb-D ("DART-D2") được tạo cấu trúc.

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-D2 (SEQ ID NO:89) được thể hiện dưới đây (trình tự của miền hmAb-D VL (SEQ ID NO:30) được gạch chân):

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFAEYFCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN
WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISRD DSKNSLYLQM
NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS ASTKGEVAAC
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEK

Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai của DART-D2 (SEQ ID NO:90) được thể hiện dưới đây (trình tự của miền hmAb-D VH (SEQ ID NO:31) được gạch chân):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSSF

GMHWVRQAPG KGLEWVAYIS SGSGTIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARHGYR YEGFDYWGQG TTVTVSSAST KGKVAACKEK
VAALKEKVAA LKEKVAALKE

Nên hiểu là theo các phần bộc lộ trong bản mô tả này, các hướng miền, các miền VH, các miền VL, các liên kết, và/hoặc các miền thúc đẩy dị dime khác nhau, có thể được sử dụng để tạo ra các diabody hai chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 khác.

B. Các diabody ba chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3

Diabody B7-H3 x CD3 có ba chuỗi và có miền Fc được tạo ra có một vị trí gắn kết đặc hiệu đối với B7-H3 (bao gồm các miền VH và VL được làm tương thích với người của hmAb-D) và một vị trí gắn kết đặc hiệu đối với CD3 (bao gồm các miền VL và VH của CD3 mAb 1 (D65G)). Diabody này được ký hiệu là "DART-D3."

Chuỗi polypeptit thứ nhất của diabody DART-D3 ba chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 ví dụ bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng-N đến đầu tận cùng-C: đầu tận cùng-N; miền VL của kháng thể kháng-B7-H3 (hmAb-D VL (SEQ ID NO:30); peptit đệm can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)); miền VH của CD3 mAb 1 (D65G) (SEQ ID NO:68); peptit đệm can thiệp (Liên kết 2: ASTKG (SEQ ID NO:37)); miền thúc đẩy-dị dime có chứa-xystein (cuộn-E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:47)); peptit đệm can thiệp (Liên kết 3: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:57)); miền CH2-CH3 mang-nốt phồng của IgG1 (SEQ ID NO:61); và đầu tận cùng-C. Các polynucleotit mã hoá chuỗi polypeptit này có thể mã hoá gốc lysin đầu tận cùng-C của SEQ ID NO:61 (có nghĩa là, X của SEQ ID NO:61), tuy nhiên, như đề cập ở trên, gốc lysin này có thể được loại bỏ sau-dịch mã trong một số hệ biểu hiện. Do đó, sáng chế bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất mà có chứa gốc lysin này (có nghĩa là, SEQ ID NO:61, trong đó X là lysin), cũng như chuỗi polypeptit thứ nhất mà không có gốc lysin này (có nghĩa là, SEQ ID NO:61, trong đó X là không có). Trình tự axit amin của chuỗi

polypeptit thứ nhất này (SEQ ID NO:91) được đề xuất dưới đây (trình tự của miền hmAb-D VL (SEQ ID NO:30) được gạch chân):

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFAEYFCQQ YNNYPFTFGQ
GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN
WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISRD DSKNSLYLQM

NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS ASTKGEVAAC
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
PGX

trong đó X là lysin (K) hoặc là không có.

Chuỗi polypeptit thứ hai của diabody DART-D3 ba chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 ví dụ này bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng-N đến đầu tận cùng-C: đầu tận cùng-N; miền VL của CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67); peptit đệm can thiệp (Liên kết 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:32)); miền VH của kháng thể kháng-B7-H3 (hmAb-D VH (SEQ ID NO:31); peptit đệm can thiệp (Liên kết 2: ASTKG (SEQ ID NO:37)); miền thúc đẩy-dị dime có chứa-xystein (cuộn-K) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:48)); và đầu tận cùng-C. Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ hai này (SEQ ID NO:92) được đề xuất dưới đây (trình tự của miền hmAb-D VH (SEQ ID NO:31) được gạch chân):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSSF
GMHWVRQAPG KGLEWVAYIS SGSGTIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTA VYYCARHGYR YEGFDYWGQG TTVTVSSAST KGKVAACKEK
VAALKEKVAA LKEKVAALKE

Chuỗi polypeptit thứ ba của diabody DART-D3 ba chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 ví dụ bao gồm, theo hướng từ đầu tận cùng-N đến đầu tận cùng-C: đầu tận cùng-N; peptit đệm (DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:56)); miền CH2-CH3 của IgG1 mang-lỗ (SEQ ID NO:62); và đầu tận cùng-C. Các polynucleotit mã hoá chuỗi polypeptit này có thể mã hoá gốc lysin đầu tận cùng-C của SEQ ID NO:62 (có nghĩa

là, X của SEQ ID NO:62), tuy nhiên, như đề cập ở trên, gốc lysin này có thể được loại bỏ sau-dịch mã trong một số hệ biểu hiện. Do đó, sáng chế bao gồm chuỗi polypeptit thứ ba có chứa gốc lysin này (có nghĩa là, SEQ ID NO:62, trong đó X là lysin), cũng như chuỗi polypeptit thứ ba mà không có gốc lysin này (có nghĩa là, SEQ ID NO:62, trong đó X là không có). Trình tự axit amin của chuỗi polypeptit thứ ba này (SEQ ID NO:93) được đề xuất dưới đây:

```
DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGX
```

trong đó X là lysin (K) hoặc là không có.

Nên hiểu là theo các phần bộc lộ trong bản mô tả này, các hướng miền, các miền VH, các miền VL, các liên kết, và/hoặc các miền thúc đẩy dị dime khác nhau, có thể được sử dụng để tạo ra các diabody ba chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 khác. Cụ thể là, miền VH và miền VL của hmAb-C (SEQ ID NOs:20-21) có thể được sử dụng.

C. Các phân tử gắn kết hoá trị ba B7-H3 x CD3 x CD8

Các phân tử gắn kết "B7-H3 x CD3 x CD8" hoá trị ba ví dụ có một vị trí gắn kết đặc hiệu đối với B7-H3 (bao gồm miền kháng-B7-H3-VL gốc và/hoặc được làm tương thích với người và miền kháng-B7-H3-VH tương ứng, như đề cập ở trên), một vị trí gắn kết đặc hiệu đối với CD3 (bao gồm, ví dụ, miền VL của CD3 mAb-1 (SEQ ID NO:67) và miền VH của kháng thể kháng-CD3 (ví dụ, CD3 mAb 1 (D65G) (SEQ ID NO:68)), và một vị trí gắn kết đặc hiệu đối với CD8 (bao gồm, ví dụ, các miền VH và VL tương ứng của TRX2 (SEQ ID NO:75 và SEQ ID NO:76). Các phân tử gắn kết hoá trị ba này có thể có hai chuỗi polypeptit (xem, ví dụ, Fig. 6E, và Fig. 6F), ba chuỗi polypeptit (xem, ví dụ, Fig. 6C và Fig. 6D), bốn chuỗi polypeptit (xem, ví dụ, Fig. 6A và Fig. 6B), hoặc năm chuỗi polypeptit (xem, ví dụ, Fig. 5).

X. Các phương pháp sản xuất

Các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế ưu tiên nhất là được sản xuất thông qua biểu hiện tái tổ hợp các phân tử axit nucleic mã hoá các polypeptit này, là đã biết rõ trong lĩnh vực này.

Các polypeptit của sáng chế có thể được điều chế thuận tiện bằng cách sử dụng tổng hợp peptit pha rắn ("S*olid Phase Synthesis*," Science 232(4748):341-347, (1986) của Merrifield, B.; "*General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135, (1985) của Houghten, R.A.; "*Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century*," Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10), (2006) của Ganesan, A..

Theo cách khác, các kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp và biểu hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Các kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng cách trước tiên phân lập các kháng thể được tạo ra từ các động vật chủ, thu được trình tự gen, và sử dụng trình tự gen này để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp ở các tế bào chủ (ví dụ, các tế bào CHO). Một phương pháp khác mà có thể được sử dụng để biểu hiện trình tự kháng thể ở thực vật (ví dụ, cây thuốc lá) hoặc sữa chuyển gen. Các phương pháp thích hợp để biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp ở thực vật hoặc sữa đã được bộc lộ (xem, ví dụ "*Production Of Antibodies and Antibody Fragments In Plants*," Vaccine 19:2756, (2001) của Peeters *et al.*; "*Human Antibodies From Transgenic Mice*," Int. Rev. Immunol 13:65-93, (1995) của Lonberg, N. *et al.*; và "*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*," J. Immunol Methods 231:147-157, (1999) của Pollock *et al.*). Các phương pháp thích hợp để tạo ra các dẫn xuất của các kháng thể, ví dụ, được làm tương thích với người, chuỗi đơn, *v.v.* là đã biết trong lĩnh vực này, và đã được mô tả ở trên. Theo cách khác, các kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng công nghệ bộc lộ thể thực khuẩn (xem, ví dụ các Patent Mỹ số 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; và "*Making Antibodies By Phage Display Technology*," Annu. Rev. Immunol. 12,433-455, (1994) của Winter, G. *et al.*).

Các vectơ có chứa các polynucleotit quan tâm (ví dụ, các polynucleotit mã hoá các chuỗi polypeptit của các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế) có thể được đưa vào tế bào chủ bằng cách bất kỳ trong số các cách thức thích hợp, bao gồm điện di, chuyển nhiễm có sử dụng canxi clorua, rubiđi clorua, canxi phosphat, DEAE-dextran, hoặc các chất khác; bắn phá bằng vi hạt (microprojectile bombardment); chuyển nhiễm qua lipit; và lây nhiễm (ví dụ, trong trường hợp này vectơ là tác nhân lây nhiễm như virut vaccinia). Việc lựa chọn đưa các vectơ hoặc các polynucleotit vào thường sẽ tùy thuộc vào các đặc tính của tế bào chủ.

Tế bào chủ bất kỳ có khả năng biểu hiện quá mức các ADN khác loài có thể được sử dụng nhằm mục đích biểu hiện polypeptit hoặc protein quan tâm. Các ví dụ không giới hạn về các tế bào chủ động vật có vú thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tế bào COS, HeLa, và CHO.

Sáng chế bao gồm các polypeptit bao gồm trình tự axit amin của phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế. Các polypeptit của sáng chế có thể được tạo ra bằng các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Các polypeptit có thể được sản xuất bằng cách phân giải protein hoặc theo cách phân hủy các kháng thể khác, bằng các phương pháp tái tổ hợp (*nghĩa là,* các polypeptit đơn nhất hoặc dung hợp) như đề cập ở trên hoặc bằng cách tổng hợp hoá học. Các polypeptit của các kháng thể, đặc biệt là các polypeptit ngắn hơn tối đa khoảng 50 axit amin, được tạo ra một cách thuận tiện bằng cách tổng hợp hoá học. Các phương pháp tổng hợp hoá học là đã biết trong lĩnh vực này và có bán sẵn.

Sáng chế bao gồm các biến thể của các phân tử gắn kết-B7-H3, bao gồm các polypeptit tương đương về chức năng mà không ảnh hưởng đáng kể đến các tính chất của các phân tử này cũng như các biến thể có hoạt tính tăng cường hoặc giảm đi. Cải biến các polypeptit là thực tiễn thường quy trong lĩnh vực này và không nhất thiết cần mô tả chi tiết trong bản mô tả này. Ví dụ về các polypeptit được cải biến bao gồm các polypeptit với các thay thế bảo toàn các gốc axit amin, một hoặc nhiều khuyết đoạn hoặc bổ sung axit amin mà không làm thay đổi có hại hoạt tính chức năng hoặc sử dụng các chất tương tự hoá học. Các gốc axit amin mà có thể được thay thế bảo toàn cho nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở: glyxin/alanin; serin/threonin;

valin/isoleuxin/leuxin; asparagin/glutamin; axit aspartic/axit glutamic; lysin/arginin; và phenylalanin/tyrosin. Các polypeptit này cũng bao gồm các polypeptit được glycosyl hoá và không được-glycosyl hoá, cũng như các polypeptit với các cải biến sau-dịch mã khác, như, ví dụ, glycosyl hoá bằng các đường khác nhau, axetyl hoá, và phosphoryl hoá. Tốt hơn là, các thay thế axit amin sẽ bảo toàn, *nghĩa là,* axit amin thay thế sẽ có các tính chất hoá học tương tự như axit amin ban đầu. Các thay thế bảo toàn này là đã biết trong lĩnh vực này, và các ví dụ đã được cung cấp ở trên. Các cải biến axit amin có thể là từ thay đổi hoặc cải biến một hoặc nhiều axit amin để hoàn thành việc thiết kế lại vùng, như miền thay đổi. Các thay đổi trong miền thay đổi có thể làm thay đổi ái lực và/hoặc tính đặc hiệu gắn kết. Các phương pháp cải biến khác bao gồm sử dụng các kỹ thuật ngẫu hợp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp dùng enzym, thay thế oxy hoá và tạo chelat. Các cải biến có thể được sử dụng, ví dụ, để gắn các chất đánh dấu cho thử nghiệm miễn dịch, như gắn các nhóm hoạt tính phóng xạ cho thử nghiệm miễn dịch phóng xạ. Các polypeptit được cải biến được tạo ra bằng cách sử dụng các quy trình đã thiết lập trong lĩnh vực này và có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng các thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này.

Sáng chế bao gồm các protein dung hợp bao gồm một hoặc nhiều VL và/hoặc VH kháng-B7-H3 của sáng chế. Theo một phương án, polypeptit dung hợp được đề xuất bao gồm chuỗi nhẹ, chuỗi nặng hoặc cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Theo một phương án khác, polypeptit dung hợp có chứa vùng ổn định của globulin miễn dịch khác loài. Theo một phương án khác, polypeptit dung hợp có chứa miền thay đổi chuỗi nhẹ và miền thay đổi chuỗi nặng của kháng thể được sản xuất từ tế bào lai đã nộp lưu-công khai. Cho các mục đích của sáng chế, protein dung hợp kháng thể có chứa một hoặc nhiều miền polypeptit mà gắn kết đặc hiệu với B7-H3 và trình tự axit amin khác mà không được gắn vào trong phân tử nguyên thuỷ, ví dụ, trình tự khác loài hoặc trình tự tương đồng từ vùng khác.

Cụ thể, sáng chế bao gồm các phân tử gắn kết-B7-H3 (ví dụ, các kháng thể, các diabody, các phân tử gắn kết hoá trị ba, *v.v.*) được tiếp hợp với nhóm chẩn đoán hoặc trị liệu. Cho mục đích chẩn đoán, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế có thể được ngẫu hợp với chất có thể phát hiện. Các phân tử gắn kết-B7-H3 là hữu ích

để theo dõi và/hoặc tiên lượng mức độ phát triển hoặc tiến triển của bệnh như một phần của quy trình xét nghiệm lâm sàng, như xác định hiệu lực của liệu pháp cụ thể. Ví dụ về các chất có thể phát hiện bao gồm nhiều loại enzym (ví dụ, peroxidaza ở cây cải ngựa (horseradish), beta-galactosidaza, *v.v.*), các nhóm giả (ví dụ, avidin/biotin), các chất huỳnh quang (ví dụ, umbelliferon, florexein, hoặc phycoerythrin), các chất phát quang (ví dụ, luminol), các chất phát quang sinh học (ví dụ, luciferaza hoặc aequorin), các chất phóng xạ (ví dụ, cacbon-14, mangan-54, stronti-85 hoặc kẽm-65), các kim loại phát positron, và các ion kim loại thuận từ không có hoạt tính phóng xạ. Các chất có thể phát hiện có thể được ngẫu hợp hoặc được tiếp hợp trực tiếp với phân tử gắn kết-B7-H3 hoặc gián tiếp, thông qua trung gian (ví dụ, liên kết) bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này.

Cho các mục đích trị liệu, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế có thể là được tiếp hợp với nhóm trị liệu như độc tố tế bào, (ví dụ, chất kìm hãm tế bào hoặc diệt tế bào), chất trị liệu hoặc ion kim loại có hoạt tính phóng xạ, ví dụ, các chất phát xạ alpha. Chất kìm hãm tế bào hoặc diệt tế bào bao gồm chất bất kỳ gây hại cho tế bào, như, ví dụ, ngoại độc tố của *Pseudomonas*, độc tố bệnh bạch hầu, độc tố botulinum từ A đến F, ricin abrin, saporin, và các mảnh độc tế bào của các chất này. Chất trị liệu bao gồm chất bất kỳ có tác dụng trị liệu để dự phòng hoặc điều trị rối loạn. Các chất trị liệu này có thể là chất trị liệu hoá học, protein hoặc chất trị liệu polypeptit, và bao gồm các chất trị liệu có hoạt tính sinh học mong muốn và/hoặc biến đổi đáp ứng sinh học nhất định. Ví dụ về các chất trị liệu bao gồm các chất alkyl hoá, các chất ức chế sinh mạch, các chất chống nguyên phân, các chất trị liệu hormon, và các kháng thể hữu ích để điều trị các rối loạn tăng sinh tế bào. Nhóm trị liệu có thể được ngẫu hợp hoặc được tiếp hợp trực tiếp với phân tử gắn kết-B7-H3 hoặc gián tiếp, thông qua trung gian (ví dụ, liên kết) bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này.

XI. Các thể tiếp hợp thuốc kháng thể

Sáng chế đề cập tới các kháng thể kháng-B7-H3 của người trị liệu (hoặc các mảnh gắn kết B7-H3 của chúng), và cụ thể là tới kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng-B7-H3 của người nêu trên hoặc các mảnh gắn kết B7-H3, mà được tiếp

hợp với dược chất (phân tử "B7-H3-ADC"). Các B7-H3-ADC nêu trên tăng cường độc tính tế bào của liệu pháp kháng-B7-H3 của người, cụ thể là trong điều trị bệnh ung thư. Như chỉ ra ở trên, các phân tử B7-H3-ADC của sáng chế có công thức:

$$Ab\text{-}(LM)_m\text{-}(D)_n,$$

trong đó:

Ab là kháng thể gắn kết với B7-H3 mà bao gồm miền chuỗi nặng thay đổi (VH) được làm tương thích với người và miền chuỗi nhẹ thay đổi (VL) được làm tương thích với người, hoặc là mảnh gắn kết-B7-H3 của nó, và;

D là nhóm dược chất gây độc tế bào;

LM là liên kết hoặc phân tử liên kết mà liên kết cộng hoá trị Ab và D;

m là số nguyên trong khoảng từ 0 đến n và chỉ số lượng các phân tử liên kết của B7-H3-ADC;

và

n là số nguyên trong khoảng từ 1 đến 10 và chỉ số lượng các nhóm dược chất gây độc tế bào được liên kết cộng hoá trị với phân tử B7-H3-ADC.

Theo các phương án được ưu tiên, B7-H3-ADC sẽ gắn kết với tế bào khối u biểu hiện B7-H3, và tiếp đó sẽ được nhập nội bào vào tế bào này thông qua quá trình nhập bào qua trung gian-thụ thể. Khi ở bên trong lysosom, B7-H3-ADC ưu tiên sẽ bị phân huỷ để giải phóng nhóm dược chất gây độc tế bào bên trong tế bào, dẫn đến chết tế bào. Nên hiểu là, cơ chế tác dụng gây chết tế bào có thể khác nhau dựa vào nhóm dược chất gây độc tế bào sử dụng (ví dụ, phá vỡ sự phân bào bằng các chất ức chế polyme hoá tubulin như các maytansin và auristatin, gây hư hại ADN bằng các chất tương tác ADN như các calcheamixin và duocarmyxin), *v.v.* Các tế bào ung thư hàng xóm cũng có thể bị tiêu diệt khi dược chất tự do được giải phóng vào môi trường khối u bởi tế bào chết đi trong một quá trình gọi là tác dụng ngoài cuộc ("*Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy*," mAbs 6(1):34-45, (2014) của Panowski, S. *et al.*; "*Antibody-Drug Conjugates Designed To Eradicate Tumors With*

Homogeneous and Heterogeneous Expression Of The Target Antigen," Cancer Res. 66:3214-3221, (2006) của Kovtun, Y.V. *et al.*).

Các B7-H3-ADC của sáng chế có thể bao gồm miền Fc, mà có thể là miền Fc có trong tự nhiên, hoặc có thể có trình tự có một hoặc nhiều khác biệt với miền Fc có trong tự nhiên, và mà có thể là miền Fc toàn vẹn (ví dụ, miền Fc của IgG toàn vẹn) hoặc chỉ một phần của miền Fc toàn vẹn. Các miền Fc này có thể có isotyp bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4). Miền Fc này có thể bao gồm, hoặc có thể không có gốc lysin đầu tận cùng-C của miền CH3. Các B7-H3-ADC của sáng chế có thể còn bao gồm miền CH1 và/hoặc miền bản lề. Khi có mặt, miền CH1 và/hoặc miền bản lề có thể là có isotyp bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4), và ưu tiên có cùng isotyp như miền Fc mong muốn.

A. Các phân tử liên kết ví dụ của sáng chế

Cụ thể, sáng chế đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên trong đó Phân tử liên kết LM là không có (có nghĩa là, m = 0), và các B7-H3-ADC có nhiều hơn một Phân tử liên kết LM (có nghĩa là, m là số nguyên từ 2 đến n, trong đó n là số nguyên từ 2 đến 10), mỗi phân tử liên kết LM này liên kết cộng hoá trị nhóm dược chất gây độc tế bào D với Ab của các B7-H3-ADC nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC, trong đó Ab của phân tử này được liên kết cộng hoá trị với nhiều hơn một Phân tử liên kết LM, trong đó tất cả các Phân tử liên kết này là giống nhau. Các nhóm dược chất gây độc tế bào D mà được liên kết cộng hoá trị với Ab của các B7-H3-ADC nêu trên có thể đều giống nhau hoặc có thể bao gồm 2, 3, 4 hoặc nhiều nhóm dược chất gây độc tế bào D khác nhau độc lập với nhau.

Sáng chế còn đề xuất các B7-H3-ADC nêu trên, trong đó Ab của phân tử này được liên kết cộng hoá trị với nhiều hơn một Phân tử liên kết LM, trong đó tất cả các phân tử liên kết này là không giống nhau và có thể độc lập khác nhau. Các nhóm dược chất gây độc tế bào D mà được liên kết cộng hoá trị với Ab của các B7-H3-ADC nêu trên có thể đều giống nhau hoặc có thể bao gồm 2, 3, 4 hoặc nhiều nhóm dược chất gây độc tế bào D khác nhau độc lập với nhau.

Các miền VH và VL được làm tương thích với người ví dụ của các kháng thể gắn kết với B7-H3 của người, và các miền ổn định của kháng thể của người ví dụ mà có thể được bao gồm trong B7-H3-ADC của sáng chế được đề xuất ở trên. Như đề cập ở trên, B7-H3-ADC của sáng chế còn bao gồm ít nhất một nhóm dược chất gây độc tế bào, nhóm này ưu tiên được liên kết cộng hoá trị với nguyên tử của mạch bên của gốc axit amin của miền VH hoặc miền VL và/hoặc miền ổn định này, theo cách trực tiếp, hoặc thông qua Phân tử liên kết xen giữa nguyên tử mạch bên và nhóm dược chất. Phân tử liên kết có thể là phân tử không phải là-peptit, hoặc phân tử mà bao gồm phần không phải là-peptit và phần peptit, hoặc có thể là phân tử chỉ bao gồm các gốc axit amin. Các gốc axit amin của các Phân tử liên kết này có thể có chứa các gốc axit amin có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên, bao gồm phiên bản-D của các gốc axit amin có trong tự nhiên, *p*-axetylphenylalanin, selenoxystein, v.v. Tùy ý, hoặc ngoài ra, các gốc cụ thể có mạch bên mong muốn (ví dụ, mạch bên -CH_2-SH, mạch bên -CH_2-OH, mạch bên -CH(CH_2)-SH, mạch bên -CH_2-CH_2-S-CH_3; mạch bên -CH_2-C(O)-NH_2, mạch bên -CH_2-CH_2-C(O)-NH_2, mạch bên -CH_2-C(O)OH-, mạch bên CH_2-CH_2-C(O)OH-, mạch bên -CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2, mạch bên -CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(NH_2)$_2$, mạch bên imidazol, mạch bên benzyl, mạch bên phenol, mạch bên indol, *v.v.*) có thể được tạo ra bằng công nghệ di truyền vào B7-H3-ADC của sáng chế.

Phân tử liên kết có thể không phân cắt trong điều kiện sinh lý, ví dụ gồm nhóm ổn định thuỷ phân, ví dụ, liên kết thioete hoặc liên kết disulfua bị cản trở. Các liên kết ổn định thuỷ phân về cơ bản ổn định trong nước và không phản ứng với nước ở các giá trị pH hữu ích, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trong các điều kiện sinh lý trong một khoảng thời gian kéo dài. Trái lại, các liên kết không ổn định thuỷ phân hoặc các liên kết có thể phân huỷ là có thể phân huỷ trong nước hoặc trong dung dịch nước, kể cả ví dụ, máu.

Theo cách khác, phân tử liên kết có thể phân cắt, hoặc có thể có chứa phần có thể phân cắt. Các ví dụ về phần có thể phân cắt này bao gồm liên kết không bền với axit (ví dụ, liên kết axit 4-(4'-axetylpheonxy)butanoic tạo thành liên kết hydrazin), liên kết disulfua có thể phân cắt (liên kết này bị phân cắt trong môi trường nội bào khử), và liên kết có thể phân cắt bởi proteaza. Các liên kết không bền với axit được

thiết kế để ổn định ở các độ pH gặp phải trong máu, nhưng trở nên không ổn định và phân huỷ khi môi trường pH thấp gặp phải trong lysosom. Các liên kết có thể phân cắt bởi proteaza cũng được thiết kế để ổn định trong máu/huyết tương, nhưng nhanh chóng giải phóng dược chất tự do bên trong lysosom trong các tế bào ung thư khi bị phân cắt bởi các enzym lysosom ("*Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy*," mAbs 6(1):34-45, (2014) của Panowski, S. *et al.*). Theo cách khác, phân tử liên kết có thể là cơ chất có thể phân cắt-bằng enzym hoặc có chứa cơ chất có thể phân cắt-bằng enzym, như peptit có thể phân cắt, (ví dụ, dipeptit có thể phân cắt như liên kết valin-xitrulin dipeptit para-aminobenzylalcohol (cAC10-mc-vc-PABA) liên kết này bị phân cắt chọn lọc bởi các enzym lysosom). Các liên kết có thể phân cắt thích hợp là đã biết trong lĩnh vực này, xem, ví dụ, "*Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Dual Tumor-Specific Motive Containing Integrin-Targeted Plasmin-Cleavable Doxorubicin Prodrug*," Molecular Cancer Therapeutics, 1: 901-911, (2002) của de Groot, Franciscus M.H., et al.; "Doxorubicin Immunoconjugates Containing Bivalent, Lysosomally-Cleavable Dipeptide Linkages." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters12:1529-1532, (2002) của Dubowchik *et al.*; các Patent Mỹ số 5547667; 6,214,345; 7,585,491; 7,754,681; 8,080,250; 8,461,117; và WO 02/083180.

Có thể sử dụng các liên kết có thể phân huỷ hoặc không ổn định bởi enzym. Các liên kết này bị phân huỷ bởi một hoặc nhiều enzym. Chỉ để ví dụ, PEG và polyme có liên quan có thể bao gồm (các) phân tử liên kết có thể phân huỷ trong mạch khung polyme hoặc trong nhóm liên kết giữa mạch khung polyme và một hoặc nhiều nhóm chức đầu tận cùng của phân tử polyme này. (Các) Phân tử liên kết có thể phân huỷ này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các liên kết este được tạo thành bằng phản ứng của các axit carboxylic PEG hoặc các axit carboxylic PEG được hoạt hoá với các nhóm rượu của chất có hoạt tính sinh học, trong đó các nhóm este này nói chung thuỷ phân trong các điều kiện sinh lý để giải phóng chất có hoạt tính sinh học. Các phân tử liên kết có thể phân huỷ bằng cách thuỷ phân bao gồm, nhưng không giới hạn ở các liên kết cacbonat; các liên kết imin thu được từ phản ứng của amin và aldehyt; các liên kết phosphat este được tạo thành bằng cách cho rượu phản ứng với nhóm phosphat; các liên kết hydrazon mà là sản phẩm phản ứng của hydrazit và

aldehyt; các liên kết axetal mà là sản phẩm phản ứng của aldehyt và rượu; các liên kết orthoeste mà là sản phẩm phản ứng của format và rượu; các liên kết peptit được tạo thành bởi nhóm amin, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một đầu của polyme như PEG, và nhóm carboxyl của peptit; và các liên kết oligonucleotit được tạo thành bởi nhóm phosphoramidit, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một đầu của polyme, và nhóm 5' hydroxyl của oligonucleotit.

Theo một phương án, Phân tử liên kết của sáng chế có thể là, hoặc có thể bao gồm, phân tử liên kết có thể phân cắt, $V\text{-}(W)_k\text{-}(X)_l\text{-}A$, như được đề cập trong Công bố đơn PCT số WO 02/083180, có công thức:

$$Ab - [V\text{-}(W)_k\text{-}(X)_l\text{-}A] - D$$

trong đó:

V là nhóm có thể phân cắt tùy ý,

$(W)_k\text{-}(X)_l\text{-}A$ là hệ liên kết đệm tự loại bỏ, kéo dài mạch, mà tự loại bỏ thông qua quá trình loại bỏ-l,(4+2n),

W và X lần lượt là liên kết đệm dòng thác điện tử l,(4+2n), mà giống nhau hoặc khác nhau,

A là nhóm đệm có công thức $(Y)_m$, trong đó Y là liên kết đệm dòng thác điện tử l,(4+2n), hoặc nhóm có công thức U, mà là liên kết đệm loại bỏ tạo vòng,

k, 1 và m độc lập là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 5 (được bao gồm)),

n là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 10 (được bao gồm),

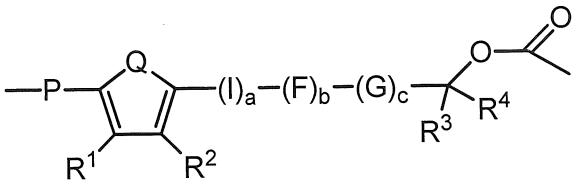
miễn là:

khi A là $(Y)_m$: thì $k+l+m \geq 1$, và

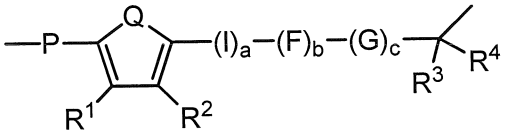
nếu $k+l+m=l$, thì $n>1$;

khi A là U: thì $k+1 \geq 1$.

W, X và Y độc lập được chọn từ các hợp chất có công thức:



hoặc công thức:

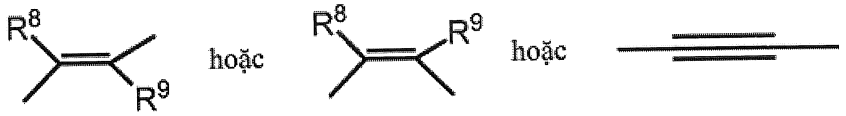


trong đó: Q là $-R^5C=CR^6-$, S, O, NR^5, $-R^5C=N-$, hoặc $-N=CR^5-$

P là NR^7, O hoặc S

a, b, và c độc lập là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 5 (được bao gồm));

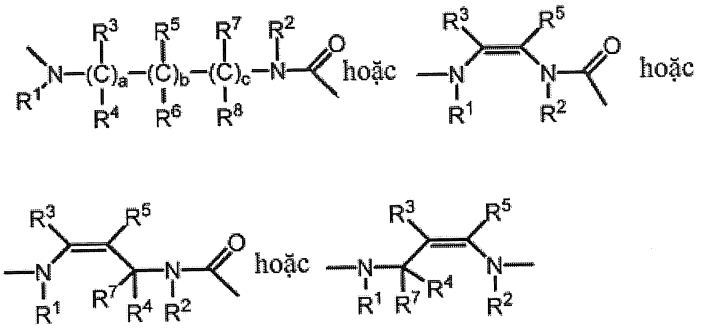
I, F và G độc lập được chọn từ các hợp chất có công thức:



trong đó R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, và R^9 độc lập là H, C_{1-6} alkyl, C_{3-20} heteroxyclyl, C_{5-20} aryl, C_{1-6} alkoxy, hydroxy (OH), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng, imidazolyl, C_{1-6} alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete (SR_x), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_x$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy ($S(=O)OH$), sulphinat ($S(=O)OR_x$), sulphinyl ($S(=O)R_x$), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 độc lập được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl, hai hoặc nhiều nhóm thế R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, hoặc R^9 tùy ý được liên

kết với nhau để tạo thành một hoặc nhiều cấu trúc vòng béo hoặc thơm;

U được chọn từ các hợp chất có công thức:



trong đó:

a, b và c độc lập được chọn từ số nguyên là 0 hoặc 1; miễn là a + b + c = 2 hoặc 3;

R^1 và/hoặc R^2 độc lập là H, C1-6 alkyl, alkyl này tùy ý được thế bởi một hoặc nhiều nhóm sau: hydroxy (OH), ete (OR_x), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng, imidazolyl, C_{1-6} alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete (SR_X), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_X$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy (S(=O)OH), sulphinat (S(=O)ORx), sulphinyl (S(=O)Rx), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl; và

R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 và R^8 độc lập là H, C_{1-6} alkyl, C_{3-20} heteroxyclyl, C_{5-20} aryl, C_{1-6} alkoxy, hydroxy (OH), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng, imidazolyl, C_{1-6} alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete

(SR_x), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_x$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy ($S(=O)OH$), sulphinat ($S(=O)OR_x$), sulphinyl ($S(=O)R_x$), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl, và hai hoặc nhiều nhóm thế R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, hoặc R^8 tùy ý được liên kết với nhau để tạo thành một hoặc nhiều cấu trúc vòng béo hoặc thơm.

Các phân tử ví dụ bao gồm:

p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

p-ammoxinnamyloxycarbonyl;

p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

p-amino-benzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl;

p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl;

p-aminobenzyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino)carbonyl;

p-aminoxinnamyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino)carbonyl;

p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino)carbonyl;

p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino)carbonyl;

p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino)-carbonyl;

p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino)carbonyl;

p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

p-aminoxinnamyl;

p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

p-amino-xinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

p-aminophenylpentadienyl;

p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

và

p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminophenylpentadienyl.

Theo một số phương án, B7-H3-ADC của sáng chế bao gồm hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín hoặc mười nhóm dược chất gây độc tế bào, các nhóm này có thể giống nhau, hoặc có thể độc lập giống hoặc khác biệt với nhóm dược chất gây độc tế bào khác của B7-H3-ADC. Theo một phương án, mỗi nhóm dược chất gây độc tế bào này được tiếp hợp với Ab của B7-H3-ADC của sáng chế thông qua phân tử liên kết tách biệt. Theo cách khác, nhiều hơn một nhóm dược chất gây độc tế bào có thể được gắn với Ab của B7-H3-ADC của sáng chế thông qua cùng một Phân tử liên kết.

Nhóm dược chất gây độc tế bào có thể được tiếp hợp với Ab của B7-H3-ADC của sáng chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, "*Methods to Design and Synthesize Antibody-Drug Conjugates (ADC)*," Intl. J. Molec. Sci. 17(194):1-16), (2016) của Yao, H. *et al.*; "*Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies*," mAbs 6(1):46-53, (2014) của Behrens, C. R. *et al.*; "*Antibody-Drug Conjugates – A New Wave Of Cancer Drugs*," Bioorganic & Medicinal Chem. Lett 24:5357-5363, (2014) của Bouchard, H. *et al.*). Nhóm thiol của xystein, nhóm bên amino của lysin, glutamin hoặc arginin, hoặc nhóm carboxyl của glutamat hoặc aspartat có thể được sử dụng để tiếp hợp Phân tử liên kết-nhóm dược chất gây độc tế bào (LM-D) với Ab của B7-H3-ADC của sáng chế. Các kháng thể nguyên thuỷ có chứa nhiều vị trí tiếp hợp lysin, và do đó có khả năng liên kết nhiều phân tử được tiếp hợp/kháng thể. Đúng vậy, lập bản đồ peptit đã xác định được là việc tiếp hợp xảy ra trên cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở khoảng 20 gốc lysin khác nhau (40 lysin/mAb). Do đó, > 1 triệu các loại ADC khác nhau có thể được tạo ra. Quá trình tiếp hợp xystein xảy ra sau khi khử từ một đến bốn liên kết disulfua giữa các chuỗi, và quá trình tiếp hợp này do đó giới hạn ở các miền VL và VH nguyên thuỷ thành tám nhóm sulfhydryl bị bộc lộ. Tuy nhiên, nếu muốn, các gốc phản ứng bổ sung (ví dụ, lysin, xystein, selenoxystein, *v.v.*) có thể được tạo ra bằng công nghệ di truyền vào một kháng thể (ví dụ, trong phạm vi miền VL và/hoặc miền VH và/hoặc miền ổn định). Ví dụ, một hoặc nhiều gốc axit amin nguyên thuỷ có thể được thay thế bằng gốc xystein. Axit amin phi tự nhiên (ví dụ *p*-axetylphenylalanin) có thể được kết hợp bằng cách di truyền vào một kháng thể bằng cách sử dụng cặp tRNA/aaRS ức chế cođon dừng amber. (Xem, ví dụ, "*Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies*," mAbs 6(1):46-53. doi:10.4161/mabs.26632, (2014) của Behrens CR, và Liu B.; "*Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy*," mAbs, 6(1), 34–45, doi:10.4161/mabs.27022, (2014) của Panowksi, S., *et al.*; và WO 2008/070593). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, các enzym (ví dụ, glycotransferaza) có thể được sử dụng để tiếp hợp Phân tử liên kết-nhóm dược chất gây độc tế bào (LM-D) với Ab của B7-H3-ADC của sáng chế. Glycotransferaza gắn nhóm đường vào vị trí glycosyl hoá trên kháng thể (ví dụ, vị trí N297 của miền Fc của kháng thể IgG của người), kháng thể này tiếp đó có thể có vai trò là Phân tử liên kết của sáng chế và tiếp hợp nhóm dược chất gây độc tế bào (D) với Ab của B7-H3-

ADC của sáng chế. Theo cách khác, transglutaminaza có thể được sử dụng để xúc tác tạo thành liên kết cộng hoá trị giữa nhóm amin tự do và mạch bên glutamin.

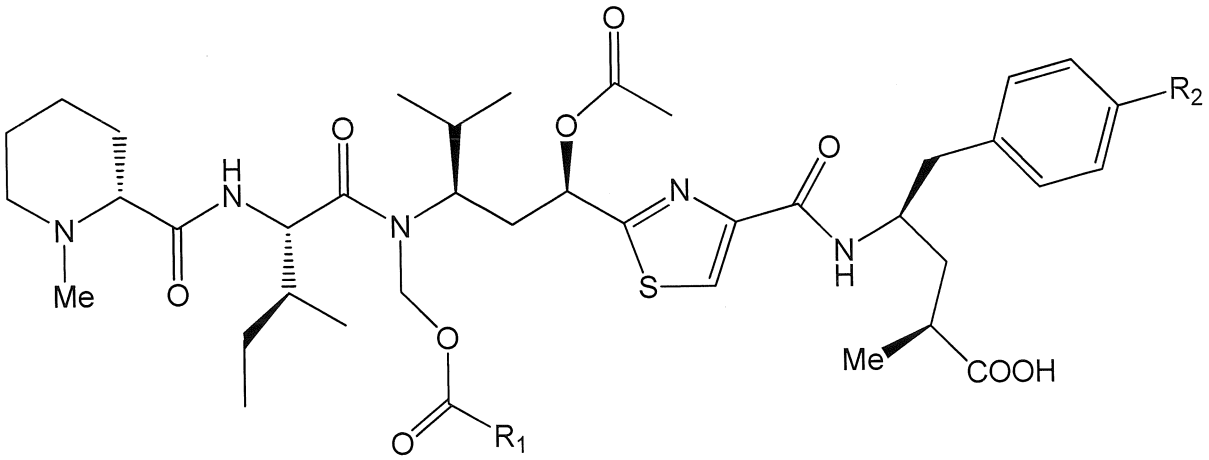
Ưu tiên cho mục đích này là transglutaminaza từ Streptoverticillium mobaraense (mTG) có bán sẵn ("*Bacterial Pro-Transglutaminase From Streptoverticillium mobaraense – Purification, Characterisation and Sequence Of The Zymogen*," Eur. J. Biochem. 257(3):570-576, (1998) của Pasternack, R. *et al.*; "*Properties and Applications Of Microbial Transglutaminase*," Appl. Microbiol. Biotechnol. 64:447-454, (2004) của Yokoyama, K. *et al.*). Enzym này không nhận biết gốc glutamin có trong tự nhiên bất kỳ trong miền Fc của các kháng thể đã glycosyl hoá, nhưng nhận biết tetrapeptit LLQL (SEQ ID NO:94) ("*Site-Specific and Stoichiometric Modification Of Antibodies By Bacterial Transglutaminase*," Angew Chem. Int. Ed. Engl. 49:9995-9997, của Jeger, S. et al. (2010)) mà có thể được tạo ra bằng công nghệ di truyền vào miền VL và/hoặc miền VH và/hoặc miền ổn định. Các phương pháp này được Panowski, S. *et al.* tổng kết trong tài liệu: "*Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy*," mAbs 6(1):34-45, (2014).

B. Nhóm dược chất gây độc tế bào ví dụ của sáng chế

Theo một số phương án, nhóm dược chất gây độc tế bào của B7-H3-ADC của sáng chế bao gồm độc tố tế bào, đồng vị phóng xạ, chất điều biến miễn dịch, xytokin, lymphokin, chemokin, yếu tố tăng trưởng, yếu tố hoại tử khối u, hormon, chất đối kháng hormon, enzym, oligonucleotit, phân tử ADN, phân tử ARN, phân tử siRNA, phân tử RNAi, phân tử microRNA, chất trị liệu quang hoạt, chất chống sinh mạch, chất gây chết tế bào theo chương trình, peptit, lipit, hydrat cacbon, chất càng cua, hoặc tổ hợp của chúng.

1. Nhóm dược chất gây độc tế bào Tubulysin

B7-H3-ADC của sáng chế có thể bao gồm nhóm dược chất gây độc tế bào tubulysin:



Dẫn xuất Tubulysin	R1	R2
Tubulysin A	$CH_2CH(CH_3)_2$	OH
Tubulysin B	$CH(CH_3)_2$	OH
Tubulysin C	CH_2CH_3	OH
Tubulysin D	$CH_2CH(CH_3)_2$	H

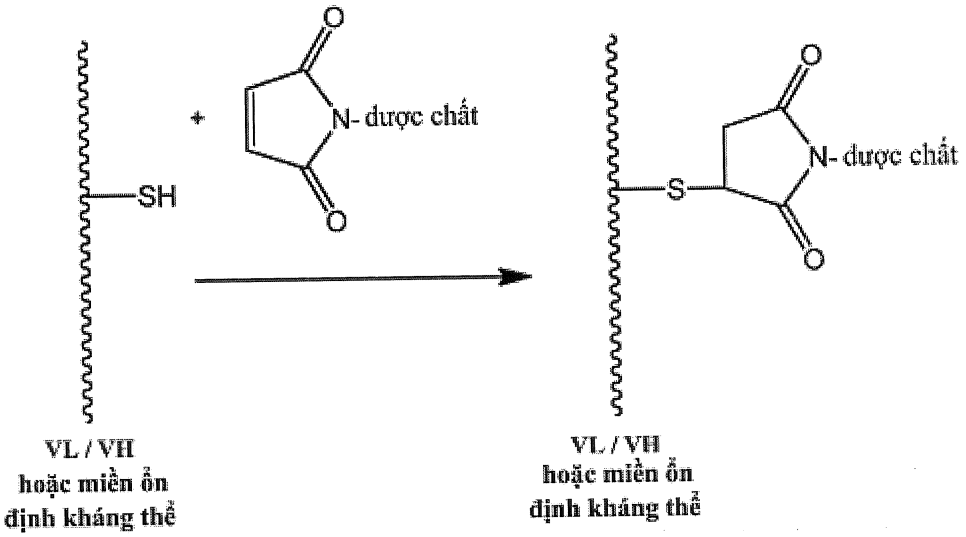
Các Tubulysin là thành viên của nhóm các sản phẩm tự nhiên được phân lập từ các loài myxobacteria ("*Tubulysins, New Cytostatic Peptides From Myxobacteria Acting On Microtubuli. Production, Isolation, Physico-Chemical and Biological Properties*," J. Antibiot. 53:879-885, (2000) của Sasse *et al.*). Đối với các chất tương tác bộ khung tế bào, các tubulysin là các độc chất nguyên phân ức chế quá trình polyme hoá tubulin và dẫn đến ngừng chu trình tế bào và chết tế bào "*Isolation, Crystal and Solution Structure Determination, and Biosynthesis Of Tubulysins--Powerful Inhibitors Of Tubulin Polymerization From Myxobacteria*," Chem. Int. Ed. 43:4888-4892, (2004) của Steinmetz *et al.*; "*Mechanism Of Action Of Tubulysin, An Antimitotic Peptide From Myxobacteria*," ChemBioChem. 7:678-683, (2006) của Khalil *et al.*; "*Biological Evaluation Of Tubulysin A: A Potential Anticancer and Antiangiogenic Natural Product*," Biochem. J. 396: 235-242, (2006) của Kaur *et al.*).

Các Tubulysin là các phân tử độc tế bào cực mạnh, vượt quá khả năng ức chế tăng trưởng tế bào của chất hoá trị liệu truyền thống thích hợp trên lâm sàng bất kỳ, ví dụ, epothilon, paclitaxel, và vinblastin. Hơn nữa, chúng hiệu nghiệm chống lại các dòng tế bào kháng đa thuốc ("*Myxobacterial Epothilones and Tubulysins As Promising Anticancer Agents*," Mol. Diversity 9:141-147, (2005) của Domling, A. *et al.*). Các hợp chất này thể hiện độc tính tế bào mạnh khi thử nghiệm đối với panen các dòng tế bào ung thư với các giá trị IC_{50} ở khoảng picomol nhỏ; do đó, các hợp chất này được quan tâm làm các chất trị liệu chống ung thư. Xem, ví dụ, WO 2012/019123, WO 2015/157594. Các thể tiếp hợp Tubulysin được đề cập, ví dụ, trong Patent Mỹ số. 7,776,814. Theo một số phương án, phân tử tubulysin hoặc dẫn xuất của nó là tiền dược chất.

2. Nhóm dược chất gây độc tế bào Auristatin

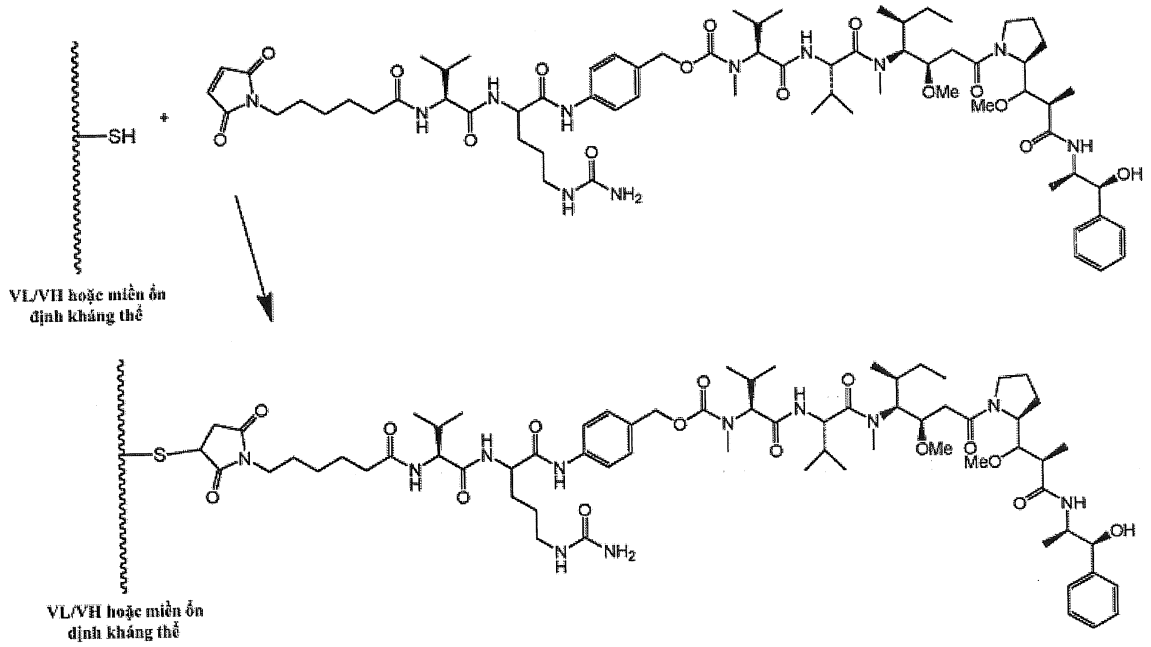
B7-H3-ADC của sáng chế có thể theo cách khác hoặc ngoài ra còn bao gồm nhóm dược chất gây độc tế bào auristatin (ví dụ, MMAE (N-metylvalin-valin-dolaisoleuxin-dolaproin-norephedrin) và MMAF (N-metylvalin-valin-dolaisoleuxin-dolaproin-phenylalanin). Các dolastatin ban đầu được phát hiện là các thành phần của Dolabella auricularia của thỏ biển (sea hare) và đã được cải biến để tạo ra các dẫn xuất còn được gọi là các auristatin (ví dụ, monometyl auristatin E và F). Các dolastatin và auristatin tương tác với vị trí gắn kết của Vinca alcoloit trên α-tubulin và phong bế quá trình polyme hoá chất này. Các hợp chất này đã chứng tỏ có can thiệp vào động học của vi ống, thuỷ phân GTP, và quá trình phân chia nhân và tế bào (Antimicrob. Agents and Chemother. 45:3580-3584 (2001), của Woyke *et al.*) và có hoạt tính chống ung thư (các Patent Mỹ số 5,663,149, 6,884,869, 7,964,566). Nhóm dược chất auristatin có thể được gắn với kháng thể thông qua đầu tận cùng N (amino) hoặc đầu tận cùng C (carboxyl) của nhóm dược chất peptit (Xem, ví dụ, WO 2002/088172). Theo một số phương án, phân tử auristatin hoặc dolastatin, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó là tiền dược chất. MMAE có thể được tiếp hợp với protein bằng cách cải biến các thiol mạch bên của xystein nguyên thuỷ ("*The Discovery and Development Of Brentuximab Vedotin For Use In Relapsed Hodgkin U lympho and Systemic Anaplastic Large Cell Lymphoma*," Nat. Biotechnol. 30:631-637, (2012) của Senter, P.D. *et al.*; "*Brentuximab vedotin*," MAbs 4:458-465, (2012) của van de

Donk, N.W. *et al.*). Phương pháp này bao gồm khử một hoặc nhiều liên kết disulfua được bộc lộ bởi-dung môi của các gốc xystein bằng tác nhân khử (ví dụ, dithiothreitol (DTT) hoặc tris(2-carboxyetyl)phosphin (TCEP)), tiếp đó cải biến các thiol thu được bằng dược chất có chứa-maleimit (xem, "*Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies*," mAbs 6(1):46-53, (2014) của Behrens, C. R. *et al.*).



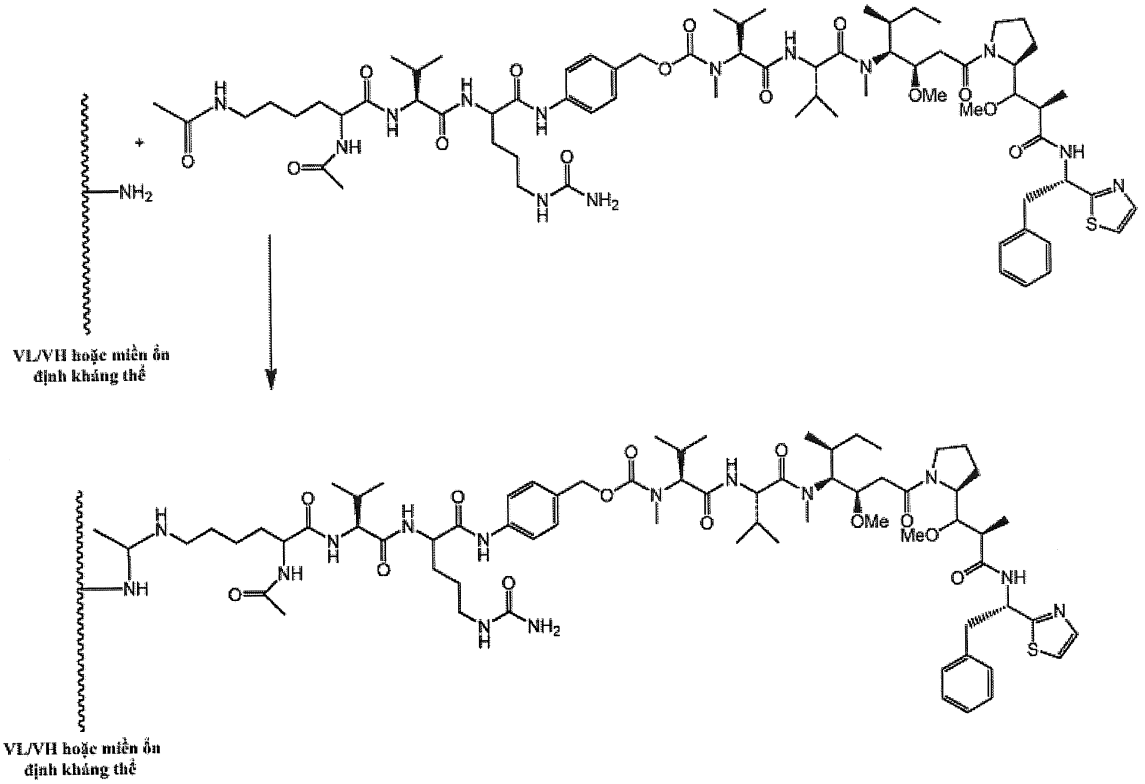
Sơ đồ 1

Dược chất gây độc tế bào ví dụ mà có thể được tiếp hợp theo cách này kết hợp vị trí phân cắt bằng proteaza cathepsin B 25 (VC: valin, xitrulin) và liên kết tự hy sinh (PAB: para-aminobenzyloxycarbonyl) giữa nhóm maleimit (MC: maleimidocaproyl) và dược chất gây độc tế bào này (MMAE) ("*Development Of Potent Monoclonal Antibody Auristatin Conjugates For Cancer Therapy*," Nat. Biotechnol. 21:778-784, (2003) của Doronina, S.O. *et al.*).



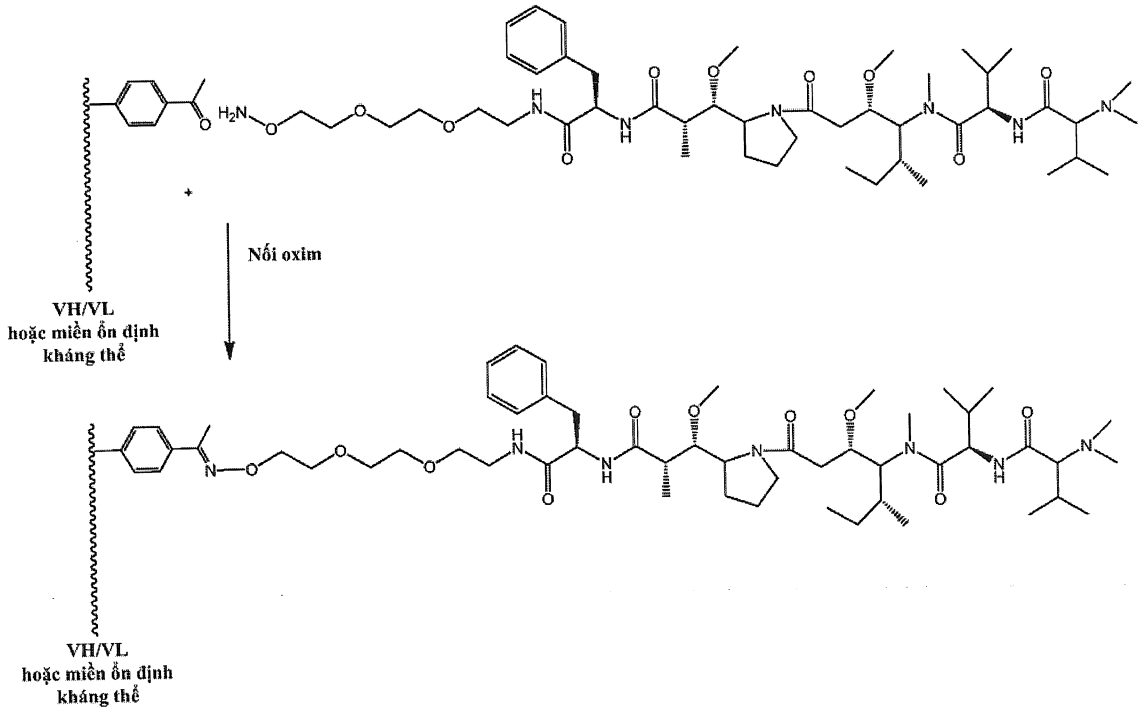
Sơ đồ 2: Tổng hợp MC-VC-PAB-MMAE

Theo cách khác, nhóm dược chất gây độc tế bào auristatin có thể là AcLys-VC-PAB-MMAD (axetyllysinvalinxitrulin-p-aminobenzyloxycarbonyl-monometyldolastatin), chất này có thể được tiếp hợp với nhóm mạch bên NH_2 của gốc glutamin của miền VL và/hoặc miền VH và/hoặc miền ổn định của phần Ab của B7-H3-ADC của sáng chế bằng cách sử dụng enzym transglutaminaza của vi khuẩn để xúc tác phản ứng đặc hiệu-vị trí giữa mạch bên của gốc lysin được axetyl hoá và các mạch bên glutamin:



Sơ đồ 3

Theo cách khác, p-axetylphenylalanin có thể được kết hợp vào miền VL và/hoặc miền VH và/hoặc miền ổn định của phần Ab của B7-H3-ADC của sáng chế và tiếp đó được sử dụng để tiếp hợp auristatin F-oxyamin với miền này thông qua nối oxim:



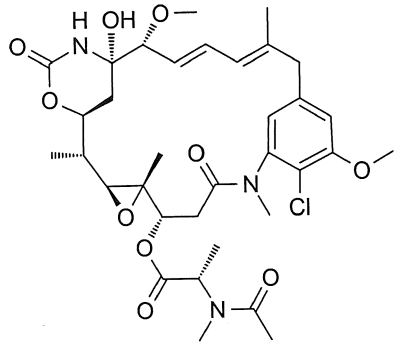
Sơ đồ 4

3. Nhóm dược chất gây độc tế bào Maytansinoid

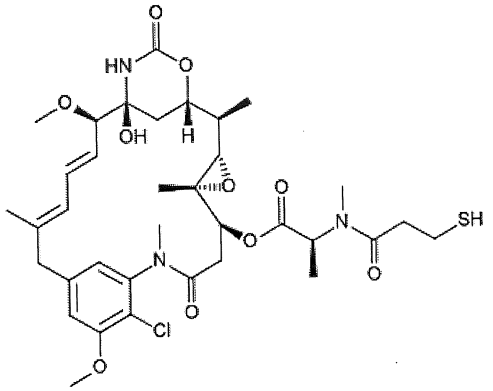
B7-H3-ADC của sáng chế có thể theo cách khác hoặc ngoài ra còn bao gồm nhóm dược chất gây độc tế bào maytansinoid, ví dụ, kháng sinh ansamyxin đặc trưng bởi có cấu trúc ansamacrolit 19-cạnh được gắn với nhóm mang màu vòng benzen được clo hoá. Các maytansinoid là các chất ức chế nguyên phân, các chất này tác dụng bằng cách ức chế quá trình polyme hoá tubulin. Maytansin lần đầu tiên được phân lập từ giống cây ở Đông Phi *Maytenus serrata* (Patent Mỹ số 3,896,111). Sau đó, phát hiện ra là một số vi khuẩn cũng sản sinh các maytansinoid, như maytansinol và C-3 maytansinol este (Patent Mỹ số 4,151,042). Maytansinol tổng hợp và các dẫn xuất và chất tương tự của nó được đề cập, ví dụ, trong các Patent Mỹ số 4,137,230 và 4,248,870. Các nhóm dược chất maytansinoid là các nhóm dược chất hấp dẫn trong các thể tiếp hợp kháng thể dược chất bởi vì các chất này: (i) tương đối dễ tiếp cận để điều chế bằng cách lên men hoặc cải biến hoá học, tạo dẫn xuất các sản phẩm

lên men, (ii) dễ xử lý tạo dẫn xuất với các nhóm chức thích hợp để tiếp hợp thông qua các liên kết không phải-disulfua với các kháng thể, (iii) ổn định trong huyết tương, và (iv) có hiệu quả đối với nhiều dòng tế bào khối u. Các thể tiếp hợp miễn dịch có chứa các maytansinoid, các phương pháp điều chế chúng, và ứng dụng trị liệu của chúng được đề cập, ví dụ, trong các Patent Mỹ số 5,208,020 và 5,416,064 và Patent Châu Âu số 0425235B1; "*Eradication Of Large Colon Tumor Xenografts By Targeted Delivery Of Maytansinoids*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 93:8618-8623 (1996) của Liu, C. *et al.* (mô tả các thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm maytansinoid được ký hiệu là DM1) và "*Immunoconjugates Containing Novel Maytansinoids: Promising Anticancer Drugs*," Cancer Research 52:127-131, (1992) của Chari, R.V. *et al.*.

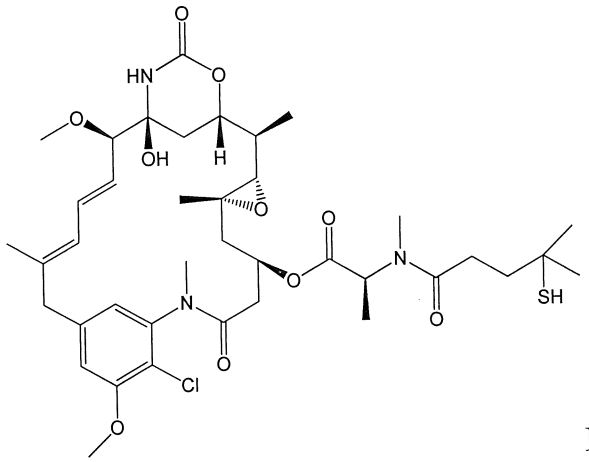
Maytansin, DM1 và DM4 là nhóm dược chất gây độc tế bào maytansinoid ví dụ:



Maytansin

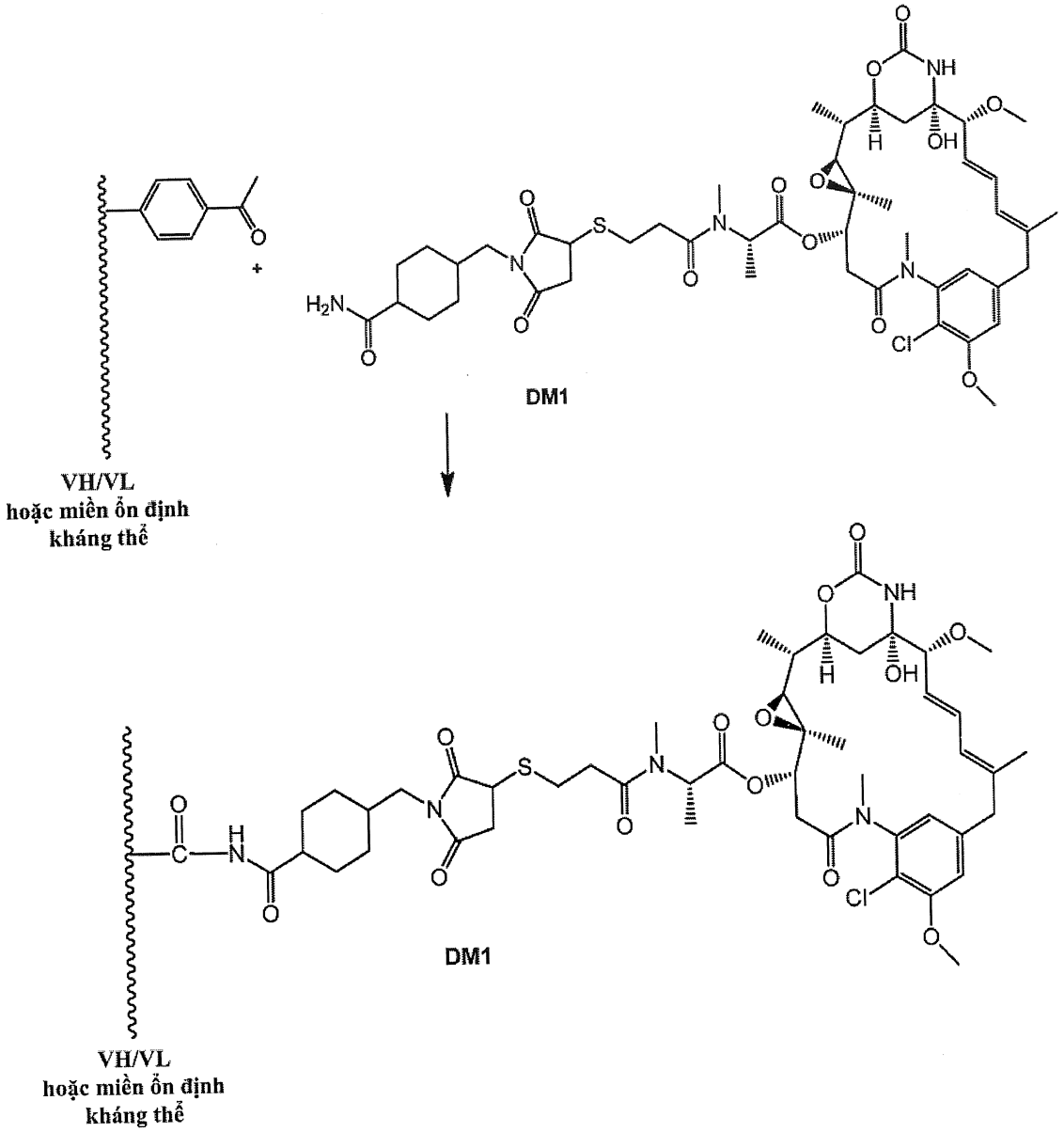


DM1



DM4

Maytansin có thể được tiếp hợp với phần Ab của B7-H3-ADC của sáng chế bằng phản ứng với lysin hoặc mạch bên glutamin. DM1 và DM4 có thể được tiếp hợp với mạch bên COOH của gốc glutamat hoặc aspartat của miền VL và/hoặc miền VH và/hoặc miền ổn định của phần Ab của B7-H3-ADC của sáng chế (xem, "*Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies*," mAbs 6(1):46-53, (2014) của Behrens, C. R. *et al.*; "*Antibody-Drug Conjugates – A New Wave Of Cancer Drugs*," Bioorganic & Medicinal Chem. Lett 24:5357-5363, (2014) của Bouchard, H. *et al.*):

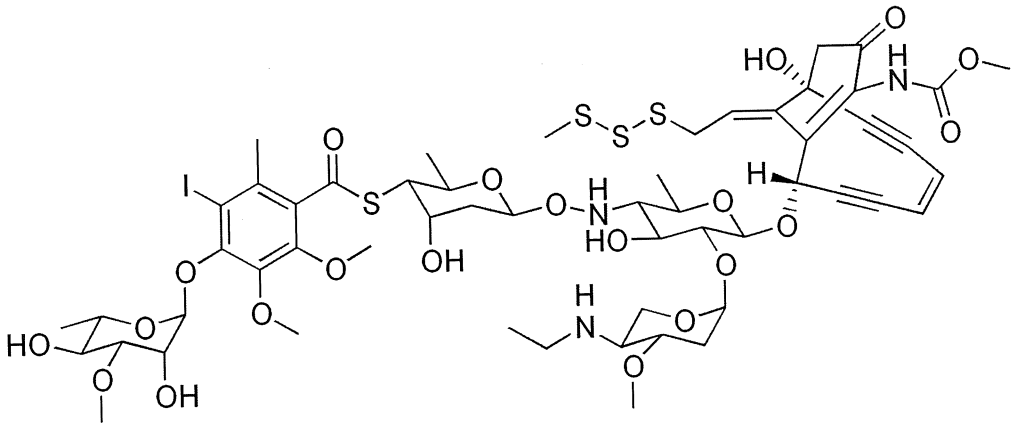


Sơ đồ 5

Trastuzumab emtansin (ado-trastuzumab emtansin, T-DM1, tên thương mại KADCYLA®) là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất gồm có kháng thể đơn dòng trastuzumab (HERCEPTIN®) được tiếp hợp với maytansinoid mertansin (DM1). Xem, ví dụ, "*Trastuzumab Emtansine: A Unique Antibody-Drug Conjugate In Development For Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Cancer*," Clin. Cancer Res. 20:6437-6447, (2011) của LoRusso *et al.*. thio-Trastuzumab-DM1 ADC được tạo ra bằng công nghệ di truyền cũng được Junutual *et al.* mô tả trong "*Engineered Thio-Trastuzumab-DM1 Conjugate With An Improved Therapeutic Index To Target Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer*," Clin, Cancer Res. 16:4769-4778, (2010). Theo một số phương án, phân tử maytansinoid, biến thể hoặc dẫn xuất của nó là tiền dược chất.

4. Nhóm dược chất gây độc tế bào Calicheamixin

B7-H3-ADC của sáng chế có thể theo cách khác hoặc ngoài ra còn bao gồm nhóm dược chất gây độc tế bào calicheamixin:



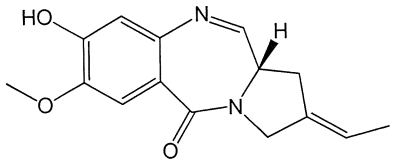
Các thể tiếp hợp kháng thể dựa trên calicheamixin được mô tả là phiên bản disulfua của hợp chất gốc trisulfua. Hai cách thức ngẫu hợp với N-axetyl-c-calicheamixin dimetyl hydrazit (CalichDMH) cho đến nay đã được báo cáo: (i) hydrazit; và (ii) ngẫu hợp amit ("*Antibody-Drug Conjugates – A New Wave Of Cancer Drugs*," Bioorganic & Medicinal Chem. Lett 24:5357-5363, (2014) của Bouchard, H. *et al.*).

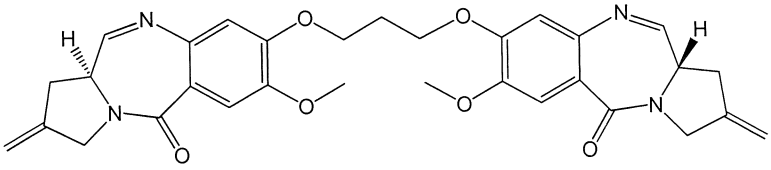
Họ calicheamixin gồm các kháng sinh chống khối u enediyne có khả năng gây đứt ADN sợi kép ở nồng độ thấp hơn picomol. Các calicheamixin là nhóm các kháng

sinh enediyne thu được từ vi khuẩn *Micromonospora echinospora*, trong đó calicheamixin γ1 là đáng chú ý nhất. Các calicheamixin khác là β1Br, γ1Br, α2I, α3I, β1I, γ1I, và Δ1I (xem "*Calicheamixins, A Novel Family Of Antitumor Antibiotics. 3. Isolation, Purification and Characterization Of Calicheamixins Beta 1Br, Gamma 1Br, Alpha 2I, Alpha 3I, Beta 1I, Gamma 1I và Delta 1I.*," J. Antibiotics 42(7):1070-1087, (1989) của Lee, M.D. *et al.*). Để điều chế các thể tiếp hợp của họ calicheamixin, xem các Patent Mỹ số 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 và 5,877,296. Các chất tương tự cấu trúc của calicheamixin có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, γ1I, α2I, α3I, N-axetyl-γ1I, PSAG và θ11 ("*Preparation and Characterization Of Monoclonal Antibody Conjugates Of The Calicheamixins: A Novel and Potent Family Of Antitumor Antibiotics*," Cancer Research 53:3336-3342 (1993), của Hinman *et al.*, "*Targeted Therapy With A Novel Enediyene Antibiotic Calicheamixin Theta(I)1 Effectively Suppresses Growth and Dissemination Of Liver Metastases In A Syngeneic Model Of Murine Neuroblastoma*," Cancer Research 58:2925-2928 (1998), của Lode *et al.*. Theo một số phương án, phân tử calicheamixin, biến thể hoặc dẫn xuất của nó là tiền dược chất.

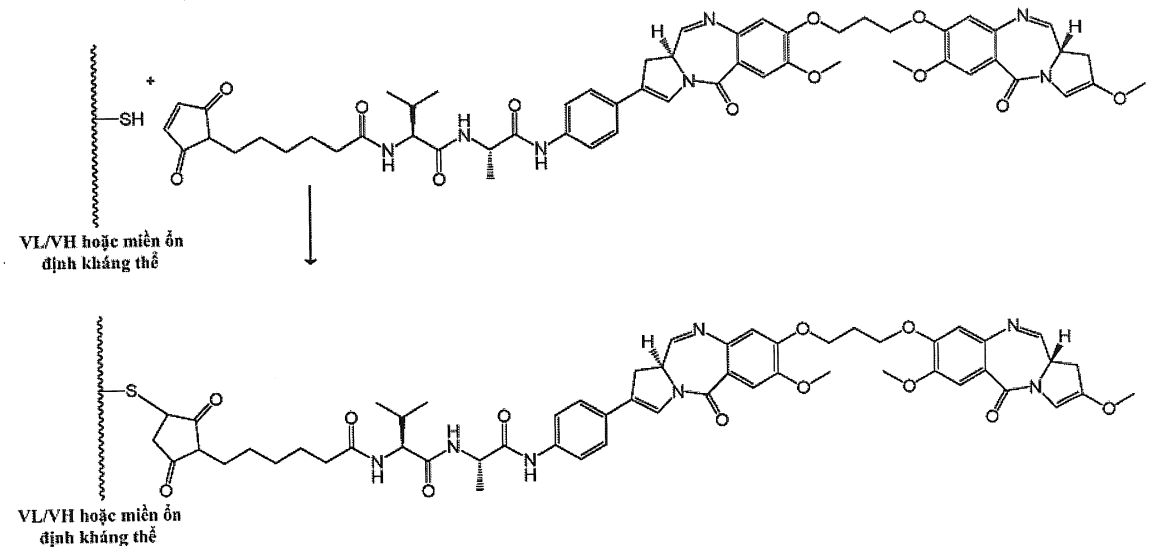
5. Nhóm dược chất gây độc tế bào pyrolobenzodiazepin

B7-H3-ADC của sáng chế có thể theo cách khác hoặc ngoài ra bao gồm nhóm dược chất pyrolobenzodiazepin (ví dụ, pyrolobenzodiazepin tự nhiên và SJG-136, dẫn xuất của nó):





Nhóm dược chất pyrolobenzodiazepin được ưu tiên là vadastuximab talirin (SGN-CD33A; Seattle Genetics):



Sơ đồ 6

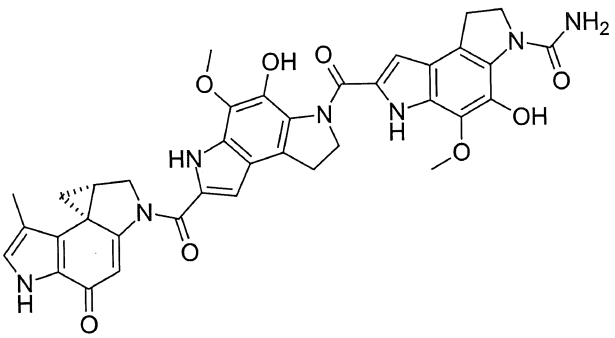
Các pyrolobenzodiazepin (PBD) là nhóm các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính kháng sinh hoặc chống khối u. Các hợp chất này được sản sinh tự nhiên bởi *actinomycetes*. Các hợp chất này là hợp chất alkyl hoá ADN và một số hợp chất là chọn lọc-trình tự. Nhiều PBD và các dẫn xuất của chúng là đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, các PBD dime (ví dụ, SJG-136 hoặc SG2000), PBD dime không bão hoà-C2, pyrolobenzodiazepin dime mang các thay thế C2 aryl (ví dụ, SG2285), PBD tiền dược chất dime được hoạt hoá bằng cách thuỷ phân (ví dụ, SG2285), và polypyrol-PBD (ví dụ, SG2274). Các PBD còn được mô tả trong: WO 2000/012507, WO 2007/039752, WO 2005/110423, WO 2005/085251, và WO 2005/040170, và WO 2014/057119. Theo một số phương án, phân tử PBD, biến thể hoặc dẫn xuất của nó là tiền dược chất.

6. Nhóm dược chất gây độc tế bào duocarmyxin

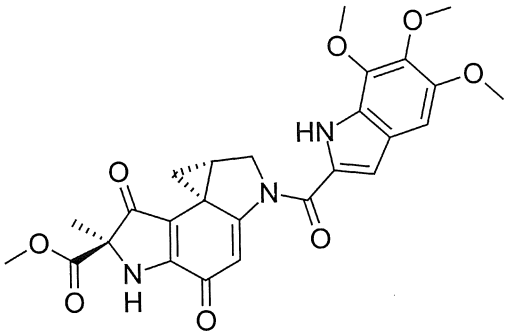
B7-H3-ADC của sáng chế có thể theo cách khác hoặc ngoài ra còn bao gồm nhóm dược chất duocarmyxin. Các duocarmycin là các thành viên của một loạt các sản phẩm tự nhiên lần đầu tiên được phân lập từ các vi khuẩn *Streptomyces* và chúng là các kháng sinh chống khối u mạnh (xem "*Preclinical Profile of the HER2-Targeting ADC SYD983/SYD985: Introduction of a New Duocarmycin-Based Linker-Drug Platform*," Mol. Cancer Ther. 13(11):2618-2629, (2014) của Dokter, W. *et al.*; "*Duocarmycins - A New Class Of Sequence Selective DNA Minor Groove Alkylating Agents*," Chemtracts: Organic Chemistry 4 (5): 329-349 (1991), của

Boger, D.L. *et al.*; "*The Cytotoxicity Of Duocarmyxin Analogues Is Mediated Through Alkylation Of DNA, Not Aldehyde Dehydrogenase 1: A Comment*," Chem. Int. Ed. Engl. 52(21):5442-5446, (2013) của Tercel *et al.*; "*CC-1065 và The Duocarmycins: Unraveling The Keys To A New Class Of Naturally Derived DNA Alkylating Agents*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92(9):3642-3649, (1995) của Boger, D.L. *et al.*; "*CC-1065 and The Duocarmycins: Recent Developments*," Expert Opinion on Therapeutic Patents 10(12):1853-1871, (2000) của Cacciari, B. *et al.*).

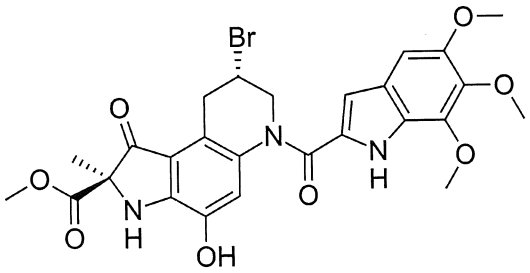
Các duocarmyxin tự nhiên bao gồm duocarmyxin A, duocarmyxin B1, doucarmxcin B2, duocarmyxin C1, duocarmyxin C2, duocarmyxin D, duocarmyxin SA, và CC-1065 (Công bố đơn PCT số WO 2010/062171; "*Structure Of CC-1065 (NSC 298223), A New Antitumor Antibiotic*," J. Antibiotics 33:902-903, (1980) của Martin, D.G. *et al.*; "*CC-1065 và The Duocarmycins: Unraveling The Keys To A New Class Of Naturally Derived DNA Alkylating Agents*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:3642-3649, (1995) của Boger, D.L. *et al.*).



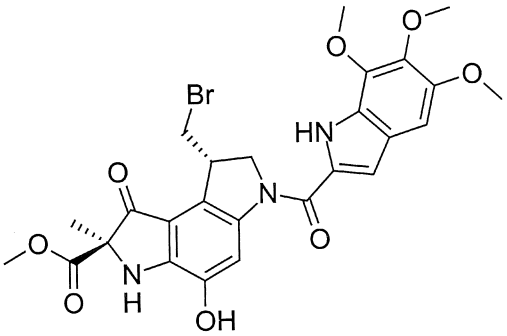
CC-1065



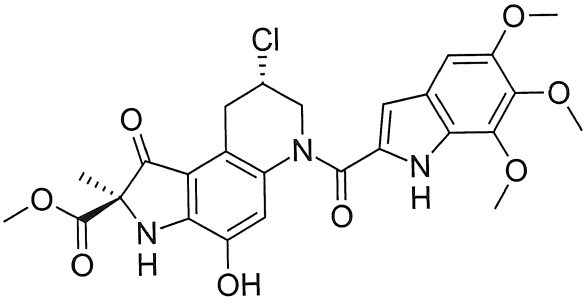
Duocarmyxin A



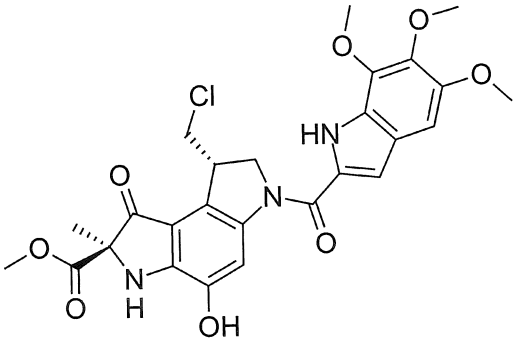
Duocarmyxin B1



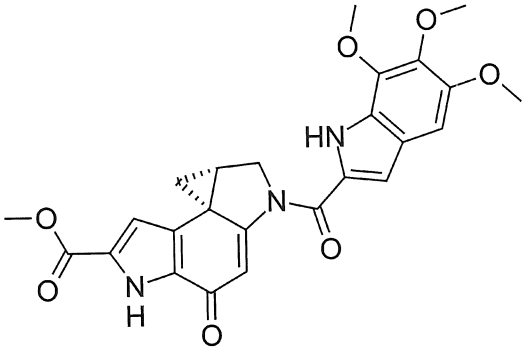
Duocarmyxin B2



Duocarmyxin C1

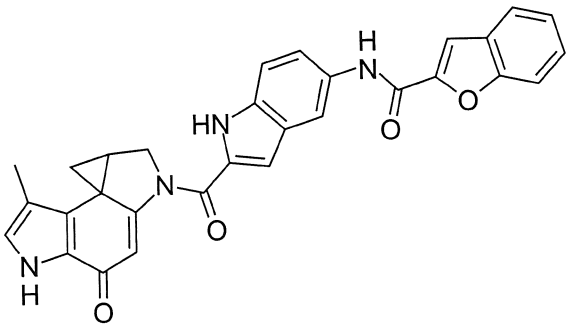


Duocarmyxin C2

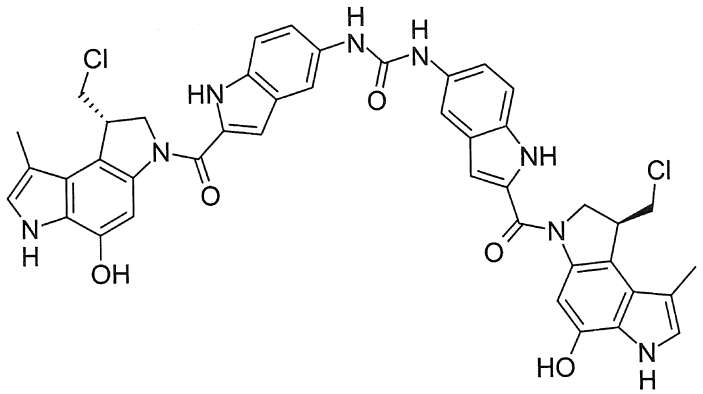


Duocarmyxin SA

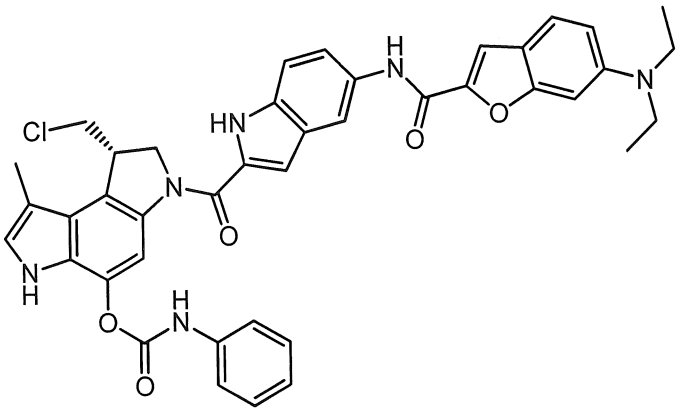
Các chất tương tự duocarmyxin tổng hợp thích hợp bao gồm adozelesin, bizelesin, carzelesin (U-80244) và spiro-duocarmyxin (DUBA) ("*Preclinical Profile of the HER2-Targeting ADC SYD983/SYD985: Introduction of a New Duocarmycin-Based Linker-Drug Platform*," Mol. Cancer Ther. 13(11):2618-2629, (2014) của Dokter, W. *et al.*; "*Design, Synthesis, và Evaluation of Linker-Duocarmyxin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody–Drug Conjugate SYD985*," Mol. Pharmaceut. 12:1813-1835, (2014) của Elgersma, R.C. *et al.*):



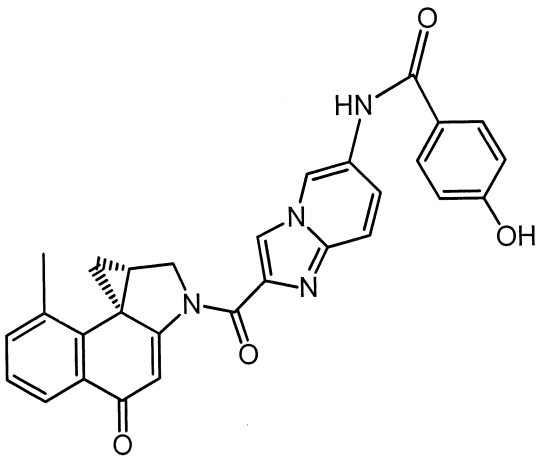
Adozelesin



Bizelesin

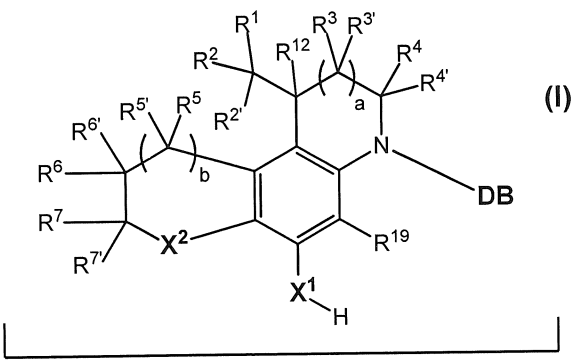


Carzelesin



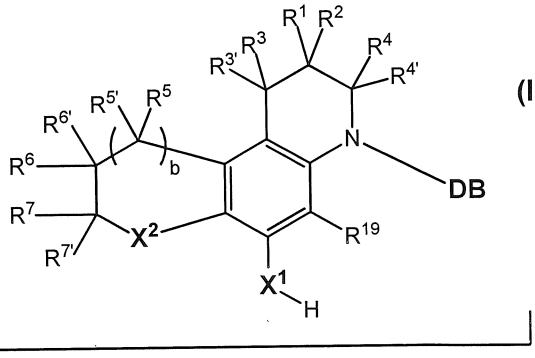
DUBA (*spiro*-duocarmyxin)

Các chất tương tự duocarmyxin tổng hợp bổ sung bao gồm các chất được đề cập trong Công bố đơn PCT số WO 2010/062171, và cụ thể là các chất tương tự có công thức:



(I)

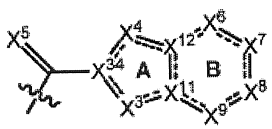
DA1



(II)

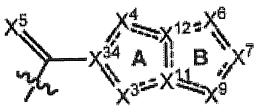
DA2

hoặc muối, hydrat hoặc solvat dược dụng của chúng, trong đó DB là nhóm gắn kết-ADN và được chọn từ nhóm gồm:



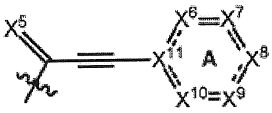
DB1

và

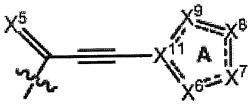


DB2

và

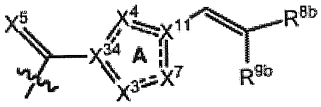


DB3



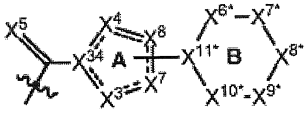
DB4

và

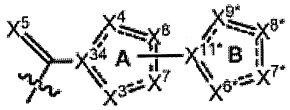


DB5

và

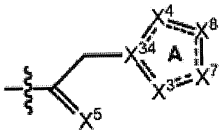


DB6



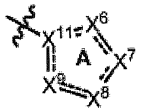
DB7

và



DB8

và



DB9

trong đó:

R là nhóm dời chuyển;

R^2, $R^{2'}$, R^3, $R^{3'}$, R^4, $R^{4'}$, R^{12}, và R^{19} độc lập được chọn từ H, OH, SH, NH_2, N_3, NO_2, NO, CF_3, CN, $C(O)NH_2$, C(O)H, C(O)OH, halogen, Ra, SR^a, $S(O)R^a$, $S(O)2R^a$, $S(O)OR^a$, $S(O)_2OR^a$, $OS(O)R^a$, $OS(O)_2R^a$, $OS(O)OR^a$, $OS(O)_2OR^a$, OR^a, NHR^a, $N(R^a)R^b$, $+N(R^a)(R^b)R^c$, $P(O)(OR^a)(OR^b)$, $OP(O)(OR^a)(OR^b)$, $SiR^aR^bR^c$, $C(O)R^a$, $C(O)OR^a$, $C(O)N(R^a)R^b$, $OC(O)R^a$, $OC(O)OR^a$, $OC(O)N(R^a)R^b$, $N(R^a)C(O)R^b$, $N(R^a)C(O)OR^b$, và $N(R^a)C(O)N(R^b)R^c$, trong đó R^a, R^b, và R^c độc lập được chọn từ H và C_{1-3} alkyl hoặc C_{1-3} heteroalkyl được thế tùy ý, hoặc $R^3 + R^{3'}$ và/hoặc $R^4 + R^{4'}$ độc lập được chọn từ =O, =S, $=NOR^{18}$, $=C(R^{18})R^{18'}$, và $=NR^{18}$, R^{18} và $R^{18'}$ độc lập được chọn từ H và C_{1-3} alkyl tùy ý được thế, hai hoặc nhiều nhóm trong số R^2, $R^{2'}$,

R^3, $R^{3'}$, R^4, $R^{4'}$ và R^{12} tùy ý được nối bằng một hoặc nhiều liên kết để tạo thành một hoặc nhiều vòng cacbon và/hoặc dị vòng được thế tùy ý;

X^2 được chọn từ O, $C(R^{14})(R^{14'})$, và $NR^{14'}$, trong đó R^{14} và $R^{14'}$ được xác định như R^7 và được lựa chọn một cách độc lập, hoặc $R^{14'}$ và $R^{7'}$ là không có dẫn đến liên kết đôi giữa các nguyên tử được ký hiệu mang nhóm $R^{7'}$ và $R^{14'}$;

R^5, $R^{5'}$, R^6, $R^{6'}$, R^7, và $R^{7'}$ độc lập được chọn từ H, OH, SH, NH_2, N_3, NO_2, NO, CF_3, CN, $C(O)NH_2$, C(O)H, C(O)OH, halogen, R^e, SR^e, $S(O)R^e$, $S(O)_2R^e$, $S(O)OR^e$, $S(O)_2OR^e$, $OS(O)R^e$, $OS(O)_2R^e$, $OS(O)OR^e$, $OS(O)_2OR^e$, OR^e, NHR^e, $N(R^e)R^f$, $^+N(R^e)(R^f)R^g$, $P(O)(OR^e)(OR^f)$, $OP(O)(OR^e)(OR^f)$, $SiR^eR^fR^g$, $C(O)R^e$, $C(O)OR^e$, $C(O)N(R^e)R^f$, $OC(O)R^e$, $OC(O)OR^e$, $OC(O)N(R^e)R^f$, $N(R^e)C(O)R^f$, $N(R^e)C(O)OR^f$, $N(R^e)C(O)N(R^f)R^g$, và nhóm tan trong nước,

trong đó

R^e, R^f, và R^g độc lập được chọn từ H và $(CH_2CH_2O)_{ee}CH_2CH_2X^{13}R^{e1}$, C_{1-15} alkyl, C_{1-15} heteroalkyl, C_{3-15} xycloalkyl, C_{1-15} heteroxycloalkyl, C_{5-15} aryl, hoặc C_{1-15} heteroaryl tùy ý được thế, trong đó ee được chọn từ 1 đến 1000, X^{13} được chọn từ O, S, và NR^{f1}, và R^{f1} và R^{e1} độc lập được chọn từ H và C_{1-3} alkyl, một hoặc nhiều nhóm thế tùy ý trên R^e, R^f, và/hoặc R^g tùy ý là nhóm tan trong nước, hai hoặc nhiều nhóm trong số R^e, R^f, và R^g tùy ý được nối bằng một hoặc nhiều liên kết để tạo thành một hoặc nhiều vòng cacbon và/hoặc dị vòng được thế tùy ý,

hoặc $R^5 + R^{5'}$ và/hoặc $R^6 + R^{6'}$ và/hoặc $R^7 + R^{7'}$ độc lập được chọn từ =O, =S, $=NOR^{e3}$, $=C(R^{e3})R^{e4}$, và $=NR^{e3}$, R^{e3} và R^{e4} độc lập được chọn từ H và C_{1-3} alkyl được thế tùy ý, hoặc $R^{5'} + R^{6'}$ và/hoặc $R^{6'} + R^{7'}$ và/hoặc $R^{7'} + R^{14'}$ là không có, dẫn đến tạo thành liên kết đôi giữa các nguyên tử được ký hiệu tương ứng mang nhóm $R^{5'} + R^{6'}$ và/hoặc $R^{6'} + R^{7'}$ và/hoặc $R^{7'} + R^{14'}$, hai hoặc nhiều nhóm trong số R^5, $R^{5'}$, R^6, $R^{6'}$, R^7, $R^{7'}$, R^{14} và $R^{14'}$ tùy ý được nối bằng một hoặc nhiều liên kết để tạo thành một hoặc nhiều vòng cacbon và/hoặc dị vòng được thế tùy ý;

X^1 được chọn từ O, S, và NR, trong đó R được chọn từ H và C_{1-8} alkyl hoặc C_{1-8} heteroalkyl được thế tùy ý và không được nối bằng nhóm thế khác bất kỳ;

X^3 được chọn từ O, S, $C(R^{15})R^{15'}$, $-C(R^{15})(R^{15'})-C(R^{15''})(R^{15'''})-$, $-N(R^{15})-N(R^{15'})-$, $-C(R^{15})(R^{15'})-N(R^{15''})-$, $-N(R^{15''})-C(R^{15})(R^{15'})-$, $-C(R^{15})(R^{15'})-O-$, $-O-C(R^{15})(R^{15'})-$, $-C(R^{15})(R^{15'})-S-$, $-S-C(R^{15})(R^{15'})-$, $-C(R^{15})=C(R^{15'})-$, $=C(R^{15})-C(R^{15'})=$, $-N= C(R^{15'})-$, $=N- C(R^{15'})=$, $-C(R^{15})=N-$, $=C(R^{15})-N=$, $-N=N-$, $=N-N=$, CR^{15}, N, NR^{15}, hoặc trong DB1 và DB2-X3- là $-X^{3a}$ và $X^{3b}-$, trong đó X^{3a} được nối với X^{34}, có liên kết đôi giữa X^{34} và X^4, và X^{3b} được nối với X^{11}, trong đó X^{3a} độc lập được chọn từ H và $(CH_2CH_2O)_{ee}CH_2CH_2X^{13}R^{e1}$, C_{1-8} alkyl, hoặc C_{1-8} heteroalkyl được thế tùy ý và không được nối bằng nhóm thế khác bất kỳ;

X^4 được chọn từ O, S, $C(R^{16})R^{16'}$, NR^{16}, N, và CR^{16};

X^5 được chọn từ O, S, $C(R^{17})R^{17'}$, NOR^{17}, và NR^{17}, trong đó R^{17} và $R^{17'}$ độc lập được chọn từ H và C_{1-8} alkyl hoặc C_{1-8} heteroalkyl được thế tùy ý và không được nối bằng nhóm thế khác bất kỳ;

X^6 được chọn từ CR^{11}, $CR^{11}(R^{11'})$, N, NR^{11}, O, và S;

X^7 được chọn từ CR^8, $CR^8(R^{8'})$, N, NR^8, O, và S;

X^8 được chọn từ CR^9, $CR^9(R^{9'})$, N, NR^9, O, và S;

X^9 được chọn từ CR^{10}, $CR^{10}(R^{10'})$, N, NR^{10}, O, và S;

X^{10} được chọn từ CR^{20}, $CR^{20}(R^{20'})$, N, NR^{20}, O, và S;

X^{11} được chọn từ C, CR^{21}, và N, hoặc X^{11}-X^{3b} được chọn từ CR^{21}, $CR^{21}(R^{21'})$, N, NR^{21}, O, và S;

X^{12} được chọn từ C, CR^{22}, và N;

X^{6*}, X^{7*}, X^{8*}, X^{9*}, X^{10*}, và X^{11*} được xác định tương ứng như X^6, X^7, X^8, X^9, X^{10}, và X^{11}, và được lựa chọn một cách độc lập;

X^{34} được chọn từ C, CR^{23}, và N;

nguyên tử vòng B của X^{11*} trong DB6 và DB7 được nối với nguyên tử vòng của vòng A sao cho vòng A và vòng B trong DB6 và DB7 được nối trực tiếp bằng một liên kết đơn;

liên kết đôi vạch đứt quãng chỉ liên kết có thể là liên kết đơn hoặc liên kết đôi, được chuyển vị tùy ý, không tích luỹ;

mỗi R^8, $R^{8'}$, R^9, $R^{9'}$, R^{10}, $R^{10'}$, R^{11}, $R^{11'}$, R^{15}, $R^{15'}$, $R^{15''}$, $R^{15''}$, R^{16}, $R^{16'}$, R^{20}, $R^{20'}$, R^{21}, $R^{21'}$, R^{22}, và R^{23} độc lập được chọn từ H, OH, SH, NH_2, N_3, NO_2, NO, CF_3, CN, $C(O)NH_2$, C(O)H, C(O)OH, halogen, R^h, SR^h, $S(O)R^h$, $S(O)_2R^h$, $S(O)OR^h$, $S(O)_2OR^h$, $OS(O)R^h$, $OS(O)_2R^h$, $OS(O)OR^h$, $OS(O)_2OR^h$, OR^h, NHR^h, $N(R^h)R^i$, $N(R^h)(R^i)R^j$, $P(O)(OR^h)(OR^i)$, $OP(O)(OR^h)(OR^i)$, $SiR^hR^iR^j$, $C(O)R^h$, $C(O)OR^h$, $C(O)N(R^h)R^i$, $OC(O)R^h$, $OC(O)OR^h$, $OC(O)N(R^h)R^i$, $N(R^h)C(O)R^i$, $N(R^h)C(O)OR^i$, $N(R^h)C(O)N(R^i)R^j$, và nhóm tan trong nước, trong đó

> R^h, R^i, và R^j độc lập được chọn từ H và $(CH_2CH_2O)_{ee}CH_2CH_2X^{13}R^{e1}$, C_{1-15} alkyl, C_{1-15} heteroalkyl, C_{3-15} xycloalkyl, C_{1-15} heteroxycloalkyl, C_{5-15} aryl, hoặc C_{1-15} heteroaryl được thế tùy ý, một hoặc nhiều nhóm thế tùy ý trên R^h, R^i, và/hoặc R^j tùy ý là nhóm tan trong nước, hai hoặc nhiều nhóm trong số R^h, R^i, và R^j tùy ý được nối bằng một hoặc nhiều liên kết để tạo thành một hoặc nhiều vòng cacbon và/hoặc dị vòng được thế tùy ý,

hoặc $R^8 + R^{8'}$ và/hoặc $R^9 + R^{9'}$ và/hoặc $R^{10} + R^{10'}$ và/hoặc $R^{11} + R^{11'}$ và/hoặc $R^{15} + R^{15'}$ và/hoặc $R^{15''} + R^{15'''}$ và/hoặc $R^{16} + R^{16'}$ và/hoặc $R^{20} + R^{20'}$ và/hoặc $R^{21} + R^{21'}$ độc lập được chọn từ =0, =S, $=NOR^{h1}$, $= C(R^{h1})R^{h2}$, và $=NR^{h1}$, R^{h1} và R^{h2} độc lập được chọn từ H và C_{1-3} alkyl được thế tùy ý, hai hoặc nhiều nhóm trong số R^8, $R^{8'}$, R^9, $R^{9'}$, R^{10}, $R^{10'}$, R^{11}, $R^{11'}$, R^{15}, $R^{15'}$, $R^{15''}$, $R^{15'''}$, R^{16}, R^{20}, $R^{20'}$, R^{21}, $R^{21'}$, R^{22}, và R^{23} tùy ý được nối bằng một hoặc nhiều liên kết để tạo thành một hoặc nhiều vòng cacbon và/hoặc dị vòng được thế tùy ý;

R^{8b} và R^{9b} được lựa chọn một cách độc lập và đươc xác định như R^8, ngoại trừ các nhóm này có thể không được nối với nhóm thế khác bất kỳ;

một nhóm trong số R^4 và $R^{4'}$ và một nhóm trong số R^{16} và $R^{16'}$ có thể được nối tùy ý bằng một hoặc nhiều liên kết để tạo thành một hoặc nhiều vòng cacbon và/hoặc dị vòng được thế tùy ý;

một nhóm trong số R^4 và $R^{4'}$ và một nhóm trong số R^{16} và $R^{16'}$ có thể được nối tùy ý bằng

một nhóm trong số R^2, $R^{2'}$, R^3, và $R^{3'}$ và một nhóm trong số R^5 và $R^{5'}$ có thể được nối tùy ý bằng một hoặc nhiều liên kết để tạo thành một hoặc nhiều vòng cacbon và/hoặc dị vòng được thế tùy ý;

a và b độc lập được chọn từ 0 và 1;

nhóm DB không bao gồm nhóm DAI, DA2, DAI', hoặc DA2';

vòng B trong DB1 là dị vòng;

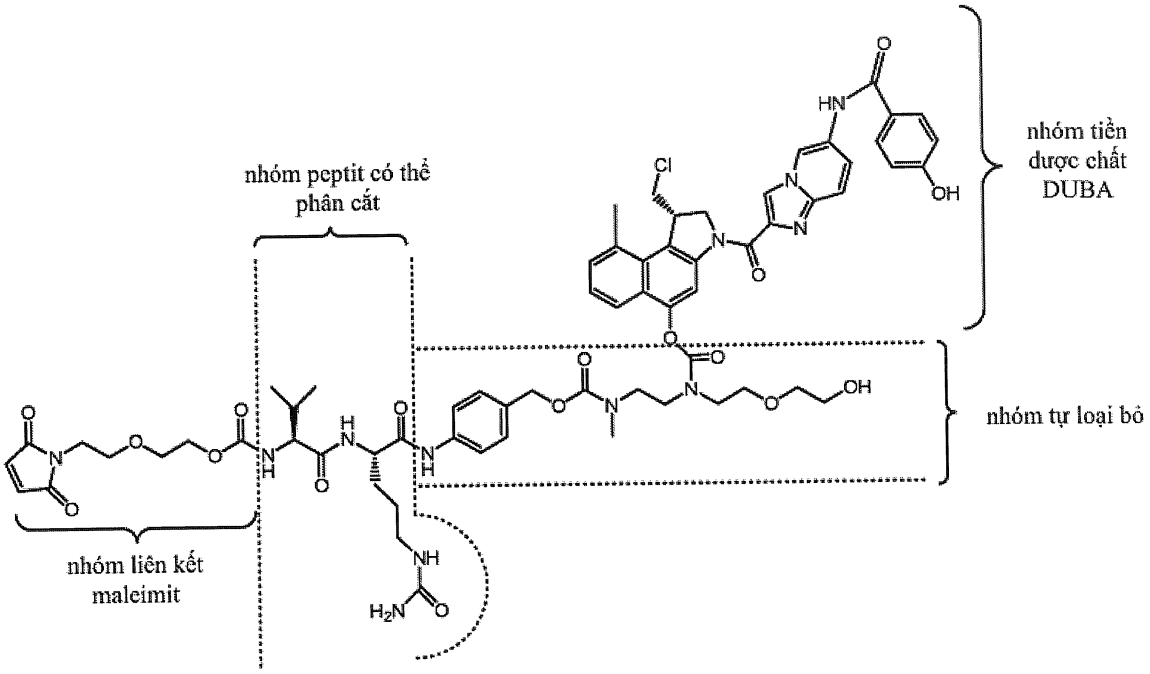
nếu X^3 trong DB1 là $-X^{3a}$ và $X^{3b}-$ và vòng B là thơm, thì hai nhóm thế cạnh nhau trên vòng B này được nối để tạo thành dị vòng hoặc vòng cacbon được thế tùy ý được dung hợp với vòng B này;

nếu X^3 trong DB2 là $-X^{3a}$ và $X^{3b}-$ và vòng B là thơm, thì hai nhóm thế cạnh nhau trên vòng B này được nối để tạo thành dị vòng được thế tùy ý được dung hợp với vòng B này, vòng cacbon không-thơm được thế tùy ý được dung hợp với vòng B này, hoặc vòng cacbon thơm được thế mà được dung hợp với vòng B này và mà ít nhất một nhóm thế được gắn với vòng này có chứa nhóm hydroxy, nhóm amino bậc một, hoặc nhóm amino bậc hai, amin bậc một hoặc bậc hai này không phải là nguyên tử của vòng trong hệ vòng thơm cũng như không phải là một phần của nhóm amit;

nếu vòng A trong DB2 là vòng thơm 6-cạnh, thì các nhóm thế trên vòng B không được nối để tạo thành vòng được dung hợp với vòng B;

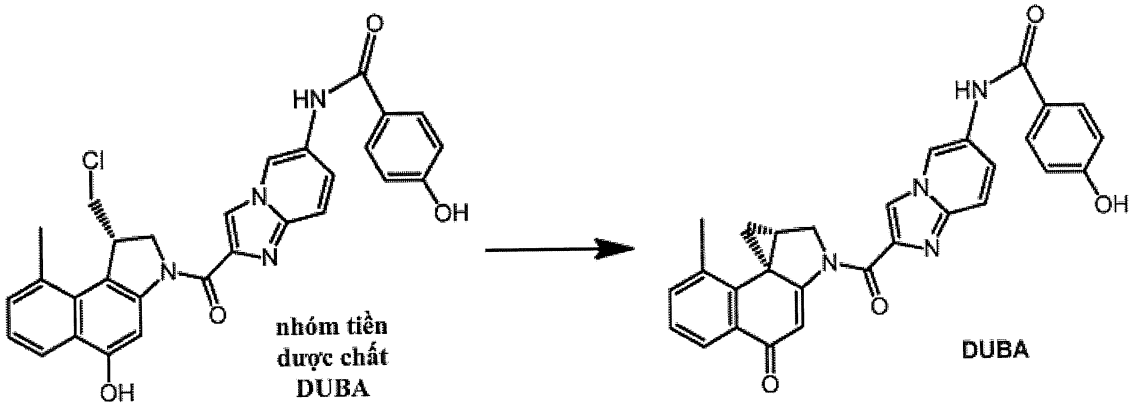
hai nhóm thế cạnh nhau trên vòng A trong DB8 được nối để tạo thành dị vòng hoặc vòng cacbon được thế tùy ý được dung hợp với vòng A này để tạo thành nhóm hai vòng mà không có vòng nào khác dung hợp với nhóm này; và vòng A trong DB9 cùng với vòng bất kỳ được dung hợp với vòng A này ít nhất có chứa hai dị nguyên tử vòng.

Các phân tử liên kết nêu trên có thể được tiếp hợp với nhóm thiol xystein bằng cách sử dụng hoá học thiol-maleimit, như thể hiện ở trên. Theo một số phương án, nhóm dược chất duocarmyxin độc tế bào là tiền dược chất. Ví dụ, tiền dược chất, vc-*seco*-DUBA có thể được tiếp hợp với nhóm tự loại bỏ được liên kết với nhóm liên kết maleimit thông qua nhóm peptit có thể phân cắt:



Sơ đồ 7

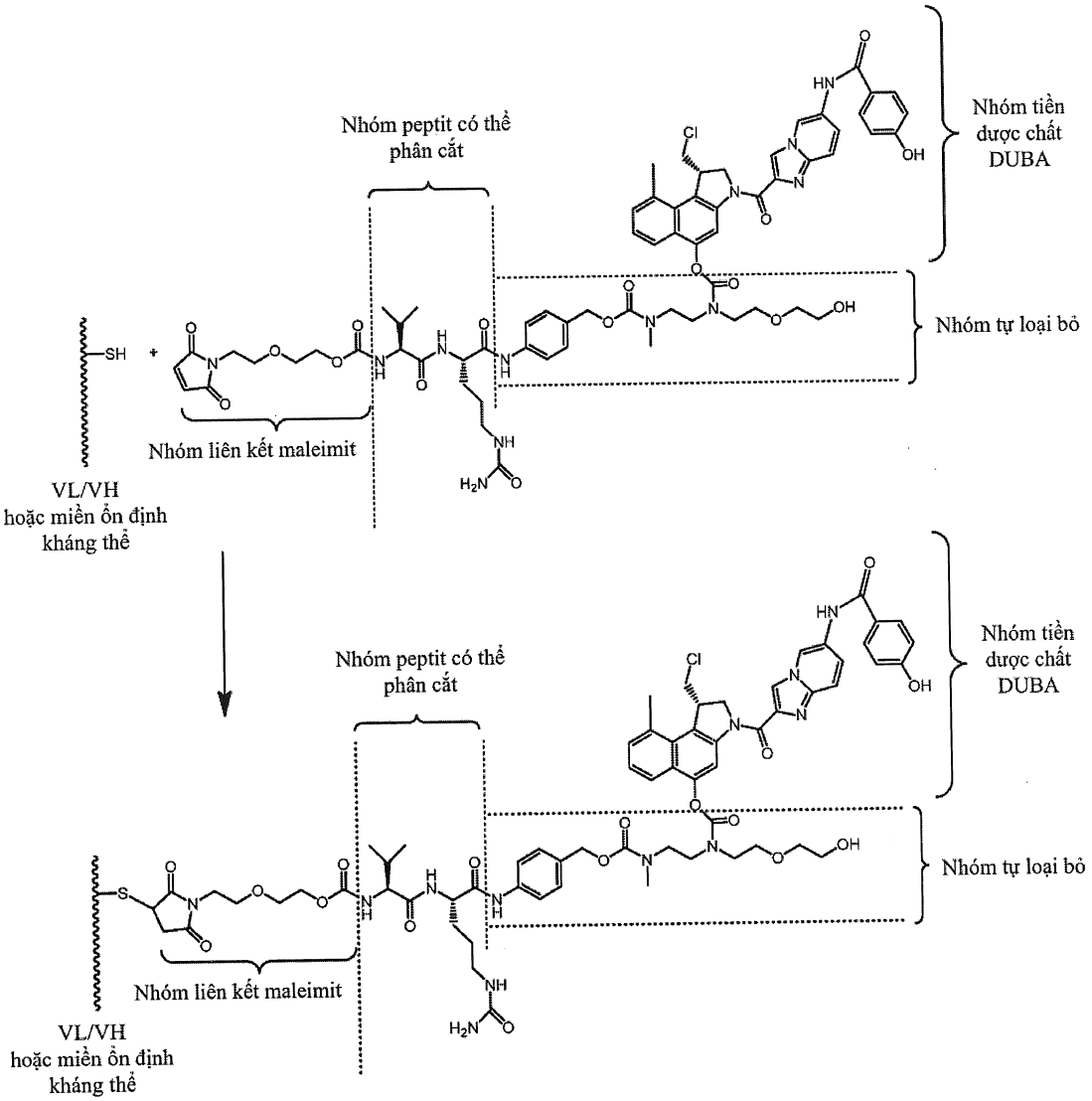
Nhóm liên kết maleimit của phân tử này có thể được tiếp hợp với nhóm thiol của gốc xystein của miền VL và/hoặc miền VH và/hoặc miền ổn định của phần Ab của B7-H3-ADC của sáng chế. Tiếp theo sự phân cắt phân giải protein sau đó đối với nhóm peptit có thể phân cắt là việc loại bỏ tức thời nhóm tự loại bỏ, dẫn đến giải phóng *seco*-DUBA, hợp chất này tức thời sắp xếp lại để tạo thành dược chất hoạt tính, DUBA:



Sơ đồ 8

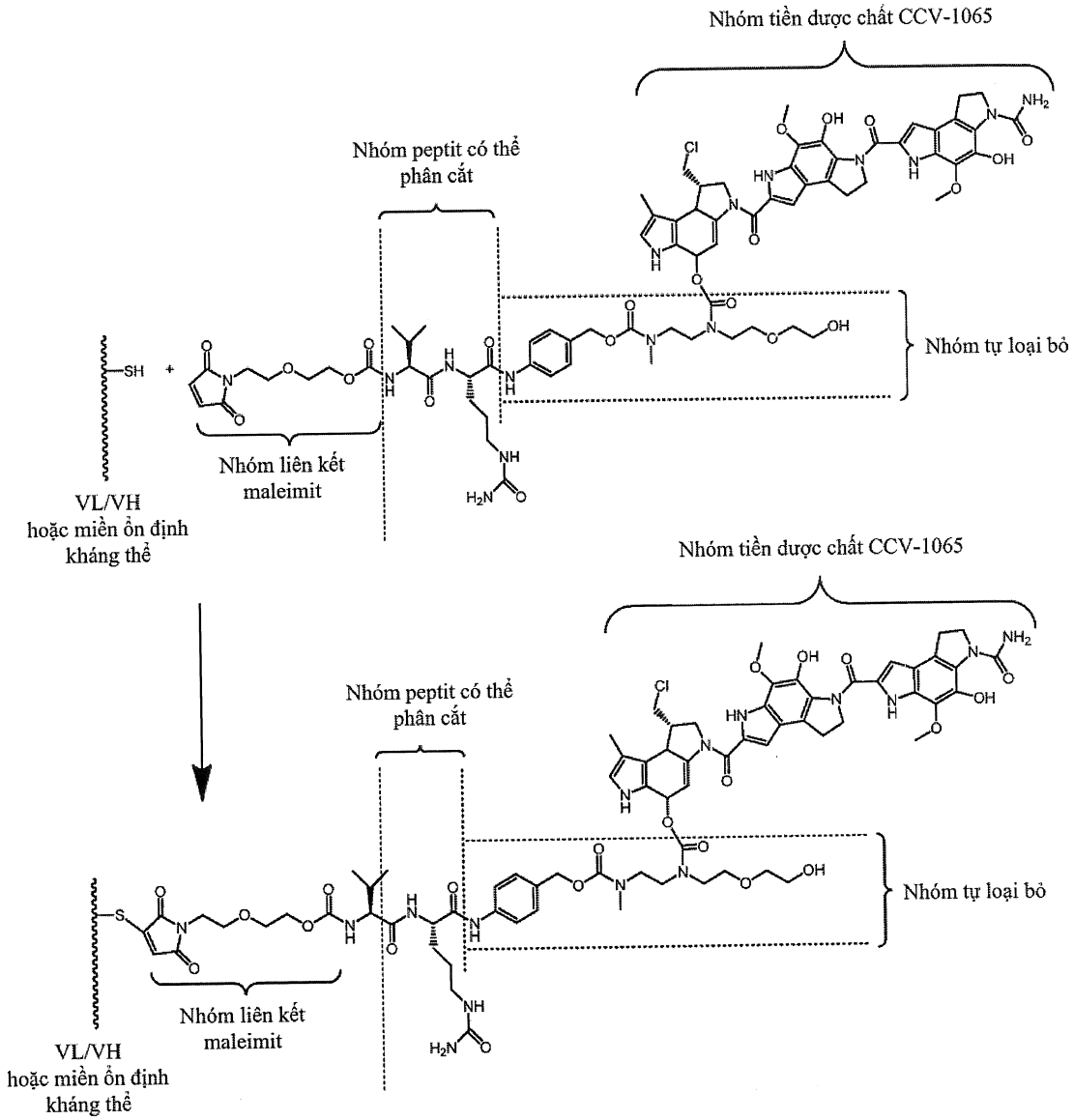
(xem, "*Preclinical Profile of the HER2-Targeting ADC SYD983/SYD985: Introduction of a New Duocarmycin-Based Linker-Drug Platform*," Mol. Cancer Ther. 13(11):2618-2629 (2014) của Dokter, W. *et al.*).

Theo phương pháp ưu tiên để sản xuất các thể tiếp hợp dược chất B7-H3-duocarmyxin, sẽ sử dụng phương pháp của Elgersma, R.C. *et al.* trong: "*Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmyxin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody−Drug Conjugate SYD985*," Mol. Pharmaceut. 12:1813-1835, (2014) hoặc phương pháp trong WO 2011/133039. Do đó, nhóm có chứa-thiol của chuỗi VL hoặc VH của kháng thể kháng-B7-H3 hoặc mảnh kháng thể được tiếp hợp với *seco*-DUBA hoặc tiền dược chất khác thông qua nhóm liên kết maleimit-nhóm peptit có thể phân cắt-nhóm tự loại bỏ (Sơ đồ 9A):


Nhóm peptit có thể phân cắt
Nhóm tiền dược chất DUBA
Nhóm tự loại bỏ
Nhóm liên kết maleimit
VL/VH hoặc miền ổn định kháng thể
Nhóm peptit có thể phân cắt
Nhóm tiền dược chất DUBA
Nhóm tự loại bỏ
Nhóm liên kết maleimit
VL/VH hoặc miền ổn định kháng thể

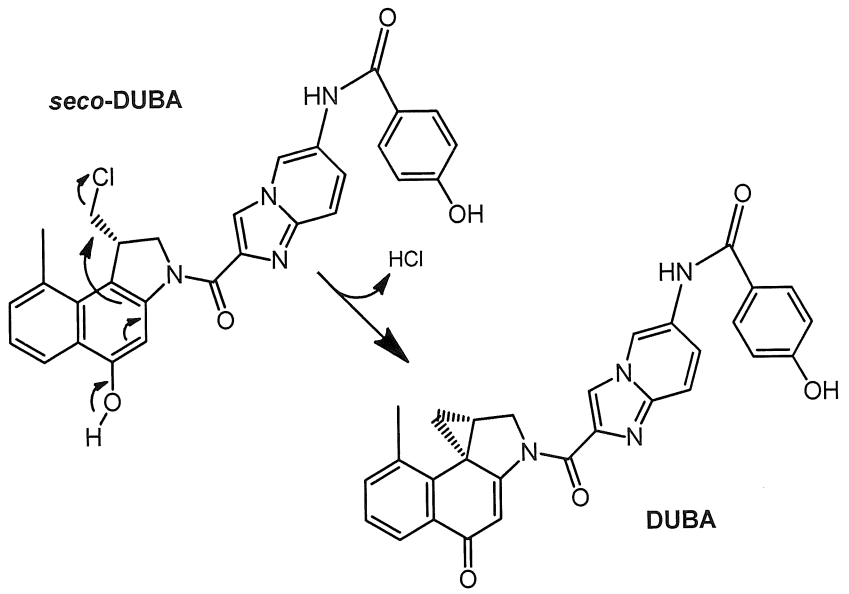
Sơ đồ 9A

Mặc dù sáng chế được minh họa với tiền dược chất DUBA, theo cách khác có thể sử dụng các tiền dược chất khác, ví dụ, CC-1065, như thể hiện trong Sơ đồ 9B:



Sơ đồ 9B

Khi phân cắt nhóm nhóm peptit có thể phân cắt và loại bỏ nhóm tự loại bỏ, nhóm tiền dược chất được cho là trải qua sự đóng vòng spiro Winstein để tạo ra dược chất có hoạt tính (ví dụ, DUBA từ *seco*-DUBA như thể hiện trong Sơ đồ 9C).

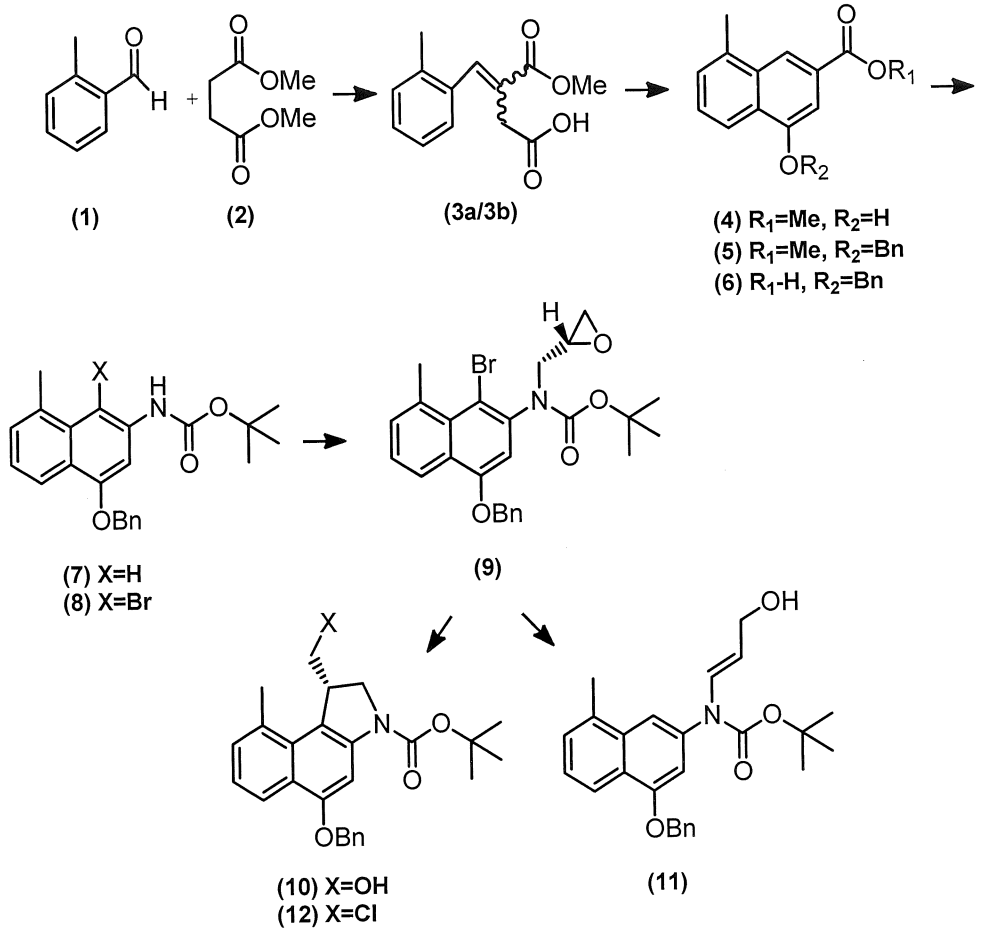


Sơ đồ 9C

seco-DUBA được điều chế từ các nhóm alkyl hoá-ADN và gắn kết-ADN tương ứng (ví dụ, khung 1,2,9,9a-tetrahydroxyclopropa-[*c*]benzo[*e*]indol-4-on như Elgersma, R.C. *et al.* mô tả trong: "*Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmyxin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody–Drug Conjugate SYD985*," Mol. Pharmaceut. 12:1813-1835, (2014) (xem, "*Total Synthesis and Evaluation of (±)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-CBI, (±)-CBI-CDPI1, and (±)-CBI-CDPI2: CC-1065 Functional Agents Incorporating the Equivalent 1,2,9,9a-Tetrahydrocyclopropa[1,2-c]benz[1,2-e]indol-4-one (CBI) Left-Hand Subunit*," J. Am. Chem. Soc. 111:6461-6463, (1989) của Boger, D.L. *et al.*; "*DNA Alkylation Properties of Enhanced Functional Analogs of CC-1065 Incorporating the 1,2,9,9a-Tetrahydrocyclopropa[1,2-c]benz[1,2-e]indol-4-one (CBI) Alkylation Subunit*," J. Am. Chem. Soc. 114:5487-5496, (1992) của Boger, D.L. *et al.*).

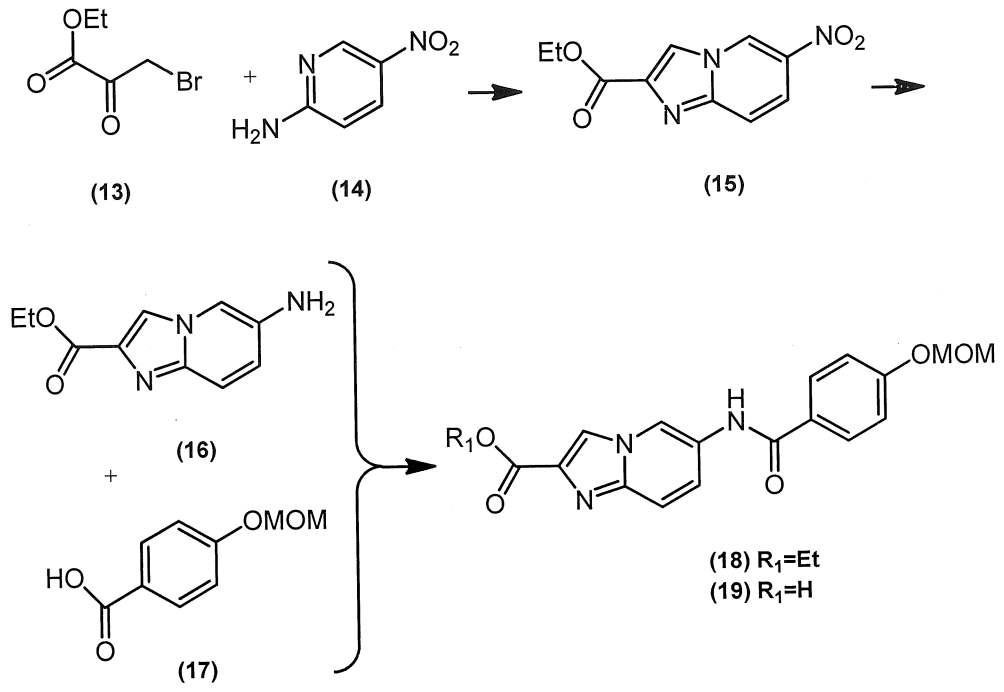
Sơ đồ 9D minh họa sáng chế bằng cách thể hiện quá trình tổng hợp nhóm alkyl hoá-ADN cho DUBA. Theo đó, *o*-tolualdehyt (1) và dimetyl sucxinat (2) được cho phản ứng để tạo ra hỗn hợp gồm các axit (3a/3b) thông qua ngưng tụ Stobbe. Đóng vòng hỗn hợp các axit này có thể đạt được bằng anhydrit của trifloaxetic và tạo ra

rượu (4), rượu này tiếp đó được bảo vệ bằng benzyl clorua để tạo ra benzyl ete (5). Sau đó thuỷ phân nhóm metyl este thu được axit carboxylic (6), axit này tiếp đó được sắp xếp lại Curtius trong hỗn hợp gồm toluen và rượu tert-butyl để tạo ra carbamat (7). Bromua hoá bằng N-bromosucxinimit tạo ra bromua (8). Bromua (8) này được alkyl hoá bằng (S)-glyxidyl nosylat với sự có mặt của kali *tert*-butoxit tạo ra epoxit (9). Phản ứng với n-butyllithi tạo ra hỗn hợp gồm hợp chất mong muốn (10) và dẫn xuất đã sắp xếp lại và khử brom (11). Hiệu suất đối với hợp chất mong muốn (10) là cao hơn khi tetrahydrofuran được sử dụng làm dung môi và nhiệt độ phản ứng được giữ trong khoảng -25 và -20°C. Trong các điều kiện này, hợp chất mong muốn (10) và dẫn xuất đã sắp xếp lại và khử brom (11) có thể thu được theo tỷ lệ xấp xỉ bằng 1:1. Xử lý với axit *p*-toluensulfonic dẫn đến chuyển hoá dẫn xuất đã sắp xếp lại và khử brom (11) thành hợp chất (7), nhờ đó hỗ trợ thu hồi hợp chất mong muốn (10). Mesyl hoá nhóm hydroxyl trên hợp chất (10) tiếp theo là thay thế clorua bằng cách sử dụng lithi clorua cho hợp chất trung gian chính (12).



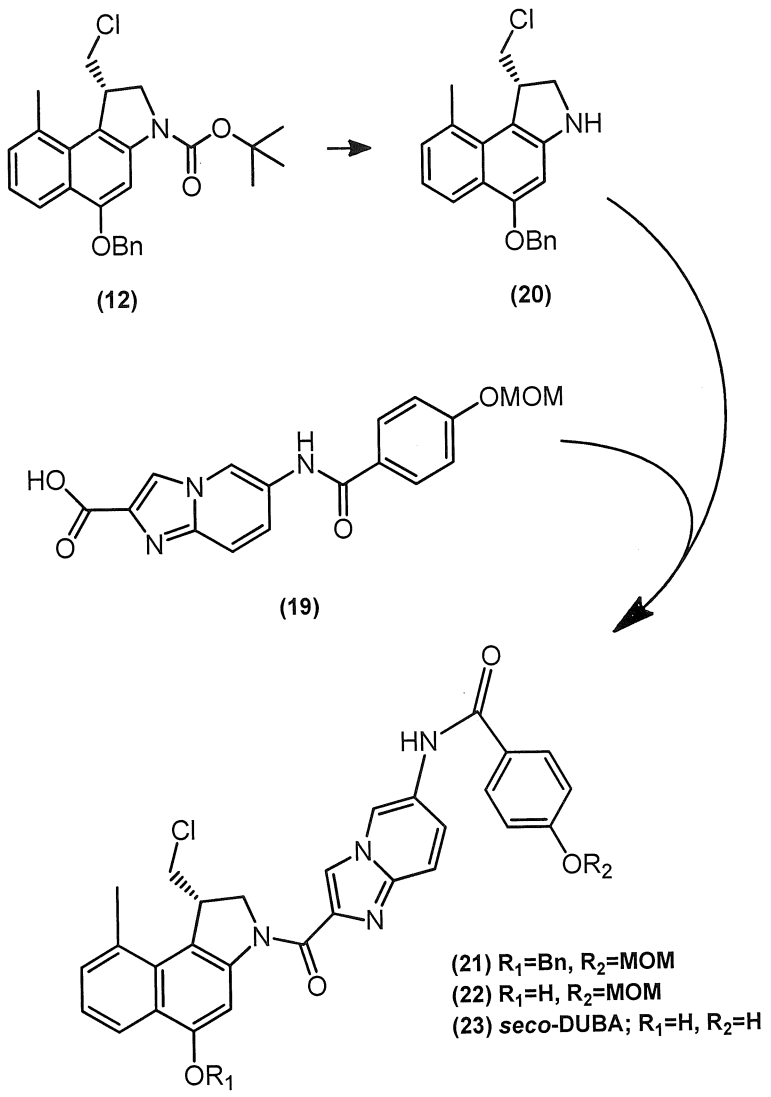
Sơ đồ 9D

Sơ đồ 9E minh họa sáng chế bằng cách thể hiện quy trình tổng hợp nhóm gắn kết-ADN cho DUBA. Do đó, phản ứng đóng vòng Chichibabin được cho phép xảy ra giữa etyl bromopyruvat (13) và 5-nitropyridin-2-amin (14), nhờ đó thu được hợp chất (15). Khử nhóm nitro bằng kẽm trong các điều kiện axit tạo ra amin (16). Ngẫu hợp với axit 4-hydroxybenzoic được bảo vệ bằng-metoxymetyl (MOM) (17), được điều chế từ metyl 4-hydroxybenzoat bằng cách cho phản ứng với clometyl metyl ete tiếp đó thuỷ phân este (xem, WO 2004/080979) thu được etyl este (18), hợp chất này có thể được thuỷ phân bằng natri hydroxit trong 1,4-dioxan trong nước để tạo ra axit (19).



Sơ đồ 9E

seco-DUBA tiếp đó được tổng hợp từ đơn vị alkyl hoá-ADN (12) và nhóm gắn kết-ADN (19). Loại bỏ nhóm bảo vệ tert-butoxycarbonyl (Boc) từ hợp chất (12) trong điều kiện axit để tạo thành amin (20). Ngẫu hợp amin (20) và hợp chất (19) qua trung gian-EDC thu được hợp chất được bảo vệ (21), hợp chất này tiếp đó được khử bảo vệ hoàn toàn theo hai bước kế tiếp (bằng Pd/C, NH_4HCO_2, MeOH/THF, 3 giờ, 90%, thu được hợp chất (22) và tiếp đó bằng HCl, 1,4-dioxan/nước, 1 giờ, 95% để tạo ra *seco*-DUBA (23) dưới dạng muối HCl của nó (Sơ đồ 9F).

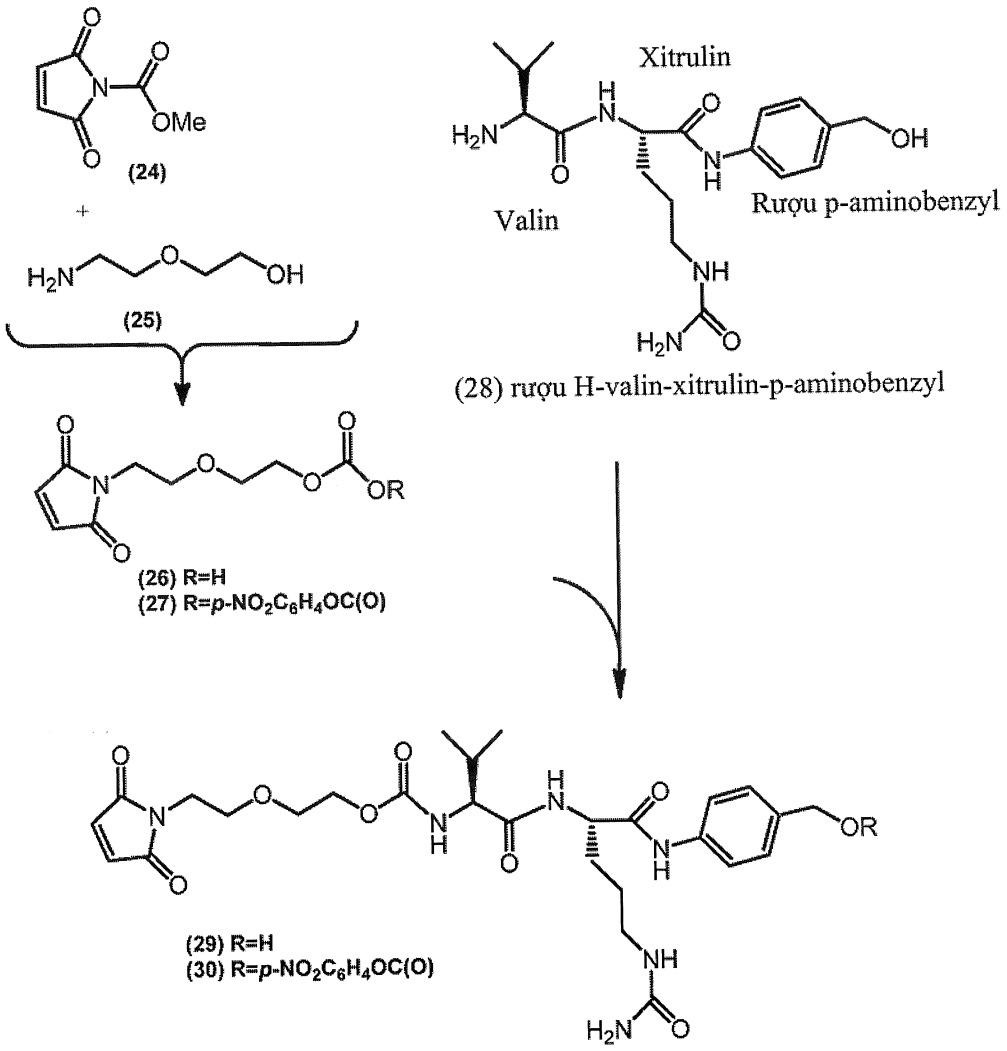


Sơ đồ 9F

Các tiền dược chất của các dược chất khác, ví dụ, CC-1065, có thể được tổng hợp như mô tả, ví dụ trong WO 2010/062171.

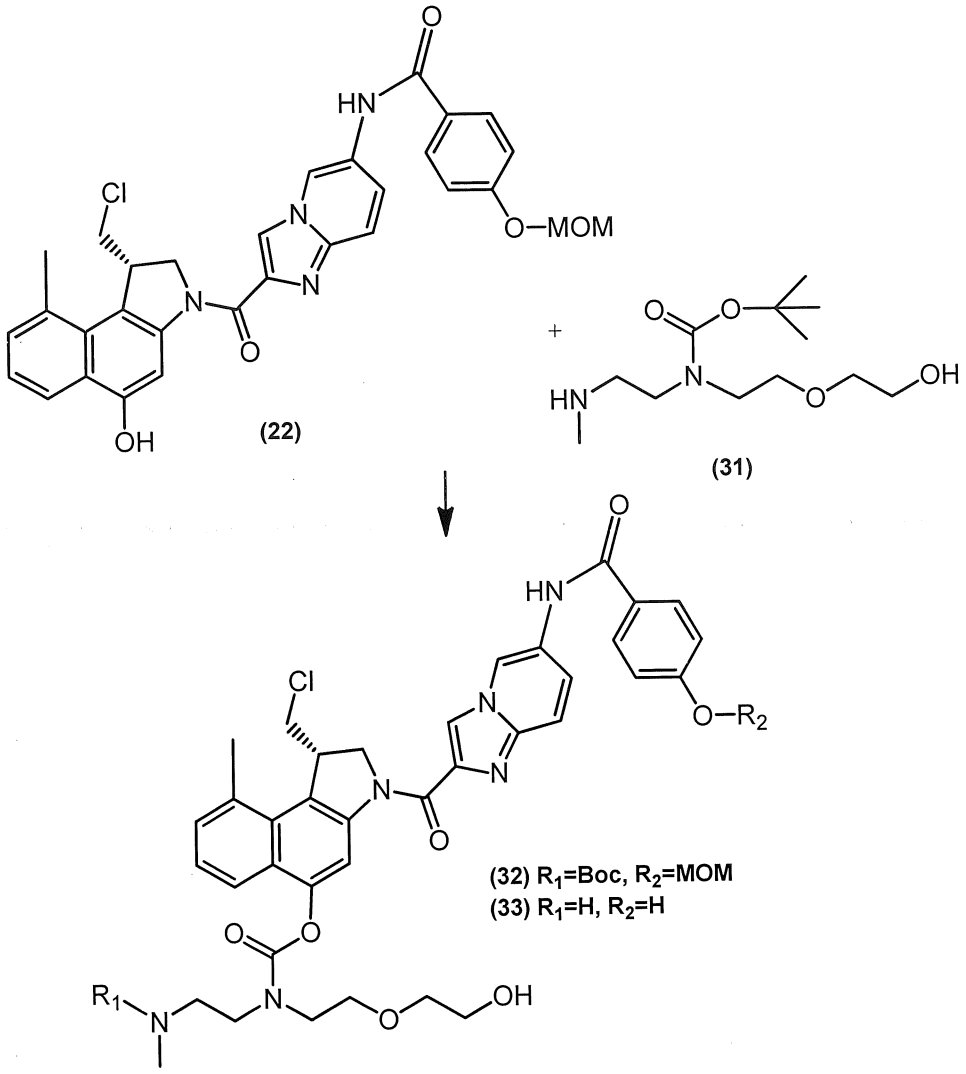
Nhóm tiền dược chất ưu tiên được liên kết với các nhóm khác của ADC theo Sơ đồ 9G. Khối xây dựng liên kết maleimit được tổng hợp bằng cách bắt đầu phản ứng ngưng tụ giữa (24) và 2-(2-aminoetoxy)etanol (25) để tạo ra rượu (26), hợp chất này tiếp đó được biến đổi thành cacbonat phản ứng (27) bằng cách cho phản ứng với 4-nitrophenyl cloformat. Ngẫu hợp hợp chất (27) với H-Valin-Xitrulin-PABA (28), được điều chế theo Dubowchik, G.M. *et al.* trong: "*Cathepsin B-Labile Dipeptide Linkers For Lysosomal Release Of Doxorubicin From Internalizing Immunoconjugates: Model Studies Of Enzymatic Drug Release and Antigen-Specific In Vitro Anticancer Activity*," Bioconjugate Chem. 13:855-869, (2002)) dẫn đến tạo

thành liên kết (29), được xử lý bằng bis(4-nitrophenyl) cacbonat để tạo ra liên kết (30) hoạt hoá.



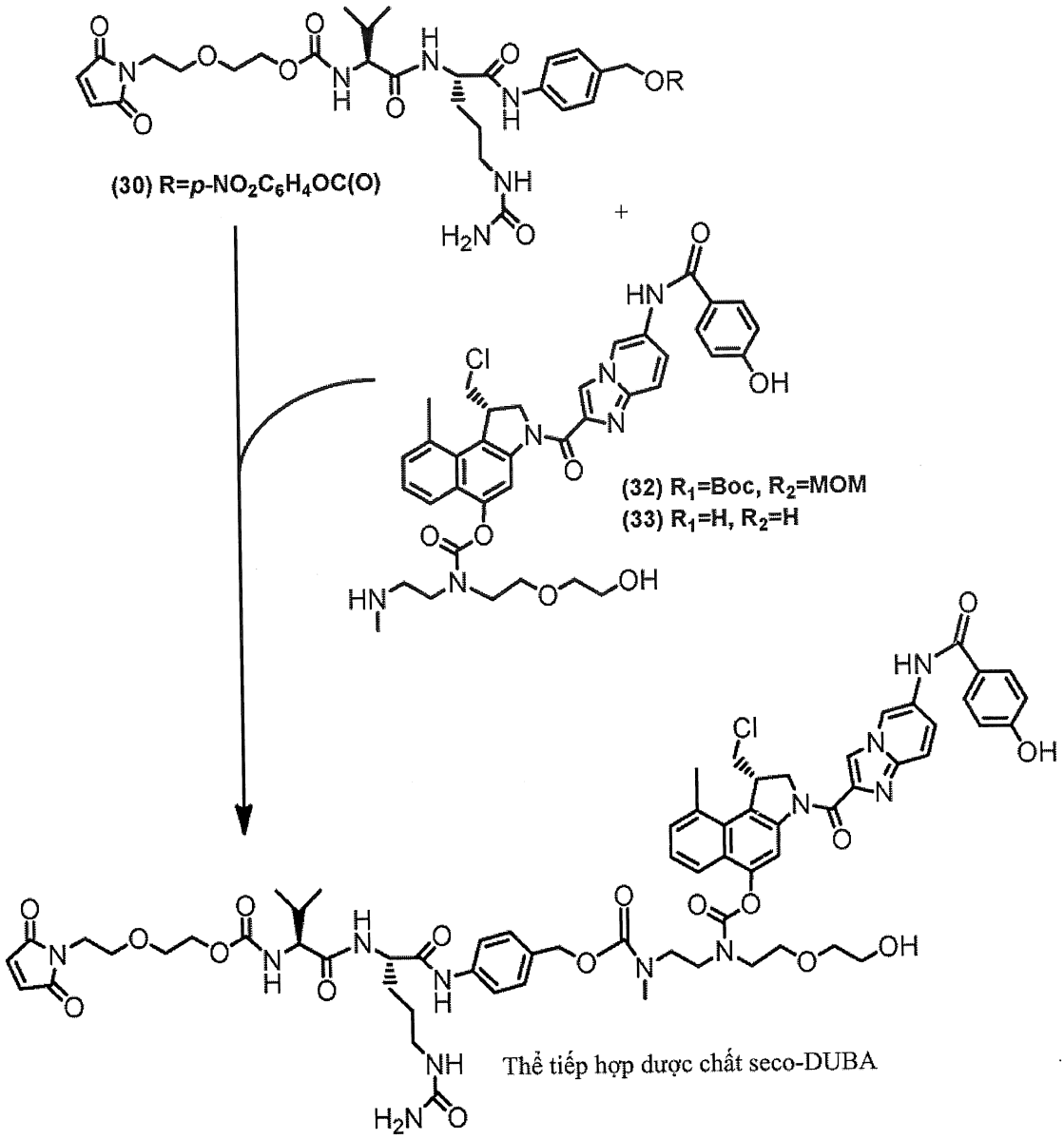
Sơ đồ 9G

Như thể hiện trong Sơ đồ 9H, *seco*-DUBA-MOM (22) được cải biến để tiếp hợp theo hai bước. Xử lý liên tiếp hợp chất (22) bằng 4-nitrophenyl cloformat và *tert*-butyl metyl(2-(metylamino)etyl)carbamat (31) tạo ra hợp chất (32). Loại bỏ các nhóm bảo vệ Boc và MOM trong hợp chất (32) bằng axit trifloaxetic (TFA) tạo ra hợp chất **(33)** dưới dạng muối TFA.



Sơ đồ 9H

ADC được tổng hợp bằng cách cho liên kết hoạt hoá (30) phản ứng với cấu trúc duocarmyxin-đệm đóng vòng (33) trong điều kiện bazơ nhẹ. Trong các điều kiện này, sự tự loại bỏ đệm đóng vòng và dẫn đến tạo thành hợp chất 3a bị ức chế (Sơ đồ 9I).



Sơ đồ 9I

Quy trình này trung bình tạo ra hai nhóm thiol tự do/mAb dẫn đến phân bố thống kê B7-H3-ADC với tỷ lệ dược chất-so với-kháng thể trung bình (DAR) bằng khoảng hai, và những lượng nhỏ của các loại hợp chất phân tử lượng cao và nhóm duocarmyxin không được tiếp hợp dư.

Thứ tự các bước của quá trình tổng hợp có thể được thay đổi theo mong muốn. Ưu tiên là, phương pháp sẽ sử dụng sẽ là phương pháp của các Sơ đồ 9A-Sơ đồ 9I, như đề cập ở trên.

XII. Sử dụng các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế

Sáng chế bao gồm các chế phẩm, kể cả các dược phẩm, bao gồm các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế (ví dụ, các kháng thể, các kháng thể hai đặc hiệu, các diabody hai đặc hiệu, các phân tử gắn kết hoá trị ba, B7-H3-ADC, v.v.), các polypeptit thu được từ các phân tử này, các polynucleotit bao gồm các trình tự mã hoá các phân tử này hoặc các polypeptit, và các chất khác như được mô tả trong bản mô tả này.

Như đề xuất trong bản mô tả này, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế, bao gồm các miền VH và/hoặc VL kháng-B7-H3 được đề xuất trong bản mô tả này, có khả năng gắn kết B7-H3 có mặt trên bề mặt của tế bào và gây cảm ứng độc tính tế bào qua trung gian-tế bào phụ thuộc-kháng thể (ADCC) và/hoặc độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) và/hoặc điều tiết tiêu diệt tế bào được nhắm tới (ví dụ, độc tính tế bào tế bào T được nhắm tới). Không bị ràng buộc bởi cơ chế tác dụng bất kỳ, các phân tử B7-H3-ADC của sáng chế được nhập nội khi gắn kết với B7-H3 được biểu hiện bởi tế bào khối u và điều tiết tiêu diệt tế bào khối u thông qua tác dụng của độc tố tế bào được tiếp hợp.

Do đó, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế, bao gồm các miền VH và/hoặc VL kháng-B7-H3 được đề xuất trong bản mô tả này, có khả năng điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ kèm theo hoặc đặc trưng bởi biểu hiện của B7-H3. Như đề cập ở trên, B7-H3 là kháng nguyên ung thư-phôi thai được biểu hiện ở nhiều loại thể ác tính của máu và dạng rắn kèm theo các khối u cấp độ cao thể hiện hình thái học ít được biệt hoá, và có tương quan với hậu quả xấu trên lâm sàng. Do đó, không nhằm giới hạn, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế có thể được sử dụng trong chẩn đoán hoặc điều trị bệnh ung thư, cụ thể là bệnh ung thư đặc trưng bởi có biểu hiện của B7-H3.

Các bệnh ung thư mà có thể được điều trị bằng các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế bao gồm các bệnh ung thư đặc trưng bởi có mặt tế bào ung thư được chọn

từ nhóm gồm tế bào của: khối u tuyến thượng thận, bệnh ung thư kèm theo-AIDS, sarcom phần mềm phế nang, khối u tế bào hình sao, bệnh ung thư tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư não và tủy sống, khối u não di căn, bệnh ung thư tế bào-B, bệnh ung thư vú, khối u thân động mạch cảnh, bệnh ung thư cổ tử cung, sarcom sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ nhuộm màu, caxinom tế bào trong, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư đại trực tràng, u mô bào sợi lành tính da, khối u tế bào tròn nhỏ tạo sợi dính, u màng não thất, khối u Ewing, sarcom sụn dạng niêm dịch ngoài xương, xương bất thường tạo sụn, chứng loạn sản xơ hoá xương, bệnh ung thư túi mật hoặc ống mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh lá nuôi phôi thai kỳ, khối u tế bào mầm, bệnh ung thư đầu và cổ, u nguyên bào đệm, ác tính huyết học, caxinom tế bào gan, khối u tế bào đảo, bệnh sarcom Kaposi, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu (ví dụ bệnh bạch cầu tủy cấp), khối u mỡ ác tính/sarcom mỡ, bệnh ung thư gan, u bạch huyết, bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC)), u nguyên bào tủy, u melanin, u màng não, bệnh ung thư hầu trung biểu mô, đa u tuyến nội tiết, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u nguyên bào thần kinh, các khối u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, caxinom tuyến giáp dạng nhú, khối u cận giáp, bệnh ung thư nhi khoa, khối u bao dây thần kinh ngoại vi, u tế bào ưa crôm, khối u tuyến yên, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u hắc tố màng bồ đào sau, bệnh ung thư thận di căn, khối u hình que, sarcom cơ vân, bệnh sarcom, bệnh ung thư da, khối u tế bào xanh tròn nhỏ ở trẻ em (kể cả u nguyên bào thần kinh và sarcom cơ vân), bệnh sarcom mô mềm, bệnh ung thư tế bào vảy (ví dụ, bệnh ung thư tế bào vảy của đầu và cổ (SCCHN), bệnh ung thư dạ dày, bệnh sarcom hoạt dịch, bệnh ung thư tinh hoàn, caxinom tuyến ức, u tuyến ức, bệnh ung thư tuyến giáp (ví dụ, bệnh ung thư di căn tuyến giáp), và bệnh ung thư tử cung.

Cụ thể là, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, u nguyên bào đệm, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp, bệnh bạch cầu tủy cấp, bệnh bạch cầu tế bào lympho mãn tính, bệnh bạch cầu tủy mãn tính, bệnh bạch cầu tế bào lông, u lympho Burkett, u lympho tế bào B lớn

khuếch tán, u lympho thể nang, u lympho tế bào vỏ, u lympho vùng rìa, bệnh ung thư hầu trung biểu mô, u lympho không phải Hodgkin, u lympho tế bào lympho nhỏ, đa u tủy, u melanin, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư da, caxinom tế bào thận, khối u tế bào xanh tròn nhỏ ở trẻ em (kể cả u nguyên bào thần kinh và sarcom cơ vân), bệnh ung thư tế bào vảy (ví dụ, bệnh ung thư tế bào vảy của đầu và cổ (SCCHN), bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư tuyến giáp (ví dụ, bệnh ung thư tuyến giáp di căn), và bệnh ung thư tử cung.

Các phân tử gắn kết-B7-H3 hai đặc hiệu của sáng chế tăng cường liệu pháp ung thư được tạo ra bởi B7-H3, bằng cách thúc đẩy tiêu diệt tế bào nhắm tới các tế bào khối u có biểu hiện tính đặc hiệu thứ hai của các phân tử này (ví dụ, CD2, CD3, CD8, CD16, thụ thể tế bào T (TCR), NKG2D, *v.v.*). Các phân tử gắn kết-B7-H3 này cụ thể là hữu ích để điều trị bệnh ung thư.

Ngoài tính hữu ích của chúng trong trị liệu, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế có thể được đánh dấu có thể phát hiện và được sử dụng trong chẩn đoán bệnh ung thư hoặc trong chiếu chụp các khối u và tế bào ung thư.

XIII. Các dược phẩm

Các chế phẩm của sáng chế bao gồm các chế phẩm thuốc nguyên liệu hữu ích trong sản xuất các dược phẩm (ví dụ, các chế phẩm chưa tinh khiết hoặc không vô khuẩn) và các dược phẩm (*nghĩa là,* các chế phẩm mà thích hợp để sử dụng cho đối tượng hoặc bệnh nhân) mà có thể được sử dụng trong bào chế các dạng liều đơn vị. Các chế phẩm này bao gồm lượng hữu hiệu phòng bệnh hoặc trị liệu của các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế, hoặc kết hợp các chất này và chất mang dược dụng. Tốt hơn là, các chế phẩm của sáng chế bao gồm lượng hữu hiệu phòng bệnh hoặc trị liệu của các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế và chất mang dược dụng. Sáng chế cũng bao gồm các dược phẩm mà còn bao gồm kháng thể trị liệu thứ hai (ví dụ, kháng thể đơn dòng đặc hiệu-khối u) đặc hiệu đối với kháng nguyên ung thư cụ thể, và chất mang dược dụng.

Theo phương án cụ thể, thuật ngữ "dược dụng" nghĩa là được cấp phép bởi cơ quan quản lý Liên bang hoặc chính quyền Bang hoặc có trong Dược Điển Mỹ hoặc các dược điển được công nhận nói chung khác, để sử dụng ở động vật, và cụ thể hơn

là ở người. Thuật ngữ "chất mang" chỉ chất pha loãng, chất phụ trợ, (ví dụ, chất phụ trợ Freund (toàn vẹn và không toàn vẹn), tá dược, hoặc chất dẫn mà các chất trị liệu được sử dụng cùng với các chất này. Nói chung, các thành phần của chế phẩm của sáng chế được cung cấp dưới dạng riêng rẽ hoặc phối trộn với nhau ở dạng liều đơn vị, ví dụ, dưới dạng bột đông khô hoặc cô đặc không có nước trong bao bì hàn kín như là ống thuốc tiêm hoặc dạng túi nhỏ chỉ rõ lượng hoạt chất. Khi chế phẩm này được sử dụng bằng cách tiêm truyền, chế phẩm có thể được phân phát cùng với chai dịch truyền có chứa nước hoặc nước muối loại dược dụng vô khuẩn. Khi chế phẩm này được sử dụng bằng cách tiêm, có thể cung cấp ống nước vô khuẩn để tiêm hoặc nước muối sao cho các thành phần có thể phối trộn trước khi sử dụng.

Sáng chế cũng đề xuất bộ kit hoặc hộp dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều vật đựng đóng gói phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế, đơn độc hoặc với chất mang dược dụng. Ngoài ra, một hoặc nhiều chất phòng bệnh hoặc trị liệu khác hữu ích để điều trị bệnh cũng có thể được bao gồm trong hộp hoặc bộ kit dược phẩm này. Sáng chế cũng đề xuất hộp hoặc bộ kit dược phẩm bao gồm một hoặc nhiều vật đựng đóng gói một hoặc nhiều thành phần của các dược phẩm của sáng chế. Được tùy ý kết hợp với (các) vật đựng này có thể là thông báo theo mẫu quy định của cơ quan chính phủ quản lý việc sản xuất, sử dụng hoặc buôn bán các dược phẩm hoặc sinh phẩm, thông báo này là cấp phép lưu hành của cơ quan quản lý sản xuất, sử dụng hoặc buôn bán để sử dụng cho người.

Sáng chế đề xuất các bộ kit có thể sử dụng trong các phương pháp nêu trên. Bộ kit có thể bao gồm phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế, kể cả B7-H3-ADC. Bộ kit này còn có thể bao gồm một hoặc nhiều chất phòng bệnh và/hoặc trị liệu khác hữu ích để điều trị bệnh ung thư, trong một hoặc nhiều vật đựng.

XIV. Các phương pháp sử dụng

Các chế phẩm của sáng chế có thể được cung cấp để điều trị, điều trị dự phòng, và cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng có kèm theo bệnh, rối loạn bệnh hoặc bệnh nhiễm khuẩn bằng cách cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của protein dung hợp hoặc phân tử được tiếp hợp của sáng chế, hoặc dược phẩm bao gồm protein dung hợp

hoặc phân tử được tiếp hợp của sáng chế. Theo khía cạnh được ưu tiên, các chế phẩm này được tinh chế về cơ bản (*nghĩa là,* về cơ bản không có các chất mà hạn chế tác dụng của nó hoặc gây các tác dụng phụ không mong muốn). Theo phương án cụ thể, đối tượng này là động vật, tốt hơn là động vật có vú, như động vật không phải linh trưởng (ví dụ, loài bò, loài ngựa, loài mèo, loài chó, loài gặm nhấm, *v.v.*) hoặc động vật linh trưởng (ví dụ, khỉ, như khỉ cynomolgus, người, *v.v.*). Theo phương án được ưu tiên, đối tượng này là người.

Nhiều hệ phân phối là đã biết và có thể được sử dụng để dùng các chế phẩm của sáng chế, ví dụ, đóng nang trong các liposom, các vi hạt, các vi nang, các tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện kháng thể hoặc protein dung hợp, nhập nội bào qua trung gian-thụ thể (xem, ví dụ, *"Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System,"* J. Biol. Chem. 262:4429-4432, (1987) của Wu *et al.*), tạo cấu trúc axit nucleic như một phần của retrovirut hoặc vectơ khác, *v.v.*.

Các phương pháp sử dụng phân tử của sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sử dụng qua đường ngoài đường tiêu hoá (ví dụ, trong da, trong bắp cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch và dưới da), trên màng cứng, và qua niêm mạc (ví dụ, các đường dùng trong mũi và qua đường miệng). Theo phương án cụ thể, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế được sử dụng qua đường trong bắp cơ, trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Các chế phẩm có thể được sử dụng qua đường dùng thuận tiện bất kỳ, ví dụ, bằng cách tiêm truyền hoặc tiêm liều cao, bằng cách hấp thu qua màng biểu mô hoặc niêm mạc (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và niêm mạc ruột, *v.v*) và có thể được sử dụng cùng với các hoạt chất sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc tại chỗ. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng qua đường phổi, ví dụ, bằng cách sử dụng máy xông hoặc máy phun mù, và được chế tạo với chất tạo sol khí. Xem, ví dụ, các Patent Mỹ số 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; và 4,880,078; và các Công bố đơn PCT số WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; và WO 99/66903, được viện dẫn ở đây để tham khảo.

Sáng chế cũng đề xuất các chế phẩm của các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế được đóng gói trong bao bì hàn kín như ống thuốc tiêm hoặc túi nhỏ chỉ rõ khối

lượng của phân tử này. Theo một phương án, các phân tử này được cung cấp dưới dạng bột đông khô đã tiệt khuẩn hoặc dạng cô đặc không có nước trong bao bì hàn kín và có thể được hoàn nguyên, ví dụ, bằng nước hoặc nước muối đến nồng độ sử dụng thích hợp cho một đối tượng. Tốt hơn là, các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế được cung cấp dưới dạng bột đông khô tiệt khuẩn trong bao bì hàn kín.

Các chế phẩm được làm đông khô chứa các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế phải được bảo quản trong khoảng nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong bao bì gốc của chúng và các phân tử này phải được sử dụng trong vòng 12 giờ, tốt hơn là trong vòng 6 giờ, trong vòng 5 giờ, trong vòng 3 giờ, hoặc trong vòng 1 giờ sau khi đã được hoàn nguyên. Theo phương án khác, các phân tử này được cung cấp dưới dạng lỏng trong bao bì hàn kín chỉ rõ khối lượng và nồng độ của phân tử, protein dung hợp, hoặc phân tử được tiếp hợp này. Tốt hơn là, các phân tử gắn kết-B7-H3 khi được cung cấp ở dạng lỏng, được cung cấp trong bao bì hàn kín.

Lượng chế phẩm của sáng chế mà hữu hiệu trong điều trị, phòng ngừa hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng kèm theo rối loạn có thể được xác định bằng các kỹ thuật lâm sàng chuẩn. Liều dùng chính xác sử dụng cho các dạng bào chế sẽ tùy thuộc vào đường dùng, và mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh, và phải được quyết định theo suy xét của bác sỹ hành nghề và tình trạng của từng bệnh nhân. Có thể ngoại suy các liều dùng hữu hiệu từ các đường cong liều dùng-đáp ứng thu được từ các hệ thử nghiệm mô hình in vitro hoặc ở động vật.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "lượng hữu hiệu của" của dược phẩm, theo một phương án, là lượng đủ để có kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm, không giới hạn ở, các kết quả lâm sàng, như làm thuyên giảm các triệu chứng do bệnh, giảm nhẹ triệu chứng nhiễm khuẩn (ví dụ, tải lượng virut, sốt, đau, nhiễm khuẩn huyết, *v.v.*) hoặc triệu chứng của bệnh ung thư (ví dụ, tăng sinh tế bào ung thư, có mặt khối u, di căn khối u, *v.v.*), nhờ đó làm tăng chất lượng cuộc sống của các đối tượng mắc bệnh, giảm liều dùng của các thuốc khác cần thiết để điều trị bệnh, tăng cường tác dụng của thuốc khác thông qua nhằm đích và/hoặc nhập nội, làm chậm tiến triển của bệnh, và/hoặc kéo dài thời gian sống của các cá thể.

Lượng hữu hiệu của có thể được sử dụng thành một hoặc nhiều lần. Nhằm các mục đích của sáng chế, lượng hữu hiệu của thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm là lượng đủ để làm giảm tăng sinh (hoặc tác động của) sự có mặt của virut và làm giảm và/hoặc làm chậm phát triển bệnh do virut trực tiếp hoặc gián tiếp. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu của thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm có thể hoặc không thể đạt được khi kết hợp với thuốc, hợp chất hoặc dược phẩm khác. Do đó, "lượng hữu hiệu" có thể được xem xét trong tình huống sử dụng một hoặc nhiều chất hoá trị liệu, và một đơn chất có thể được coi là được cho dùng ở lượng hữu hiệu nếu kết hợp với một hoặc nhiều chất khác, có thể đạt được hoặc đạt được kết quả mong muốn. Trong khi nhu cầu của cá thể là khác nhau, việc xác định các khoảng tối ưu của lượng hữu hiệu của mỗi thành phần là thuộc chuyên môn của lĩnh vực này.

Đối với các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế, liều lượng được sử dụng cho bệnh nhân tốt hơn là được xác định theo thể trọng (kg) của đối tượng nhận này. Đối với các phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế, liều lượng được sử dụng cho bệnh nhân thông thường là từ khoảng 0,01 μg/kg đến khoảng 30 mg/kg thể trọng của đối tượng hoặc cao hơn.

Liều lượng và tần suất sử dụng phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế có thể giảm đi hoặc thay đổi bằng cách tăng cường cho phân tử này hấp thu và ngấm vào mô bằng các cải biến, như, ví dụ, lipit hoá.

Liều lượng của phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế được sử dụng cho bệnh nhân có thể được tính toán để sử dụng như liệu pháp đơn nhất. Theo cách khác, phân tử này có thể được sử dụng kết hợp với các chế phẩm trị liệu khác và liều lượng được sử dụng cho bệnh nhân là thấp hơn khi phân tử được sử dụng như liệu pháp đơn nhất.

Các dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng tại chỗ lên vùng cần điều trị; có thể đạt được cách dùng này bằng cách, ví dụ, và không giới hạn ở, tiêm truyền tại chỗ, bằng cách tiêm, hoặc thông qua vật cấy, vật cấy này là bằng chất liệu rỗng xốp, không rỗng xốp hoặc gelatin, bao gồm các màng, như các màng Silastic, hoặc các sợi. Tốt hơn là, khi sử dụng phân tử của sáng chế, lưu ý sử dụng các chất liệu mà phân tử này không hấp thu.

Các chế phẩm của sáng chế có thể được phân phối trong bọng nang, cụ thể là liposom (Xem *"New Methods Of Drug Delivery,"* Science 249:1527-1533, (1990) của Langer); trong Liposomes in the Therapy of Infectious Disease và Cancer, Lopez-Berestein và Fidler (biên tập), Liss, New York, các trang 353- 365 (1989), của Treat *et al.*; Lopez-Berestein, tài liệu này, các trang 317-327).

Việc điều trị cho đối tượng bằng lượng hữu hiệu trị bệnh hoặc phòng bệnh của phân tử gắn kết-B7-H3 của sáng chế có thể bao gồm điều trị một đợt duy nhất hoặc, tốt hơn là, có thể bao gồm nhiều đợt điều trị. Trong một ví dụ được ưu tiên, đối tượng được điều trị bằng diabody một lần/tuần trong khoảng từ 1 đến 10 tuần, tốt hơn là từ 2 đến 8 tuần, tốt hơn nữa là từ khoảng 3 đến 7 tuần, và còn tốt hơn nữa là trong khoảng 4, 5, hoặc 6 tuần. Các dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng một lần/ngày, với tần suất sử dụng một lần/tuần, hai lần/tuần, hai tuần một lần, một lần/tháng, sáu tuần một lần, hai tháng một lần, hai lần/năm hoặc một lần/năm, v.v.. Theo cách khác, các dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng hai lần/ngày, với tần suất sử dụng một lần/tuần, hai lần/tuần, hai tuần một lần, một lần/tháng, sáu tuần một lần, hai tháng một lần, hai lần/năm hoặc một lần/năm, v.v.. Theo cách khác, các dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng ba lần/ngày, với tần suất sử dụng một lần/tuần, hai lần/tuần, hai tuần một lần, một lần/tháng, sáu tuần một lần, hai tháng một lần, hai lần/năm hoặc một lần/năm. Cũng nên hiểu là liều lượng hữu hiệu của các phân tử được sử dụng để điều trị có thể gia tăng hoặc giảm đi trong một đợt điều trị cụ thể.

XV. Các phương án của sáng chế

Cụ thể, sáng chế đề cập tới các phương án sau (E_A và E_B):

E_A1. Thể tiếp hợp dược chất kháng thể kháng-B7-H3 (B7-H3-ADC) có công thức:

$$Ab\text{-}(LM)_m\text{-}(D)_n,$$

trong đó:

Ab là kháng thể gắn kết với B7-H3 mà bao gồm miền chuỗi nặng thay đổi (VH) được làm tương thích với người và miền chuỗi

nhẹ thay đổi (VL) được làm tương thích với người, hoặc là mảnh gắn kết-B7-H3 của nó, và;

D là nhóm dược chất gây độc tế bào;

LM là liên kết hoặc phân tử liên kết mà liên kết cộng hoá trị Ab và D;

m là số nguyên trong khoảng từ 0 đến n và chỉ số lượng các phân tử liên kết của B7-H3-ADC;

và

n là số nguyên trong khoảng từ 1 đến 10 và chỉ số lượng các nhóm dược chất gây độc tế bào được liên kết cộng hoá trị với phân tử B7-H3-ADC.

E_A2. B7-H3-ADC theo E_A1, trong đó:

(A) (i) miền VL được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:99, và

(ii) miền VH được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:104;

hoặc

(B) (i) miền VL được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20, và

(ii) miền VH được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21;

hoặc

(C) (i) miền VL được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30, và

(ii) miền VH được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31.

E_A3. B7-H3-ADC theo E_A1, trong đó miền VL được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:99 và miền VH được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:104.

E_A4. B7-H3-ADC theo E_A1, trong đó miền VL được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20 và miền VH được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21.

E_A5. B7-H3-ADC theo E_A1, trong đó miền VL được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30 và miền VH được làm tương thích với người nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31.

E_A6. B7-H3-ADC theo phương án bất kỳ trong số từ E_A1 đến E_A5, trong đó Ab nêu trên là kháng thể.

E_A7. B7-H3-ADC theo phương án bất kỳ trong số từ E1 đến E_A5, trong đó Ab nêu trên là mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể.

E_A8. B7-H3-ADC theo phương án bất kỳ trong số từ E_A1 đến E_A7, trong đó B7-H3-ADC nêu trên bao gồm miền Fc của IgG của người.

E_A9. B7-H3-ADC theo E_A8, trong đó IgG của người nêu trên là IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người.

E_A10. B7-H3-ADC theo E_A8 hoặc E_A9, trong đó miền Fc nêu trên là miền Fc biến thể mà bao gồm:

(a) một hoặc nhiều cải biến axit amin làm giảm ái lực của miền Fc biến thể đối với FcγR; và/hoặc

(b) một hoặc nhiều cải biến axit amin làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của miền Fc biến thể.

E_A11. B7-H3-ADC theo E_A10, trong đó các cải biến nêu trên làm giảm ái lực của miền Fc biến thể đối với FcγR bao gồm thay thế của L234A; L235A; hoặc L234A và L235A, trong đó cách đánh số nêu trên là theo chỉ số EU trong tài liệu của Kabat.

E_A12. B7-H3-ADC theo E_A10 hoặc E_A11, trong đó các cải biến nêu trên làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của miền Fc biến thể bao gồm thay thế của M252Y; M252Y và S254T; M252Y và T256E; M252Y, S254T và T256E; hoặc K288D và H435K, trong đó cách đánh số nêu trên là theo chỉ số EU trong tài liệu của Kabat.

E_A13. B7-H3-ADC theo phương án bất kỳ trong số từ E_A1-E_A12, trong đó ít nhất một trong số LM nêu trên là phân tử liên kết.

E_A14. B7-H3-ADC theo E_A13, trong đó Phân tử liên kết LM nêu trên là liên kết peptit.

E_A15. B7-H3-ADC theo E_A13, trong đó Phân tử liên kết LM nêu trên là liên kết có thể phân cắt.

E_A16. B7-H3-ADC theo E_A15, trong đó phân tử nêu trên có công thức:

$$Ab - [V\text{-}(W)_k\text{-}(X)_l\text{-}A] - D$$

trong đó:

V là Phân tử liên kết LM có thể phân cắt nêu trên,

$(W)_k$-$(X)_l$-A là hệ liên kết đệm tự loại bỏ, kéo dài mạch, mà tự loại bỏ thông qua quá trình loại bỏ-l,(4+2n),

W và X lần lượt là liên kết đệm dòng thác điện tử l,(4+2n), mà giống nhau hoặc khác nhau,

A là nhóm đệm có công thức $(Y)_m$, trong đó Y là liên kết đệm dòng thác điện tử l,(4+2n), hoặc nhóm có công thức U, mà là liên kết đệm loại bỏ tạo vòng,

k, 1 và m độc lập là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 5 (được bao gồm)),

n là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 10 (được bao gồm),

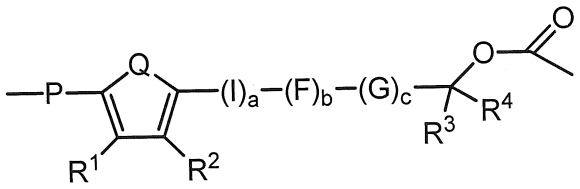
miễn là:

khi A là $(Y)_m$: thì $k+l+m \geq 1$, và

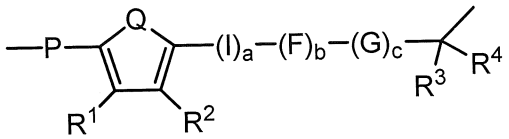
nếu $k+l+m=l$, thì $n>1$;

khi A là U: thì $k+1 \geq 1$.

W, X, và Y độc lập được chọn từ các hợp chất có công thức:



hoặc công thức:

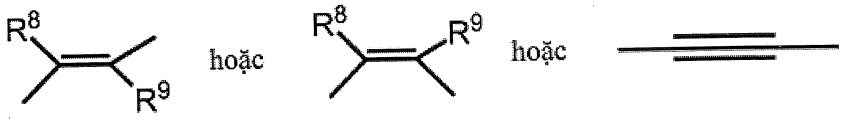


trong đó: Q là $-R^5C=CR^6-$, S, O, NR^5, $-R^5C=N-$, hoặc $-N=CR^5-$

P là NR^7, O hoặc S

a, b, và c độc lập là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 5 (được bao gồm));

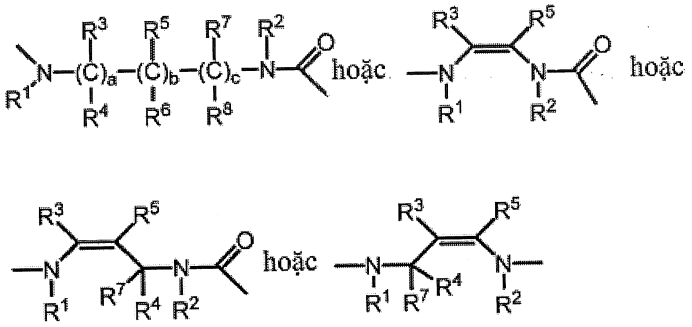
I, F và G độc lập được chọn từ các hợp chất có công thức:



trong đó R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, và R^9 độc lập là H, C_{1-6} alkyl, C_{3-20} heteroxyclyl, C_{5-20} aryl, C_{1-6} alkoxy, hydroxy (OH), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế

hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng, imidazolyl, C_{1-6} alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete (SR_x), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_x$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy ($S(=O)OH$), sulphinat ($S(=O)OR_x$), sulphinyl ($S(=O)R_x$), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 độc lập được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl, hai hoặc nhiều nhóm thế R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, hoặc R^9 tùy ý được liên kết với nhau để tạo thành một hoặc nhiều cấu trúc vòng béo hoặc thơm;

U được chọn từ các hợp chất có công thức:



trong đó:

a, b và c độc lập được chọn từ số nguyên là 0 hoặc 1; miễn là a + b + c = 2 hoặc 3;

R^1 và/hoặc R^2 độc lập là H, C1-6 alkyl, alkyl này tùy ý được thế bởi một hoặc nhiều nhóm sau: hydroxy (OH), ete (OR_x), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng, imidazolyl, C_{1-6} alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete (SR_X), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_X$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy

(S(=O)OH), sulphinat (S(=O)ORx), sulphinyl (S(=O)Rx), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl; và

R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 và R^8 độc lập là H, C_{1-6} alkyl, C_{3-20} heteroxyclyl, C_{5-20} aryl, C_{1-6} alkoxy, hydroxy (OH), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng, imidazolyl, C_{1-6} alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete (SR_x), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_x$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy (S(=O)OH), sulphinat ($S(=O)OR_x$), sulphinyl ($S(=O)R_x$), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl, và hai hoặc nhiều nhóm thế R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, hoặc R^8 tùy ý được liên kết với nhau để tạo thành một hoặc nhiều cấu trúc vòng béo hoặc thơm.

E_A17. B7-H3-ADC theo E_A16, trong đó Phân tử liên kết LM nêu trên bao gồm:

(1) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(2) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(3) p-ammoxinnamyloxycarbonyl;

(4) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(5) p-amino-benzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

(6) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

(7) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl;

(8) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

(9) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(10) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl;

(11) p-aminobenzyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino) carbonyl;

(12) p-aminoxinnamyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino) carbonyl;

(13) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl(metylamino) etyl(metylamino)carbonyl;

(14) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl (metylamino)etyl(metylamino)carbonyl;

(15) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl (metylamino)etyl(metylamino)-carbonyl;

(16) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl (metylamino)etyl(metylamino)carbonyl;

(17) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

(18) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl -p-aminobenzyl;

(19) p-aminoxinnamyl;

(20) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

(21) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

(22) p-amino-xinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

(23) p-aminophenylpentadienyl;

(24) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

(25) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

hoặc

(26) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminophenylpentadienyl.

E_A18. B7-H3-ADC theo phương án bất kỳ trong số từ E_A13-E_A17, trong đó Phân tử liên kết LM nêu trên được tiếp hợp với mạch bên của axit amin của chuỗi polypeptit của Ab và gắn kết Ab nêu trên với phân tử nhóm dược chất gây độc tế bào D nêu trên.

E_A19. B7-H3-ADC theo phương án bất kỳ trong số từ E_A1-E_A18, trong đó nhóm dược chất gây độc tế bào D nêu trên bao gồm độc tố tế bào, đồng vị phóng xạ, chất điều biến miễn dịch, xytokin, lymphokin, chemokin, yếu tố tăng trưởng, yếu tố hoại tử khối u, hormon, chất đối kháng hormon, enzym, oligonucleotit, ADN, ARN, siRNA, RNAi, microRNA, chất trị liệu quang hoạt, chất chống sinh mạch, chất gây chết tế bào theo chương trình, peptit, lipit, hydrat cacbon, chất càng cua, hoặc tổ hợp của chúng.

E_A20. B7-H3-ADC theo E_A19, trong đó nhóm dược chất gây độc tế bào D nêu trên bao gồm độc tố tế bào và được chọn từ nhóm gồm tubulysin, auristatin, maytansinoid, calicheamixin, pyrolobenzodiazepin, và duocarmycin.

E_A21. B7-H3-ADC theo E_A19, trong đó nhóm dược chất gây độc tế bào D nêu trên bao gồm độc tố tế bào tubulysin và được chọn từ nhóm gồm tubulysin A, tubulysin B, tubulysin C, và tubulysin D.

E_A22. B7-H3-ADC theo E_A19, trong đó nhóm dược chất gây độc tế bào D nêu trên bao gồm độc tố tế bào auristatin và được chọn từ nhóm gồm

MMAE (N-metylvalin-valin-dolaisoleuxin-dolaproin-norephedrin) và MMAF (N-metylvalin-valin-dolaisoleuxin-dolaproin-phenylalanin).

E_A23. B7-H3-ADC theo E_A19, trong đó nhóm dược chất gây độc tế bào D nêu trên bao gồm độc tố tế bào maytansinoid và được chọn từ nhóm gồm Mytansin, DM1 và DM4.

E_A24. B7-H3-ADC theo E_A19, trong đó nhóm dược chất gây độc tế bào D nêu trên bao gồm độc tố tế bào calicheamixin và được chọn từ nhóm gồm calicheamixin γ1, calicheamixin β1Br, calicheamixin γ1Br, calicheamixin α2I, calicheamixin α3I, calicheamixin β1I, calicheamixin γ1I, và calicheamixin Δ1I.

E_A25. B7-H3-ADC theo E_A19, trong đó nhóm dược chất gây độc tế bào D nêu trên bao gồm độc tố tế bào pyrolobenzodiazepin và được chọn từ nhóm gồm vadastuximab talirin, SJG-136, SG2000, SG2285 và SG2274.

E_A26. B7-H3-ADC theo E_A19, trong đó nhóm dược chất gây độc tế bào D nêu trên bao gồm độc tố tế bào duocarmyxin và được chọn từ nhóm gồm duocarmyxin A, duocarmyxin B1, doucarmycin B2, duocarmyxin C1, duocarmyxin C2, duocarmyxin D, duocarmyxin SA, CC-1065, adozelesin, bizelesin, carzelesin (U-80244) và spiro-duocarmyxin (DUBA).

E_A27. B7-H3-ADC theo phương án bất kỳ trong số từ E_A1 đến E_A26, trong đó Phân tử liên kết LM nêu trên được liên kết cộng hoá trị với Ab nêu trên thông qua các disulfua giữa các chuỗi đã khử.

E_A28. Dược phẩm mà bao gồm lượng hữu hiệu của B7-H3-ADC theo phương án bất kỳ trong số từ E_A1 đến E_A27 và chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng.

E_A29. Sử dụng B7-H3-ADC theo phương án bất kỳ trong số từ E_A1 đến E_A27 hoặc dược phẩm theo E_A28 trong điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh kèm theo hoặc đặc trưng bởi biểu hiện của B7-H3.

E_A30. Sử dụng theo E_A29, trong đó bệnh hoặc tình trạng bệnh nêu trên kèm theo hoặc đặc trưng bởi biểu hiện của B7-H3 là bệnh ung thư.

E_A31. Sử dụng theo E_A30, trong đó bệnh ung thư nêu trên được đặc trưng bởi có mặt tế bào ung thư được chọn từ nhóm gồm tế bào ung thư của: khối u tuyến thượng thận, bệnh ung thư kèm theo-AIDS, sarcom phần mềm phế nang, khối u tế bào hình sao, bệnh ung thư tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư não và tủy sống, khối u não di căn, bệnh ung thư tế bào-B, bệnh ung thư vú, khối u thân động mạch cảnh, bệnh ung thư cổ tử cung, sarcom sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ nhuộm màu, caxinom tế bào trong, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư đại trực tràng, u mô bào sợi lành tính da, khối u tế bào tròn nhỏ tạo sợi dính, u màng não thất, khối u Ewing, sarcom sụn dạng niêm dịch ngoài xương, xương bất thường tạo sụn, chứng loạn sản xơ hoá xương, bệnh ung thư túi mật hoặc ống mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh lá nuôi phôi thai kỳ, khối u tế bào mầm, bệnh ung thư đầu và cổ, u nguyên bào đệm, ác tính huyết học, caxinom tế bào gan, khối u tế bào đảo, bệnh sarcom Kaposi, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu (ví dụ, bệnh bạch cầu tủy cấp), khối u mỡ ác tính/sarcom mỡ, bệnh ung thư gan, u bạch huyết, bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC)), u nguyên bào tủy, u melanin, u màng não, bệnh ung thư hầu trung biểu mô, đa u tuyến nội tiết, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u nguyên bào thần kinh, các khối u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, caxinom tuyến giáp dạng nhú, khối u cận giáp, bệnh ung thư nhi khoa, khối u bao dây thần kinh ngoại vi, u tế bào ưa crôm, khối u tuyến yên, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u hắc tố màng bồ đào sau, bệnh ung thư thận di căn, khối u hình que, sarcom cơ vân, bệnh sarcom, bệnh ung thư da, khối u tế bào xanh tròn nhỏ ở trẻ em (kể cả u nguyên bào thần kinh và sarcom cơ vân), bệnh sarcom mô mềm, bệnh ung thư tế bào vảy (ví dụ, bệnh ung thư tế bào vảy của đầu và cổ (SCCHN), bệnh ung thư dạ dày, bệnh sarcom hoạt dịch, bệnh ung thư tinh hoàn, caxinom tuyến ức, u

tuyến ức, bệnh ung thư tuyến giáp (ví dụ, bệnh ung thư di căn tuyến giáp), và bệnh ung thư tử cung.

E_A31. Sử dụng theo E_A30, trong đó bệnh ung thư nêu trên được chọn từ nhóm gồm: bệnh ung thư tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, u nguyên bào đệm, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp, bệnh bạch cầu tủy cấp, bệnh bạch cầu tế bào lympho mãn tính, bệnh bạch cầu tủy mãn tính, bệnh bạch cầu tế bào lông, u lympho Burkett, u lympho tế bào B lớn khuếch tán, u lympho thể nang, u lympho tế bào vỏ, u lympho vùng rìa, bệnh ung thư hầu trung biểu mô, u lympho không phải Hodgkin, u lympho tế bào lympho nhỏ, đa u tủy, u melanin, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư da, caxinom tế bào thận, khối u tế bào xanh tròn nhỏ ở trẻ em (kể cả u nguyên bào thần kinh và sarcom cơ vân), bệnh ung thư tế bào vảy (ví dụ, bệnh ung thư tế bào vảy của đầu và cổ (SCCHN), bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư tuyến giáp (ví dụ, bệnh ung thư tuyến giáp di căn), và bệnh ung thư tử cung.

E_B1. Phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm miền chuỗi nhẹ thay đổi (VL) mà bao gồm miền CDR_L1, miền CDR_L2, và miền CDR_L3, và miền chuỗi nặng thay đổi (VH) mà bao gồm miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3, trong đó:

(1) miền CDR_H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27;

(2) miền CDR_H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28; và

(3) miền CDR_H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29.

E_B2. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo E_B1, bao gồm miền VL nêu trên mà bao gồm miền CDR_L1, miền CDR_L2, và miền CDR_L3, và miền VH nêu trên mà bao gồm miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3, trong đó:

(1) miền CDR_L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23;

(2) miền CDR_L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; và

(3) miền CDR_L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25.

E_B3. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo E_B1, bao gồm miền VL nêu trên mà bao gồm miền CDR_L1, miền CDR_L2, và miền CDR_L3, và miền VH nêu trên mà bao gồm miền CDR_H1, miền CDR_H2 và miền CDR_H3, trong đó các miền nêu trên được chọn từ nhóm gồm:

(1) miền CDR_H1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27;

(2) miền CDR_H2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28;

(3) miền CDR_H3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29;

(4) miền CDR_L1 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23;

(5) miền CDR_L2 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; và

(6) miền CDR_L3 bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25.

E_B4. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B1 đến E_B3, trong đó miền VH nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26 hoặc SEQ ID NO:31.

E_B5. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B1 đến E_B4, trong đó miền VL nêu trên bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:30.

E_B6. Phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm miền VL và miền VH, trong đó miền VL này bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20.

E_B7. Phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm miền VL và miền VH, trong đó miền VH này bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21.

E_B8. Phân tử gắn kết-B7-H3 bao gồm miền VL và miền VH, trong đó miền VL này bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20 và miền VH này bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21.

E_B9. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B1 đến E_B8, trong đó phân tử này là kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

E_B10. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B1 đến E_B8, trong đó phân tử này là:

(a) kháng thể hai đặc hiệu; hoặc

(b) diabody, diabody này là phức hợp được liên kết cộng hoá trị bao gồm 2, 3, 4 hoặc 5 chuỗi polypeptit; hoặc

(c) phân tử gắn kết hoá trị ba, phân tử gắn kết hoá trị ba này là phức hợp được liên kết cộng hoá trị bao gồm 3, 4, 5 hoặc nhiều chuỗi polypeptit.

E_B11. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B1 đến E_B10, trong đó phân tử này bao gồm miền Fc.

E_B12. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo E_B10, trong đó phân tử nêu trên là diabody và bao gồm miền gắn kết-albumin (ABD).

E_B13. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo E_B11, trong đó miền Fc nêu trên là miền Fc biến thể mà bao gồm:

(a) một hoặc nhiều cải biến axit amin làm giảm ái lực của miền Fc biến thể đối với FcγR; và/hoặc

(b) một hoặc nhiều cải biến axit amin làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của miền Fc biến thể.

E_B14. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo E_B13, trong đó các cải biến nêu trên làm giảm ái lực của miền Fc biến thể đối với FcγR bao gồm thay thế của L234A; L235A; hoặc L234A và L235A, trong đó cách đánh số nêu trên là theo chỉ số EU trong tài liệu của Kabat.

E_B15. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo E_B13 hoặc E_B14, trong đó các cải biến nêu trên làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của miền Fc biến thể bao gồm thay thế của M252Y; M252Y và S254T; M252Y và T256E; M252Y, S254T và T256E; hoặc K288D và H435K, trong đó cách đánh số nêu trên là theo chỉ số EU trong tài liệu của Kabat.

E_B16. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B1 đến E_B15, trong đó phân tử nêu trên là hai đặc hiệu và bao gồm 2 vị trí gắn kết epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của B7-H3 và 2 vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng.

E_B17. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B1 đến E_B15, trong đó phân tử này là hai đặc hiệu và bao gồm 1 vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của B7-H3 và 1 vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng.

E_B18. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B1 đến E_B15, trong đó phân tử này là ba đặc hiệu và bao gồm:

(a) 1 vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của B7-H3;

(b) 1 vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của phân tử thứ nhất có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng; và

(c) 1 vị trí gắn kết-epitop có khả năng gắn kết đặc hiệu miễn dịch với epitop của phân tử thứ hai có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng.

E_B19. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B1 đến E_B8, trong đó phân tử này có khả năng gắn kết đồng thời với B7-H3 và phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng.

E_B20. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B16 đến E_B18, trong đó phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng là CD2, CD3, CD8, TCR, hoặc NKG2D.

E_B21. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B16 đến E_B20, trong đó tế bào hiệu ứng là tế bào-T độc hại tế bào, hoặc tế bào giết tự nhiên (NK).

E_B22. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B16 đến E_B21, trong đó phân tử có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng là CD3.

E_B23. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo E_B18, trong đó phân tử thứ nhất nêu trên có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng là CD3 và phân tử thứ hai nêu trên có mặt trên bề mặt của tế bào hiệu ứng là CD8.

E_B24. Phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B16 đến E_B23, trong đó phân tử nêu trên điều tiết gắn kết phối hợp của tế bào biểu hiện B7-H3 và tế bào T gây độc tế bào.

E_B25. Dược phẩm bao gồm lượng hữu hiệu của phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B1 đến E_B24 và chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng.

E_B26. Sử dụng phân tử gắn kết-B7-H3 theo phương án bất kỳ trong số từ E_B1 đến E_B24 hoặc dược phẩm theo E_B26 trong điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh kèm theo hoặc đặc trưng bởi biểu hiện của B7-H3.

E_B27. Sử dụng theo E_B26, trong đó bệnh hoặc tình trạng bệnh kèm theo hoặc đặc trưng bởi biểu hiện của B7-H3 nêu trên là bệnh ung thư.

E_B28. Sử dụng theo E_B27, trong đó bệnh ung thư nêu trên đặc trưng bởi có mặt tế bào ung thư được chọn từ nhóm gồm tế bào của: khối u tuyến thượng thận, bệnh ung thư kèm theo-AIDS, sarcom phần mềm phế nang, khối u tế bào hình sao, bệnh ung thư tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư não và tủy sống, khối u não di căn, bệnh ung thư tế bào-B, bệnh ung thư vú, khối u thân động mạch cảnh, bệnh ung thư cổ tử cung, sarcom sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ nhuộm màu, caxinom tế bào trong, bệnh ung thư đại tràng, bệnh ung thư đại trực tràng, u mô bào sợi lành tính da, khối u tế bào tròn nhỏ tạo sợi dính, u màng não thất, khối u Ewing, sarcom sụn dạng niêm dịch ngoài xương, chứng xương bất thường tạo sụn, chứng loạn sản xơ hoá xương, bệnh ung thư túi mật hoặc ống mật, bệnh ung thư dạ dày, bệnh lá nuôi phôi thai kỳ, khối u tế bào mầm, bệnh ung thư đầu và cổ, u nguyên bào đệm, bệnh ác tính huyết học, caxinom tế bào gan, khối u tế bào đảo, bệnh sarcom Kaposi, bệnh ung thư thận, bệnh bạch cầu (ví dụ, bệnh bạch cầu tủy cấp), khối u mỡ ác tính/sarcom mỡ, bệnh ung thư gan, u lympho, bệnh ung thư phổi (ví dụ, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC)), u nguyên bào tủy, u melanin, u màng não, bệnh ung thư hầu trung biểu mô, đa u tuyến nội tiết, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u nguyên bào thần kinh, khối u thần kinh nội tiết, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, caxinom tuyến giáp dạng nhú, khối u cận giáp, bệnh ung thư nhi khoa, khối u

bao dây thần kinh ngoại vi, u tế bào ưa crôm, khối u tuyến yên, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, u hắc tố màng bồ đào sau, bệnh ung thư thận di căn, khối u hình que, sarcom cơ vân, bệnh sarcom, bệnh ung thư da, khối u tế bào xanh tròn nhỏ ở trẻ em (kể cả u nguyên bào thần kinh và sarcom cơ vân), sarcom mô mềm, bệnh ung thư tế bào vảy (ví dụ, bệnh ung thư tế bào vảy của đầu và cổ (SCCHN), bệnh ung thư dạ dày, bệnh sarcom hoạt dịch, bệnh ung thư tinh hoàn, caxinom tuyến ức, u tuyến ức, bệnh ung thư tuyến giáp (ví dụ, bệnh ung thư tuyến giáp di căn), và bệnh ung thư tử cung.

E_B29. Sử dụng E_B27, trong đó bệnh ung thư nêu trên là được chọn từ nhóm gồm: bệnh ung thư tuyến thượng thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, u nguyên bào đệm, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp, bệnh bạch cầu tủy cấp, bệnh bạch cầu tế bào lympho mãn tính, bệnh bạch cầu tủy mãn tính, bệnh bạch cầu tế bào lông, u lympho Burkett, u lympho tế bào B lớn khuếch tán, u lympho thể nang, u lympho tế bào vỏ, u lympho vùng rìa, bệnh ung thư hầu trung biểu mô, u lympho không phải Hodgkin, u lympho tế bào lympho nhỏ, đa u tủy, u melanin, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư da, caxinom tế bào thận, khối u tế bào xanh tròn nhỏ ở trẻ em (kể cả u nguyên bào thần kinh và sarcom cơ vân), bệnh ung thư tế bào vảy (ví dụ, bệnh ung thư tế bào vảy của đầu và cổ (SCCHN), bệnh ung thư tinh hoàn, bệnh ung thư tuyến giáp (ví dụ, bệnh ung thư tuyến giáp di căn), và bệnh ung thư tử cung.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau khi đã mô tả chung sáng chế, sáng chế sẽ dễ dàng hiểu được thông qua các Ví dụ sau đây. Các ví dụ này minh họa các phương pháp khác nhau cho các chế phẩm trong các phương chẩn đoán hoặc điều trị của sáng chế. Các ví dụ này nhằm để minh họa mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Đặc tính chung, làm tương thích với người và xác định đặc tính của các kháng thể kháng-B7-H3

Tạo ra các kháng thể đơn dòng (mAb) bằng cách gây miễn dịch cho chuột bằng các tế bào tổ tiên phôi thai người còn sống hoặc các tế bào từng bước ung thư/khởi đầu khối u (CSLC) như đã được mô tả trước đây ("The glycotope-specific RAV12 monoclonal antibody induces oncosis in vitro and has antitumor activity against gastrointestinal adenocarcinoma tumor xenografts in vivo" Mol Cancer Ther; 6: 856-65, của Loo *et al.* (2007)). Sàng lọc hoá mô miễn dịch (IHC) đối với các mAb đặc hiệu-ung thư nhận diện panen các mAb phản ứng kháng-B7-H3 (CD276) với khả năng gắn kết mô bình thường-so với-khối u có tính phân biệt cao. Phân nhóm các kháng thể kháng-B7-H3 mà đã được nhập nội bào hiệu quả được nhận diện bằng thử nghiệm nhập nội bào được thực hiện trong thử nghiệm 5 ngày bằng cách sử dụng Fab kháng-chuột được tiếp hợp-saporin ở tỷ lệ Fab-ZAP:mAb thử nghiệm là 1:1 hoặc 10:1 theo quy trình của nhà sản xuất (Advanced Targeting Systems). Như thể hiện trên Fig. 7, các kháng thể kháng-B7-H3 kể cả các kháng thể kháng-B7-H3 được ký hiệu là "mAb-C," và "mAb-D" được nhập nội bào hiệu quả.

Các mAb kháng-B7-H3 của chuột nêu trên: mAb-B, mAb-C và mAb-D được sử dụng để tạo thành các miền VL và VH được làm tương thích với người, trong đó các CDR_L và CDR_H của các miền này được dung hợp với miền khung của người. Các miền VH và VL được làm tương thích với người tiếp đó được sử dụng để tạo ra các chuỗi nhẹ được làm tương thích với người có vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa (có nghĩa là, SEQ ID NO:1) và CH1 của IgG1, miền bản lề, và miền Fc (có nghĩa là, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:12). Các kháng thể được làm tương thích với người được ký hiệu là "hmAb-B," "hmAb-C," và "hmAb-D."

Trình tự axit amin của các miền VL và VH được làm tương thích với người được đề xuất ở trên. Lưu ý là các CDR của hmAb-B có thể được cải biến để tạo ra các miền VL và VH được làm tương thích với người như đề cập ở trên. Trình tự axit amin của toàn bộ các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được làm tương thích với người của hmAb-C và hmAb-D được đề xuất ở trên.

Động học gắn kết của các kháng thể được làm tương thích với người được khảo sát bằng cách phân tích Biacore trong đó protein dung hợp nhãn B7-H3 (4Ig)-His của người hoặc khỉ cyno hòa tan (tương ứng là shB7-H3-His hoặc scB7-H3-His) được cho chảy qua các kháng thể được cố định. Vắn tắt là, lần lượt kháng thể được làm tương thích với người được bắt giữ trên bề mặt Fc của dê kháng-người Fab2 cố định và được ủ với shB7-H3-His hoặc scB7-H3-his (6,25-100Nm), và xác định động học gắn kết bằng cách phân tích Biacore. k_a, k_d và K_D được tính toán từ các nghiên cứu này bằng cách khớp số liệu gắn kết hoá trị hai được trình bày trong Bảng 6. Các kết quả chứng tỏ là các kháng thể được làm tương thích với người gắn kết B7-H3 của người và khỉ cynomolgus với một khoảng ái lực.

Bảng 6

	Người			**Khỉ cynomolgus**		
Kháng thể	**K_a (x10^4)**	**K_d (x10^{-4})**	**K_D (nM)**	**K_a (x10^4)**	**K_d (x10^{-4})**	**K_D (nM)**
hmAb-B	11,0	0,12	0,11	7,1	2,9	4,1
hmAb-C	16	34	21,3	6,4	31	48,4
hmAb-D	3,4	22	62,9	1,35	77	592,3

Tính phản ứng chéo mô của các kháng thể được làm tương thích với người được khảo sát bằng hoá mô miễn dịch (IHC). Bảng 7 tóm tắt một số nghiên cứu IHC được tiến hành trên các mô của người bình thường, các mô khối u của người, các dòng tế bào ung thư của người, và các dòng tế bào CHO biểu hiện hoặc không biểu hiện B7-H3 bằng cách sử dụng các kháng thể kháng-B7-H3 được làm tương thích với người ở các nồng độ kháng thể chỉ định. Điểm đánh giá cho các nghiên cứu này được đề xuất trong Bảng 8.

Bảng 7

Mô	**ID mẫu**	**hmAb-B 0,313 ug/ml**	**hmAb-C 0,625 ug/ml**	**hmAb-D 2,5 ug/ml**
Ruột kết	MG06-CHTN-94F	epi 2+ (c) ít gặp	Các tế bào lamina propria 1+ (c) rất hiếm gặp	-

Bảng 7				
Mô	**ID mẫu**	**hmAb-B 0,313 ug/ml**	**hmAb-C 0,625 ug/ml**	**hmAb-D 2,5 ug/ml**
Gan	ILS11103A	các tế bào gan 3+ (m) ít gặp đến hay gặp	các tế bào gan 2-3+ (m) hiếm gặp đến ít gặp	các tế bào gan 1+ (m) hiếm gặp
Thận	ILS11119D	epi 1+ (c) hiếm gặp	-	-
Tụy	ILS10266	Sợi 3+ (c) hiếm gặp	endo 1+ (c,m) rất hiếm gặp	-
Phổi	MG06-CHTN-85-A-2	Tế bào phổi 1+ (c) ít gặp	-	-
Tim	MG06-CHTN-76B	endo 2+ (c) hiếm gặp đến ít gặp	endo 1+ (c) rất hiếm gặp	-
Da	MG03-St.Agn-50B	epi 2+ (c) ít gặp	epi dạng vảy 1+ (c,m) hiếm gặp	-
Tuyến thượng thận	MG04-St.Agn-22B-A	4+ (m,c) hay gặp	epi 3+ (m,c) ít gặp đến hay gặp	epi 2+ (c,m) hiếm gặp đến ít gặp
Bệnh ung thư đầu và cổ (tế bào vảy)	VNM00340-D03	2	2	1
	VNM00302-D01	3	2	1
	ILS7068-D04	3	2	1
	ILS2073-D01	3	3	2
Bệnh ung thư phổi (NSCLC)	ILS7115-C	3	2	1
	ILS7253-C	2	1	1
	ILS2153-G	3	2	1
	ILS-11149- C	2	chỉ 1 (BV)	1
Hs700T ABC = 2.1e6	91812	4+ (c,m) hay gặp	4+ (m > c) hay gặp	2-3+ (m)
NCI-H1703 ABC = 8.1e5	033115-1	3-4+ (c) hay gặp	2-3+ (c,m) ít gặp đến hay gặp	±
CHO +B7H3 Cl 31	32113	2+ (c) hay gặp	3-4+ (c, m) hay gặp	3+ (m, c)

Bảng 7				
Mô	**ID mẫu**	**hmAb-B 0,313 ug/ml**	**hmAb-C 0,625 ug/ml**	**hmAb-D 2,5 ug/ml**
ABC = 4.9e6				
CHO +B7H3 Cl 32 ABC = 2.2e5	31813	3+ (c) hay gặp	1-2+ (c) hiếm gặp đến ít gặp	±
CHO - B7-H3	060414-2	-	-	-
c: bào tương	m: màng	epi: biểu mô	Tu: khối u	BV: mạch máu

Bảng 8			
Điểm đánh giá mô bình thường:		**Điểm đánh giá khối u:**	
-	âm tính	0 (âm tính):	không nhuộm màu
±	không rõ rệt	1 (yếu):	1-100% các tế bào nhuộm màu đặc trưng với 1+ cường độ nhuộm màu hoặc 1-20% các tế bào nhuộm màu đặc trưng với 2+ cường độ nhuộm màu
1+	yếu		
2+	trung bình	2 (trung bình):	2+ cường độ nhuộm màu ở 21-79% các tế bào nhuộm màu đặc trưng hoặc 3+ cường độ nhuộm màu ở 1-49% các tế bào nhuộm màu đặc trưng
3+	mạnh		
4+	rất mạnh	3 (mạnh):	2+ cường độ nhuộm màu ở 80-100% các tế bào nhuộm màu đặc trưng hoặc 3+ cường độ nhuộm màu ở $\geq$ 50% các tế bào nhuộm màu đặc trưng.

Các kết quả này chứng tỏ là tất cả các kháng thể được làm tương thích với người thể hiện khả năng gắn kết với nhiều loại tế bào khối u dương tính B7-H3. hmAb-B không chỉ thể hiện tính phản ứng khối u lớn nhất trong các điều kiện thử nghiệm, mà còn thể hiện tính phản ứng mô bình thường đối với các tế bào gan và mô tuyến thượng thận. hmAb-C thể hiện tính phản ứng khối u hơi giảm đi so với hmAb-

B, nhưng cũng thể hiện tính phản ứng thấp hơn đáng kể với các tế bào gan bình thường, và cũng có tính phản ứng ở ít các mẫu độc lập hơn. hmAb-D thể hiện tính phản ứng nói chung giảm đi đối với các mô khối u và mô bình thường. Các kháng thể chứng tỏ tính phản ứng chéo tương đương nhau với các mô của khỉ cynomolgus mặc dù hmAb-D gắn kết với cường độ thấp hơn trong các nghiên cứu IHC này. Để giảm tối thiểu độc tính nhắm đích hmAb-C và hmAb-D có thể được ưu tiên để tạo ra các phân tử B7-H3-ADC của sáng chế.

Ví dụ 2

Sản xuất B7-H3-ADC

Các mAb kháng-B7-H3 của chuột nêu trên: mAb-A, mAb-B, mAb-C và mAb-D được sử dụng để tạo thành các kháng thể khảm, trong đó miền VL của các kháng thể này được dung hợp với vùng ổn định Kappa chuỗi nhẹ của người (SEQ ID NO:1), và trong đó miền VH của các kháng thể này được dung hợp với vùng ổn định CH1-miền bản lề-CH2-CH3 của IgG1 của người (tương ứng là SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, và SEQ ID NO:12). Các kháng thể được khảm hoá ("chmAb-A," "chmAb-B," "chmAb-C," và "chmAb-D") được biến đổi thành B7-H3-ADC bằng cách tiếp hợp-xystein miền gắn kết B7-H3 của nó với liên kết auristatin E có thể phân cắt/payload "vc-MMAE" (Concortis Biosystems), như đề cập ở trên.

Ví dụ 3

Các B7-H3-ADC thể hiện hoạt tính mạnh *in vitro*

Để chứng tỏ hoạt tính chống khối u của B7-H3-ADC của sáng chế, B7-H3-ADC (MMAE) nêu trên được ủ ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 100.000 pM với các tế bào ung thư vú JIMT-1 biểu hiện-B7-H3, các tế bào ung thư vú MDA-MB-468, các tế bào u melanin A375.52, các tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ Calu-6, các tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ NCI-H1703, các tế bào ung thư phổi không tế bào nhỏ NCI-H1975, các tế bào ung thư buồng trứng PA-1, các tế bào ung thư tụy Hs700T, các tế bào ung thư tuyến tiền liệt DU145, hoặc các tế bào u lympho tế bào Raji âm tính-B B7-H3. Định lượng độc tính tế bào *in vitro* sau 7 ngày. Vắn tắt là, các B7-H3-ADC và các phân tử đối chứng được pha loãng và dàn vào các

đĩa vi chuẩn độ, bổ sung thêm 5000 tế bào vào mỗi giếng và ủ ở 37°C trong từ 4 đến 7 ngày. Thêm thuốc thử Alamar Blue (ví dụ, BioRad/ThermoFisher/Invitrogen) vào các đĩa và đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Xác định số lượng vị trí gắn kết kháng thể có mặt trên các tế bào này bằng cách sử dụng bộ kit Bangs QFACS™.

Đường đồ thị độc tính tế bào từ nghiên cứu này được trình bày trên Fig. 8A-Fig. 8J. Xác định các giá trị IC50 và đưa vào Bảng 9. Các kết quả của các nghiên cứu này chứng tỏ là từng kháng thể kháng-B7-H3 nhập nội bào được thử nghiệm thể hiện độc tính tế bào phụ thuộc-liều dùng *in vitro* đối với các tế bào khối u biểu hiện-B7-H3. Các kháng thể thể hiện khoảng hiệu nghiệm. Độ hiệu nghiệm tương đối trong các thử nghiệm này là: chmAb-C > chmAb-B > chmAb-D > chmAb-A.

Bảng 9

B7-H3-ADC	Dòng tế bào								
	ung thư vú		u melanin	ung thư phổi không tế bào nhỏ			ung thư buồng trứng	ung thư tụy	ung thư tuyến tiền liệt
	JIMT-1	MDA-MB-468	A375.52	Calu-6	NCI-H1703	NCI-H1975	PA-1	Hs700T	DU145
	Vị trí gắn kết kháng thể/tế bào (x 10^5)								
	11	4,2	7,5	8,5	8,1	4,8	6,1	21	2,4
	IC50 (pM)								
chmAb-A B7-H3 ADC	9100	8095	703	995	1517	26976	8326	607	20153
chmAb-B B7-H3 ADC	221	352	153	59	90	31	555	159	3770
chmAb-C B7-H3 ADC	124	201	267	30	43	16	409	109	465
chmAb-D B7-H3 ADC	735	1383	887	171	219	162	1795	303	2587

Ví dụ 4

Các B7-H3-ADC thể hiện hoạt tính mạnh *in vivo*

Để chứng tỏ hơn nữa hoạt tính chống khối u của B7-H3-ADC của sáng chế, các phân tử chmAb-B B7-H3-ADC, chmAb-C B7-H3-ADC, và/hoặc chmAb-D B7-H3-ADC (MMAE) nêu trên được đánh giá độc tính *in vivo* trên mô hình chuột trụi CD1 bằng cách sử dụng các dòng tế bào khối u khác nhau. Vắn tắt là, ~5 x 10^6 tế bào khối u (được tạo huyền phù trong môi trường 1:1 và MATRIGEL®) được cấy dưới da vào bên sườn của các con chuột trụi CD1 (Charles River Laboratories). Khi các khối u đạt đến kích thước khoảng 150 mm^3, các con chuột được chọn ngẫu nhiên và B7-H3-ADC hoặc chất dẫn đối chứng được cho dùng trong màng bụng. Trong các nghiên cứu này, cho dùng một liều dùng của B7-H3-ADC hoặc chất dẫn đối chứng (qdx1). Đo kích thước khối u hai lần/tuần theo hai chiều vuông góc bằng thước cặp điện tử, trong đó thể tích khối u được tính như sau: (chiều dài x chiều rộng x chiều cao)/2. Thể tích khối u (so với đối chứng) được xác định ("T/C"). Nhận thấy là thể tích khối u của các con chuột được điều trị giảm còn ≤ 5 mm^3 trong thời gian nghiên cứu được coi là Đáp ứng Hoàn toàn ("CR").

Hoạt tính *in vivo* chống lại tế bào khối u ung thư vú MDA-MB-468

Các kết quả của nghiên cứu này đối với tế bào khối u ung thư vú MDA-MB-468 được cấy vào mô đệm mỡ vú được trình bày trong Bảng 10 và trên Fig. 9, và thể hiện có đáp ứng chống lại tế bào khối u MDA-MB-468.

Bảng 10				
Điều trị (Liều ban đầu vào ngày 30)	**Liều dùng (mg/kg)**	**T/C**	**CR**	**Đáp ứng**
chmAb-B B7-H3 ADC	10	4	6/7	Có hoạt tính cao
chmAb-C B7-H3 ADC	10	20	4/7	Có hoạt tính cao
chmAb-D B7-H3 ADC	10	8	1/7	Có hoạt tính cao

Hoạt tính *in vivo* chống lại các tế bào khối u ung thư phổi không tế bào nhỏ NCI-H1703

Các kết quả của nghiên cứu này đối với các tế bào khối u ung thư phổi không tế bào nhỏ NCI-H1703 được cấy dưới da được trình bày trong Bảng 11 và trên Fig. 10A-Fig. 10C, và thể hiện có đáp ứng chống lại các tế bào khối u NCI-H1703.

Bảng 11				
Điều trị (Liều ban đầu vào ngày 52)	**Liều dùng (mg/kg)**	**T/C**	**CR**	**Đáp ứng**
chmAb-B B7-H3-ADC	10	28	5/7	Có hoạt tính cao
	3	22	3/7	Có hoạt tính cao
	1	74	0/7	Có hoạt tính
chmAb-C B7-H3-ADC	10	0	6/7	Có hoạt tính cao
	3	11	5/7	Có hoạt tính cao
	1	70	0/7	Có hoạt tính
chmAb-D B7-H3-ADC	10	32	5/7	Có hoạt tính cao
	3	4	6/7	Có hoạt tính cao
	1	76	0/7	Có hoạt tính

Hoạt tính *in vivo* chống lại các tế bào khối u ung thư buồng trứng PA-1

Các kết quả của nghiên cứu này đối với các tế bào khối u ung thư buồng trứng PA-1 được cấy dưới da được trình bày trong Bảng 12 và trên Fig. 11A- Fig. 11C, và thể hiện có đáp ứng chống lại các tế bào khối u PA-1.

Bảng 12				
Điều trị (Liều ban đầu vào ngày 42)	**Liều dùng (mg/kg)**	**T/C**	**CR**	**Đáp ứng**
chmAb-B B7-H3-ADC	10	0	6/7	Có hoạt tính cao
	3	65	0/7	Có hoạt tính
	1	105	0/7	Không có hoạt tính
chmAb-C B7-H3-ADC	10	37	3/7	Có hoạt tính cao
	3	76	1/7	Có hoạt tính
	1	93	0/7	Không có hoạt tính
chmAb-D B7-H3-ADC	10	11	7/7	Có hoạt tính cao
	3	57	1/7	Có hoạt tính
	1	113	0/7	Không có hoạt tính

Hoạt tính *in vivo* chống lại các tế bào khối u ung thư phổi không tế bào nhỏ Calu-6

Các kết quả của nghiên cứu này đối với các tế bào khối u ung thư phổi không tế bào nhỏ Calu-6 được cấy dưới da được trình bày trong Bảng 13 và trên Fig. 12A-Fig. 12C, và thể hiện có đáp ứng chống lại các tế bào khối u Calu-6.

Bảng 13

Điều trị (Liều ban đầu vào ngày 20)	Liều dùng (mg/kg)	T/C	CR	Đáp ứng
chmAb-B B7-H3-ADC	10	15	3/7	Có hoạt tính cao
	3	35	0/7	Có hoạt tính
	1	64	0/7	Có hoạt tính
chmAb-C B7-H3-ADC	10	1	3/7	Có hoạt tính cao
	3	87	0/7	Không có hoạt tính
	1	68	0/7	Có hoạt tính
chmAb-D B7-H3-ADC	10	39	2/7	Có hoạt tính cao
	3	43	0/7	Có hoạt tính
	1	54	0/7	Có hoạt tính

Hoạt tính *in vivo* chống lại các tế bào khối u melanin A375.S2

Các kết quả của nghiên cứu này đối với các tế bào khối u melanin A375.S2 được cấy dưới da được trình bày trong Bảng 14 và trên Fig. 13A-Fig. 13C, và thể hiện có đáp ứng chống lại các tế bào u melanin A375.S2.

Bảng 14

Điều trị (Liều ban đầu vào ngày 20)	Liều dùng (mg/kg)	T/C	CR	Đáp ứng
chmAb-B B7-H3-ADC	10	3	2/7	Có hoạt tính cao
	3	13	0/7	Có hoạt tính cao
	1	65	0/7	Có hoạt tính
chmAb-C B7-H3-ADC	10	4	1/7	Có hoạt tính cao
	3	23	0/7	Có hoạt tính cao
	1	70	0/7	Có hoạt tính
chmAb-D B7-H3-ADC	10	26	0/7	Có hoạt tính cao

	3	7	0/7	Có hoạt tính cao
	1	80	0/7	Có hoạt tính

Các kết quả của các nghiên cứu này chứng tỏ là các B7-H3-ADC được thử nghiệm đều thể hiện hoạt tính chống u *in vivo* đáng kể phụ thuộc-liều dùng đối với các khối u dương tính-B7-H3 trên mô hình ghép khác loài ở chuột của bệnh ung thư vú, bệnh ung thư phổi và bệnh ung thư buồng trứng cũng như u melanin.

Dược động học của các phân tử B7-H3-ADC (MMAE) nêu trên được đánh giá trên chuột trụi CD1 không có khối u bằng cách cho dùng trong màng bụng các phân tử này ở liều dùng duy nhất 5 mg/kg. Thu gom các mẫu máu trong thời gian 10 ngày và tiến hành sandwich ELISA trên huyết thanh để định lượng nồng độ kháng thể toàn phần và nồng độ B7-H3-ADC nguyên vẹn.

Các kết quả đại diện của nghiên cứu này, đối với chmAb-B B7-H3 ADC, chmAb-C B7-H3 ADC, và chmAb-D B7-H3 ADC, được trình bày trên Fig. 14A-Fig. 14C và trong Bảng 15, và cho thấy là các phân tử B7-H3-ADC có độ ổn định cao, thể hiện thời gian bán thải khoảng từ 2,2 đến 3,6 ngày. Thời gian bán thải của các thể tiếp hợp là tương đương với thời gian bán thải của các phân tử không được tiếp hợp, chứng tỏ là các phân tử B7-H3-ADC có độ ổn định cao ở chuột.

Bảng 15

B7-H3-ADC	**Kháng thể kháng-B7-H3 toàn phần**		**B7-H3-ADC nguyên vẹn***	
	$T_{1/2}$ (giờ)	**AUC (giờ*ng/mL)**	**$T_{1/2}$ (giờ)**	**AUC (giờ*ng/mL)**
chmAb-B B7-H3 ADC	114,1	4,796,235	58,9	4,032,575
chmAb-C B7-H3 ADC	75,9	2,698,831	52,6	2,201,893
chmAb-D B7-H3 ADC	177,2	5,162,024	87,3	3,502,158

*thể tiếp hợp MMAE

Ví dụ 5

B7-H3-ADC có liên kết có thể phân cắt-nhóm duocarmyxin

B7-H3-ADC được tạo cấu trúc ("hmAb-C B7-H3-ADC") có nhóm duocarmyxin (DUBA) ví dụ được liên kết với gốc axit amin của phần Ab của nó bằng liên kết có thể phân cắt được tiếp hợp với kháng thể này thông qua các disulfua giữa các chuỗi đã khử, như đề cập ở trên (xem Sơ đồ 9A-Sơ đồ 9I) và trong tài liệu "*Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmyxin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody–Drug Conjugate SYD985*," Mol. Pharmaceut. 12:1813-1835, (2014) của Elgersma, R.C. *et al.* (cũng xem, WO 02/083180; WO 2010/062171; WO 2011/133039; WO 2015/104359; và WO 2015/185142). Tỷ lệ dược chất so với kháng thể (DAR) trung bình là khoảng từ 2 đến 4, thông thường khoảng 2,7. Nên hiểu là DAR chính xác có thể thay đổi tùy theo từng chế phẩm. Trình tự các bước của quá trình tổng hợp có thể thay đổi theo ý muốn. Ưu tiên là phương pháp được sử dụng sẽ là phương pháp của các Sơ đồ 9A-Sơ đồ 9I, như đề cập ở trên, và liên kết-DUBA được tiếp hợp với kháng thể thông qua các disulfua giữa các chuỗi đã khử.

Ví dụ 6

B7-H3-ADC có liên kết có thể phân cắt-nhóm duocarmyxin vẫn giữ được hoạt tính sinh học

hmAb-C B7-H3-ADC nêu trên (có nhóm duocarmyxin (DUBA) ví dụ được liên kết với gốc axit amin của phần Ab của nó bằng liên kết có thể phân cắt) ("hmAb-C-DUBA") được ủ với các tế bào trong 7 ngày và xác định khả năng sống sót bằng cách sử dụng thử nghiệm xanh Alamar về cơ bản như đề cập ở trên. Như thể hiện trên Fig. 15A-Fig. 15C, cấu trúc hmAb-C-DUBA vẫn giữ được hoạt tính sinh học, như được chứng minh bằng hoạt tính gây độc tế bào đối với tế bào khối u dương tính B7-H3. Nhận thấy các kết quả tương tự đối với chmAb-C được liên kết với duocarmyxin ("chmAb-C-DUBA") nêu trên.

Trong nghiên cứu này và các nghiên cứu bổ sung được mô tả dưới đây, phân tử mà gắn kết kháng nguyên không liên quan (CD20) được tiếp hợp với DUBA

("Ctrl-DUBA") được sử dụng làm ADC đối chứng không gắn kết để tính đến hoạt tính không đặc hiệu *in vivo* do carboxyesteraza CES1c đặc trưng cho loài gặm nhấm có trong huyết tương của loài gặm nhấm.

Ví dụ 7

B7-H3-ADC thể hiện hoạt tính chống khối u mạnh *in vivo*

Thực hiện một nghiên cứu đa liều dùng để đánh giá hiệu lực *in vivo* của phân tử này. Các tế bào caxinom phổi không tế bào nhỏ Calu-6 được cấy dưới da vào các nhóm chuột (n=5) cơ bản như đề cập ở trên, các con chuột này tiếp đó được cho dùng các liều dùng của hmAb-C-DUBA (1 mg/kg x 3, 3 mg/kg x 3, hoặc 6 mg/kg x 3) vào Ngày 24, 31, 38 và 45 (được chỉ ra các bằng mũi tên) sau khi chủng nhiễm, và đánh giá các con này về thể tích khối u (về cơ bản như đề cập ở trên) cho đến 62 ngày. Như thể hiện trên Fig. 16, tất cả ba liều dùng được thử nghiệm của hmAb-C-DUBA đã chứng tỏ là hữu hiệu làm giảm thể tích hoặc loại bỏ khối u. Các tế bào Calu-6 thể hiện điểm IHC bằng 2+ và các vị trí gắn kết kháng thể/tế bào (ABC) được báo cáo trong Bảng 9.

Trong nghiên cứu *in vivo* thứ hai (được tiến hành về cơ bản như đề cập ở trên), các tế bào caxinom phổi không tế bào nhỏ Calu-6 được cấy dưới da vào các nhóm chuột (n=7), các con chuột này tiếp đó được cho dùng liều dùng duy nhất của hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (3 mg/kg hoặc 10 mg/kg) vào ngày 20 (được chỉ ra bằng mũi tên). Bảng 16 và Fig. 17 tóm tắt các kết quả, và cho thấy là cho dùng hmAb-C-DUBA làm giảm đáng kể thể tích khối u.

Bảng 16

Điều trị	**Liều dùng – QW (mg/kg)**	**Thể tích khối u Điều trị/đối chứng %**	**Thuyên giảm hoàn toàn**
hmAb-C-DUBA	10	8	0/7
hmAb-C-DUBA	3	41	0/7
Ctrl-DUBA	10	71	0/7
Ctrl-DUBA	3	71	0/7

Trong nghiên cứu *in vivo* thứ ba (được tiến hành về cơ bản như đề cập ở trên), các tế bào caxinom buồng trứng PA-1 được cấy dưới da vào các nhóm chuột (n=6), các con chuột này tiếp đó được cho dùng liều dùng duy nhất của hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (1 mg/kg, 6 mg/kg hoặc 10 mg/kg) vào ngày 25 (được chỉ ra bằng mũi tên). Bảng 17 và Fig. 18 tóm tắt các kết quả, và cho thấy là cho dùng hmAb-C-DUBA làm giảm đáng kể thể tích khối u, và đạt được sự thuyên giảm hoàn toàn cho đến một nửa số chuột được điều trị.

Bảng 17

Điều trị	**Liều dùng – QW (mg/kg)**	**Thể tích khối u Điều trị/ đối chứng %**	**Thuyên giảm hoàn toàn**
hmAb-C-DUBA	10	11	3/6
hmAb-C-DUBA	6	9	2/6
hmAb-C-DUBA	3	57	1/6
Ctrl-DUBA	10	84	0/6
Ctrl-DUBA	6	89	0/6
Ctrl-DUBA	3	111	0/6

Cũng nhận thấy có hoạt tính mạnh *in vivo* đối với các tế bào u melanin A375.S2. Các tế bào này được cấy dưới da vào các nhóm chuột (n=7) (về cơ bản như đề cập ở trên), các con chuột này tiếp đó được cho dùng liều dùng duy nhất của hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (1 mg/kg hoặc 3 mg/kg) vào ngày 25 (được chỉ ra bằng mũi tên). Bảng 18 và Fig. 19 tóm tắt các kết quả, và cho thấy là cho dùng hmAb-C-DUBA làm giảm đáng kể thể tích khối u, và đạt được sự thuyên giảm hoàn toàn ở 5/7 con chuột được điều trị ở liều dùng được thử nghiệm cao hơn.

Bảng 18

Điều trị	**Liều dùng – QW (mg/kg)**	**Thể tích khối u Điều trị/đối chứng %**	**Thuyên giảm hoàn toàn**
hmAb-C-DUBA	3	1	5/7
hmAb-C-DUBA	1	16	1/7

Bảng 18			
Điều trị	**Liều dùng – QW (mg/kg)**	**Thể tích khối u Điều trị/đối chứng %**	**Thuyên giảm hoàn toàn**
Ctrl-DUBA	3	33	0/7
Ctrl-DUBA	1	70	1/7

Cũng nhận thấy có hoạt tính mạnh *in vivo* đối với các tế bào caxinom vú MDA-MB468. Các tế bào này được cấy vào mô đệm mỡ vú của các nhóm chuột (n=5) (về cơ bản như đề cập ở trên), các con chuột này tiếp đó được cho dùng liều dùng duy nhất của hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (3 mg/kg hoặc 6 mg/kg) vào ngày 70 hoặc ba liều dùng của hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (3 mg/kg (được chỉ ra bằng các mũi tên). Đánh giá các con chuột về thể tích khối u (về cơ bản như đề cập ở trên) cho đến 110 ngày. Các tế bào MDA-MB468 thể hiện điểm IHC = 2+, và ABC được báo cáo trong Bảng 9. Bảng 19 và Fig. 20A-Fig. 20D tóm tắt các kết quả. Fig. 20A thể hiện kết quả đối với chất dẫn, hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA ở liều 6 mg/kg (liều duy nhất). Fig. 20B thể hiện kết quả đối với chất dẫn, hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA ở liều 3 mg/kg (liều duy nhất). Fig. 20C thể hiện kết quả đối với chất dẫn, hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA ở liều 3 mg/kg (ba liều dùng). Fig. 20D thể hiện tất cả các kết quả trên một đồ thị duy nhất. Dữ liệu cho thấy cho dùng hmAb-C-DUBA làm giảm đáng kể thể tích khối u, và đạt được sự thuyên giảm hoàn toàn ở 4/5 con chuột được điều trị ở liều dùng được thử nghiệm cao hơn, và cho dùng các liều dùng lặp lại cải thiện rõ rệt kết quả điều trị.

Bảng 19			
Điều trị	**Liều dùng – QW (mg/kg)**	**Thể tích khối u Điều trị/đối chứng %**	**Thuyên giảm hoàn toàn**
hmAb-C-DUBA	6	1	4/5
hmAb-C-DUBA	3	51	1/5
hmAb-C-DUBA	3 x 3 liều dùng	2	3/5
Ctrl-DUBA	6	41	0/5
Ctrl-DUBA	3	43	0/5
Ctrl-DUBA	3 x 3 liều dùng	53	0/5

Trong một nghiên cứu khác, ghép khác loài các tế bào caxinom buồng trứng PA-1 (~5 x 10^6 tế bào khối u được tạo huyền phù trong môi trường 1:1 và MATRIGEL®) được đưa dưới da vào các nhóm chuột, các con chuột này tiếp đó được cho dùng liều dùng của hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA (liều dùng duy nhất 3 mg/kg, 6 mg/kg hoặc 10 mg/kg) vào ngày 24 sau khi chủng nhiễm, hoặc hai liều dùng 10 mg/kg của hmAb-C-DUBA (vào ngày 24 và 28 sau khi chủng nhiễm) hoặc bốn liều dùng 6 mg/kg của hmAb-C-DUBA (vào ngày 24, 28, 31 và 35 sau khi chủng nhiễm). Đánh giá thể tích khối u ở các con chuột này cho đến 70 ngày (về cơ bản như đề cập ở trên). Các tế bào PA-1 thể hiện điểm IHC = 2+, và ABC được báo cáo trong Bảng 9. Fig. 21A- Fig. 21D tóm tắt các kết quả. Fig. 21A thể hiện kết quả đối với chất dẫn, hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA ở liều 10 mg/kg (liều duy nhất hoặc liều chia đôi). Fig. 21B thể hiện kết quả đối với chất dẫn, hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA ở liều 6 mg/kg (liều duy nhất hoặc liều chia bốn). Fig. 21C thể hiện kết quả đối với chất dẫn, hmAb-C-DUBA hoặc Ctrl-DUBA ở liều 3 mg/kg (liều duy nhất). Fig. 21D thể hiện tất cả các kết quả trên một đồ thị duy nhất. Dữ liệu cho thấy cho dùng hmAb-C-DUBA làm giảm đáng kể thể tích khối u ở các con chuột được điều trị.

Ví dụ 8

Dược động học của B7-H3-ADC

Dược động học của chmAb-C-DUBA nêu trên được khảo sát bằng cách sử dụng đồ thị log/tuyến tính IgG toàn phần hoặc ADC nguyên vẹn ở chuột (n=3) mà lần lượt được tiêm tĩnh mạch liều duy nhất của chmAb-C-DUBA (5 mg/kg). Các kết quả được thể hiện trên Fig. 22.

Dược động học của hmAb-C-DUBA được khảo sát bằng cách sử dụng đồ thị log/tuyến tính IgG toàn phần hoặc ADC nguyên vẹn ở khỉ cynomolgus mà lần lượt được tiêm tĩnh mạch liều duy nhất của hmAb-C-DUBA (1 mg/kg (1 con đực; 1 con cái), 3 mg/kg (1 con đực; 1 con cái), 10 mg/kg (1 con đực; 1 con cái) hoặc 27 mg/kg (2 con đực; 2 con cái)). Các kết quả được thể hiện trên Fig. 23A (IgG toàn phần) và Fig. 23B (ADC nguyên vẹn).

Trong các nghiên cứu này, xác định IgG toàn phần bằng ELISA. Vắn tắt là, bắt giữ các mẫu huyết thanh, mẫu chuẩn và mẫu đối chứng trên các đĩa vi chuẩn độ được phủ IgG của dê kháng-người (H+L). Sau khi rửa, ủ các đĩa với Fc của IgG của dê kháng-người được tiếp hợp peroxidaza. Sau khi rửa, xử lý các đĩa bằng cơ chất 3, 3', 5, 5'-tetrametylbenzidin (TMB), dừng phản ứng bằng axit phosphoric, và đọc các đĩa ở 405 nM. IgG toàn phần trong các mẫu thử được tính từ đường cong chuẩn. Xác định ADC nguyên vẹn cũng bằng ELISA. Vắn tắt là, mAb của chuột kháng-duocarmyxin được cố định trên các đĩa vi chuẩn độ. Sau khi rửa, ủ các đĩa với Fc của IgG của dê kháng-người được tiếp hợp peroxidaza. Sau khi rửa, xử lý các đĩa bằng cơ chất 3, 3', 5, 5'-tetrametylbenzidin (TMB), dừng phản ứng bằng axit phosphoric, và đọc các đĩa ở 405 nM. Tính toán ADC nguyên vẹn trong các mẫu thử từ đường cong chuẩn.

Các thông số dược động học cho các liều dùng 5 mg/kg ở chuột và 3 mg/kg và 10 mg/kg ở khỉ cynomolgus được suy ra bằng cách so sánh các dữ liệu này và tóm tắt trong Bảng 20 (trong đó AUC Last chỉ diện tích dưới đường cong tính từ thời điểm ban đầu cho đến thời điểm lấy dữ liệu cuối cùng). Nồng độ ADC nguyên vẹn ở chuột bị hạn chế do carboxyesteraza CES1c đặc trưng ở các loài gặm nhấm. Các dữ liệu này cho thấy chỉ số trị liệu rộng trong điều kiện cận lâm sàng.

Bảng 20

Loài	**Liều dùng (mg/kg)**	**$T_{1/2}$ (giờ)**	**C_{max} (ng/ml)**	**AUC cuối (giờ*µg/ml)**
Chuột	5	ND	5909	45
Khỉ	3	62,7	113484	3798
Khỉ	10	57,3	330983	17978

Ví dụ 9

Xác định đặc tính các diabody kháng-B7-H3

Các diabody hai-chuỗi và ba-chuỗi hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 được đánh giá để xác định khả năng của chúng điều tiết quá trình tiêu diệt tế bào được nhắm tới và/hoặc giải phóng xytokin từ các tế bào đích biểu hiện B7-H3 ở bề mặt tế bào. Tiêu diệt tế bào được nhắm tới được xét nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm lympho

bào T độc tính tế bào (CTL). Vắn tắt là, các diabody hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 (hoặc diabody đối chứng âm tính gắn kết kháng nguyên không liên quan thay vì B7-H3) được ủ trong 24 giờ với các tế bào pan T hiệu ứng và các tế bào khối u biểu hiện-B7-H3 đích ở tỷ lệ tế bào hiệu ứng so với tế bào đích là 10:1. % độc tính tế bào (có nghĩa là, tiêu diệt tế bào) được xác định bằng cách đo mức giải phóng lactat dehydrogenaza (LDH) vào môi trường của các tế bào bị tiêu diệt. Mức giải phóng xytokin được xét nghiệm bằng cách sử dụng hình thức tương tự. Vắn tắt là, các diabody hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 (hoặc diabody đối chứng âm tính không có vị trí gắn kết-B7-H3) được ủ trong 24 giờ với các tế bào PBMC hiệu ứng đơn độc hoặc với sự có mặt của các tế bào khối u đích(ví dụ, tế bào caxinom phổi SK-MES-1) ở tỷ lệ tế bào hiệu ứng so với tế bào đích là 10:1 hoặc 30:1 và xác định mức giải phóng các xytokin IFNγ, TNF-α, và IL-10. Phân tích này cho thấy khả năng của các diabody hai đặc hiệu B7-H3 x CD3 điều tiết tiêu diệt tế bào được nhắm tới và giải phóng xytokin.

Tất cả các tài liệu công bố và patent đề cập trong bản mô tả này được viện dẫn ở đây để tham khảo ở mức độ là mỗi tài liệu hoặc đơn sáng chế được chỉ ra cụ thể và mỗi tài liệu là được viện dẫn toàn bộ để tham khảo. Trong khi sáng chế đã được mô tả đề cập đến các phương án cụ thể của sáng chế, nên hiểu là có khả năng có cải biến hơn nữa và đơn sáng chế này nhằm bao gồm các thay đổi, ứng dụng hoặc chuyển thể của sáng chế nói chung theo các nguyên tắc của sáng chế và bao gồm những thay đổi so với bản mô tả này mà đã biết hoặc thuộc thực tiễn thông thường của lĩnh vực của sáng chế và có thể được ứng dụng cho các dấu hiệu cơ bản nêu trong bản mô tả này ở trên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể tiếp hợp dược chất kháng thể kháng-B7-H3 (B7-H3-ADC) có công thức:

$$Ab\text{-}(LM)_m\text{-}(D)_n,$$

trong đó:

Ab là kháng thể B7-H3 được làm tương thích với người hoặc mảnh gắn kết B7-H3 của nó mà gắn kết B7-H3 và bao gồm:

(i) miền chuỗi nhẹ thay đổi (VL) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20, và
(ii) miền chuỗi nặng thay đổi (VH) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21;

D là nhóm dược chất gây độc tế bào bao gồm độc tố tế bào duocarmyxin;

LM bao gồm ít nhất một liên kết hoặc phân tử liên kết mà liên kết cộng hoá trị Ab và D;

m là số nguyên trong khoảng từ 0 đến n và chỉ số lượng các phân tử liên kết của B7-H3-ADC;

và

n là số nguyên trong khoảng từ 1 đến 10 và chỉ số lượng các nhóm dược chất gây độc tế bào được liên kết cộng hoá trị với phân tử B7-H3-ADC.

2. B7-H3-ADC theo điểm 1, trong đó Ab nêu trên còn bao gồm miền Fc của IgG của người.

3. B7-H3-ADC theo điểm 2, trong đó IgG của người nêu trên là IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người.

4. B7-H3-ADC theo điểm 2, trong đó miền Fc nêu trên là miền Fc biến thể mà bao gồm:

   (a) một hoặc nhiều cải biến axit amin làm giảm ái lực của miền Fc biến thể đối với FcγR; và/hoặc

   (b) một hoặc nhiều cải biến axit amin làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của miền Fc biến thể.

5. B7-H3-ADC theo điểm 4, trong đó các cải biến nêu trên làm giảm ái lực của miền Fc biến thể đối với FcγR bao gồm thay thế của L234A; L235A; hoặc L234A và L235A, trong đó cách đánh số là theo chỉ số EU trong tài liệu của Kabat.

6. B7-H3-ADC theo điểm 4, trong đó các cải biến nêu trên làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của miền Fc biến thể bao gồm thay thế của M252Y; M252Y và S254T; M252Y và T256E; M252Y, S254T và T256E; hoặc K288D và H435K, trong đó cách đánh số là theo chỉ số EU trong tài liệu của Kabat.

7. B7-H3-ADC theo điểm 1, trong đó ít nhất một trong số các nhóm LM nêu trên là phân tử liên kết.

8. B7-H3-ADC theo điểm 7, trong đó phân tử liên kết LM nêu trên bao gồm liên kết có thể phân cắt.

9. B7-H3-ADC theo điểm 8, trong đó liên kết có thể phân cắt nêu trên là liên kết peptit.

10. B7-H3-ADC theo điểm 9, trong đó liên kết peptit nêu trên là liên kết dipeptit valin-xitrulin.

11. B7-H3-ADC theo điểm 8, trong đó phân tử liên kết LM nêu trên còn bao gồm liên kết đệm tự loại bỏ giữa liên kết có thể phân cắt và D.

12. B7-H3-ADC theo điểm 11, trong đó liên kết đệm tự loại bỏ nêu trên bao gồm nhóm para-aminobenzyloxycarbonyl.

13. B7-H3-ADC theo điểm 8, trong đó phân tử liên kết nêu trên còn bao gồm nhóm liên kết maleimit giữa liên kết có thể phân cắt và Ab.

14. B7-H3-ADC theo điểm 7, trong đó thể tiếp hợp nêu trên có công thức:

$Ab – [V-(W)_k-(X)_1-A] – D$, và LM có công thức:

$[V-(W)_k-(X)_1-A]$,

trong đó:

V là liên kết có thể phân cắt,

$(W)_k-(X)_1-A$ là hệ liên kết đệm tự loại bỏ, kéo dài mạch, mà tự loại bỏ thông qua quá trình loại bỏ-l,(4+2n),

W và X lần lượt là liên kết đệm dòng thác điện tử l,(4+2n), mà giống nhau hoặc khác nhau,

A là nhóm đệm có công thức $(Y)_m$, trong đó Y là liên kết đệm dòng thác điện tử l,(4+2n), hoặc nhóm có công thức U, mà là liên kết đệm loại bỏ tạo vòng,

k, 1 và m độc lập là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 5 (được bao gồm)),

n là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 10 (được bao gồm),

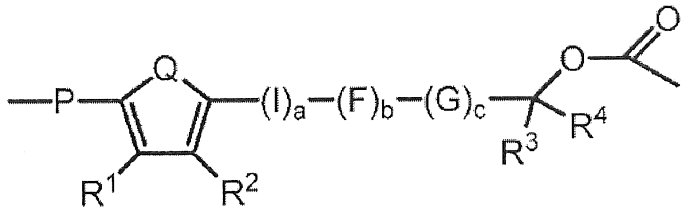
miễn là:

khi A là $(Y)_m$: thì $k+l+m \geq 1$, và

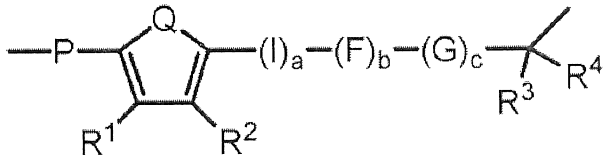
nếu $k+l+m=l$, thì $n>1$;

khi A là U: thì $k+1 \geq 1$.

W, X, và Y độc lập được chọn từ các hợp chất có công thức:



hoặc công thức:

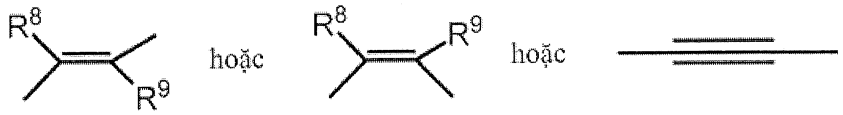


trong đó: Q là $-R^5C=CR^6-$, S, O, NR^5, $-R^5C=N-$, hoặc $-N=CR^5-$

P là NR^7, O hoặc S

a, b, và c độc lập là số nguyên từ 0 (được bao gồm) đến 5 (được bao gồm);

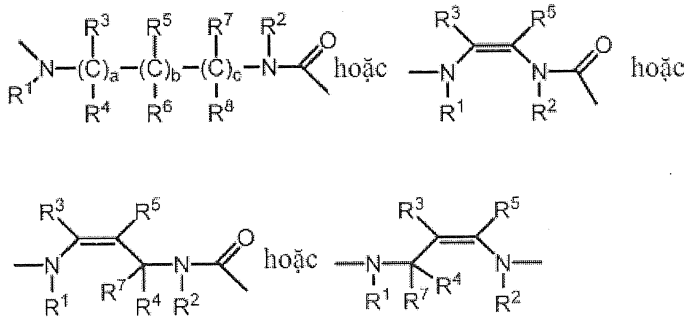
I, F và G độc lập được chọn từ các hợp chất có công thức:



trong đó R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, và R^9 độc lập là H, C_{1-6} alkyl, C_{3-20} heteroxyclyl, C_{5-20} aryl, C_{1-6} alkoxy, hydroxy (OH), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng, imidazolyl, C_{1-6} alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete (SR_x), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_x$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy ($S(=O)OH$), sulphinat ($S(=O)OR_x$), sulphinyl ($S(=O)R_x$), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 độc lập được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl, hai hoặc nhiều

nhóm thế R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, hoặc R^9 tùy ý được liên kết với nhau để tạo thành một hoặc nhiều cấu trúc vòng béo hoặc thơm;

U được chọn từ các hợp chất có công thức:



trong đó:

a, b và c độc lập được chọn từ số nguyên là 0 hoặc 1; miễn là a + b + c = 2 hoặc 3;

R^1 và/hoặc R^2 độc lập là H, C1-6 alkyl, alkyl này tùy ý được thế bởi một hoặc nhiều nhóm sau đây: hydroxy (OH), ete (OR_x), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng, imidazolyl, C_{1-6} alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete (SR_x), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_x$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy (S(=O)OH), sulphinat (S(=O)ORx), sulphinyl (S(=O)Rx), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl; và

R^3, R^4, R^5, R^6, R^7 và R^8 độc lập là H, C_{1-6} alkyl, C_{3-20} heteroxyclyl, C_{5-20} aryl, C_{1-6} alkoxy, hydroxy (OH), amino (NH_2), amino được thế một lần (NR_xH), amino được thế hai lần ($NR_x^1R_x^2$), nitro (NO_2), halogen, CF_3, CN, $CONH_2$, SO_2Me, CONHMe, C_{1-5} alkylamino vòng,

imidazolyl, C_{1-6} alkylpiperazinyl, morpholino, thiol (SH), thioete (SR_x), tetrazol, carboxy (COOH), carboxylat ($COOR_x$), sulphoxy ($S(=O)_2OH$), sulphonat ($S(=O)_2OR_x$), sulphonyl ($S(=O)_2R_x$), sulphixy (S(=O)OH), sulphinat ($S(=O)OR_x$), sulphinyl ($S(=O)R_x$), phosphonooxy ($OP(=O)(OH)_2$), và phosphat ($OP(=O)(OR_x)_2$), trong đó R_x, R_x^1 và R_x^2 được chọn từ nhóm C_{1-6} alkyl, nhóm C_{3-20} heteroxyclyl hoặc nhóm C_{5-20} aryl, và hai hoặc nhiều nhóm thế R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, hoặc R^8 tùy ý được liên kết với nhau để tạo thành một hoặc nhiều cấu trúc vòng béo hoặc thơm.

15. B7-H3-ADC theo điểm 14, trong đó phân tử liên kết LM nêu trên bao gồm:

(1) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(2) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(3) p-ammoxinnamyloxycarbonyl;

(4) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(5) p-amino-benzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

(6) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

(7) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl;

(8) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl;

(9) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl;

(10) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl;

(11) p-aminobenzyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino) carbonyl;

(12) p-aminoxinnamyloxycarbonyl(metylamino)etyl(metylamino) carbonyl;

(13) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl(metylamino) etyl(metylamino)carbonyl;

(14) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl (metylamino)etyl(metylamino)carbonyl;

(15) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl (metylamino)etyl(metylamino)-carbonyl;

(16) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyloxycarbonyl (metylamino)etyl(metylamino)carbonyl;

(17) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

(18) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminobenzyloxycarbonyl -p-aminobenzyl;

(19) p-aminoxinnamyl;

(20) p-aminoxinnamyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

(21) p-aminobenzyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

(22) p-amino-xinnamyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

(23) p-aminophenylpentadienyl;

(24) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminoxinnamyl;

(25) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminobenzyl;

hoặc

(26) p-aminophenylpentadienyloxycarbonyl-p-aminophenylpentadienyl.

16. B7-H3-ADC theo điểm 7, trong đó phân tử liên kết LM nêu trên được tiếp hợp với mạch bên của axit amin của chuỗi polypeptit của Ab và gắn kết Ab với phân tử của nhóm dược chất gây độc tế bào D.

17. B7-H3-ADC theo điểm 1, trong đó độc tố tế bào duocarmyxin nêu trên được chọn từ nhóm gồm duocarmyxin A, duocarmyxin B1, duocarmyxin B2, duocarmyxin C1, duocarmyxin C2, duocarmyxin D, duocarmyxin SA, CC-1065, adozelesin, bizelesin, carzelesin (U-80244), *seco*-duocarmyxin và spiro-duocarmyxin (DUBA).

18. B7-H3-ADC theo điểm 17, trong đó độc tố tế bào duocarmyxin nêu trên là *seco*-duocarmyxin.

19. B7-H3-ADC theo điểm 1, trong đó phân tử liên kết LM nêu trên được liên kết cộng hoá trị với Ab thông qua các disulfua giữa các chuỗi đã khử.

20. Phân tử gắn kết B7-H3, trong đó phân tử gắn kết B7-H3 này là kháng thể, diabody, hoặc mảnh gắn kết epitop của nó, mà có khả năng gắn kết với B7-H3, trong đó phân tử gắn kết B7-H3 này bao gồm:

    (i) miền chuỗi nhẹ thay đổi (VL) được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; và

    (ii) miền chuỗi nặng thay đổi (VH) được làm tương thích với người bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21.

21. Phân tử gắn kết B7-H3 theo điểm 20, phân tử này còn bao gồm miền Fc của IgG của người.

22. Phân tử gắn kết B7-H3 theo điểm 21, trong đó IgG của người nêu trên là IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 của người.

23. Phân tử gắn kết B7-H3 theo điểm 21, trong đó miền Fc nêu trên là miền Fc biến thể mà bao gồm:

    (a) một hoặc nhiều cải biến axit amin làm giảm ái lực của miền Fc biến thể đối với FcγR; và/hoặc

(b) một hoặc nhiều cải biến axit amin làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của miền Fc biến thể.

24. Phân tử gắn kết B7-H3 theo điểm 23, trong đó các cải biến nêu trên làm giảm ái lực của miền Fc biến thể đối với FcγR bao gồm thay thế của L234A; L235A; hoặc L234A và L235A, trong đó cách đánh số là theo chỉ số EU trong tài liệu của Kabat.

25. Phân tử gắn kết B7-H3 theo điểm 23, trong đó các cải biến nêu trên làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của miền Fc biến thể bao gồm thay thế của M252Y; M252Y và S254T; M252Y và T256E; M252Y, S254T và T256E; hoặc K288D và H435K, trong đó cách đánh số là theo chỉ số EU trong tài liệu của Kabat.

26. Dược phẩm bao gồm lượng hữu hiệu của B7-H3-ADC theo điểm 1 và chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng.

27. Dược phẩm bao gồm lượng hữu hiệu của phân tử gắn kết B7-H3 theo điểm 20 và chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng.

28. B7-H3-ADC theo điểm 1, trong đó:

Ab bao gồm:

(i) chuỗi nhẹ bao gồm miền chuỗi nhẹ thay đổi (VL) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20 và miền CL Kappa của SEQ ID NO:1; và

(ii) chuỗi nặng bao gồm miền chuỗi nặng thay đổi (VH) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21, miền CH1 của SEQ ID NO:3, miền bản lề của SEQ ID NO:7 và miền Fc chứa miền CH2-CH3 của SEQ ID NO:12;

D bao gồm seco-duocarmyxin; và

LM bao gồm phân tử liên kết chứa nhóm liên kết maleimit, liên kết valin-xitrulin dipeptit, và nhóm para-aminobenzyloxycarbonyl.

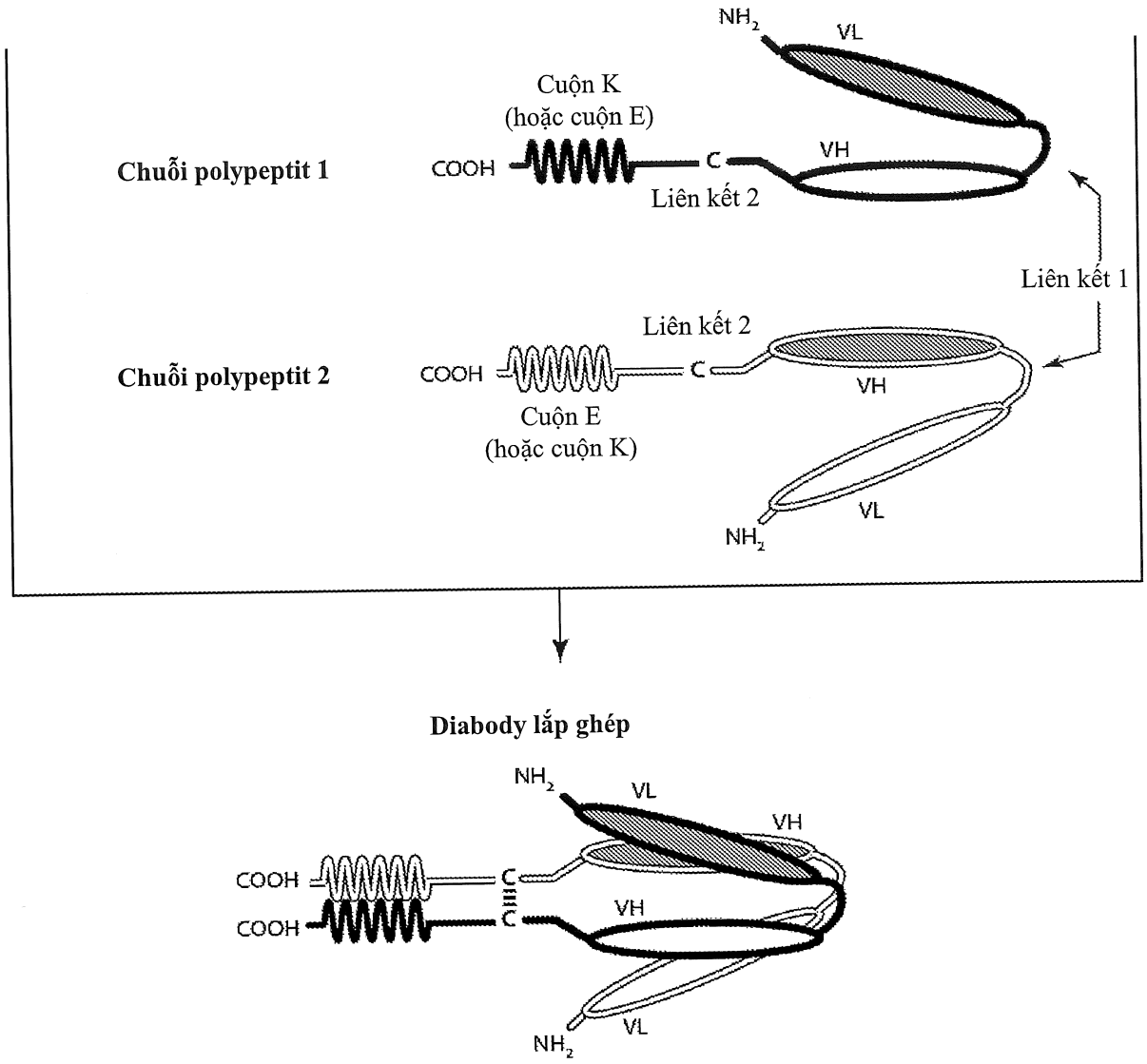

NH2
VL
Cuộn K
(hoặc cuộn E)
Chuỗi polypeptit 1
COOH
C
VH
Liên kết 2
Liên kết 1
Liên kết 2
Chuỗi polypeptit 2
COOH
C
VH
Cuộn E
(hoặc cuộn K)
VL
NH2
Diabody lắp ghép
NH2
VL
VH
COOH
C
COOH
C
VH
VL
NH2

Fig. 1

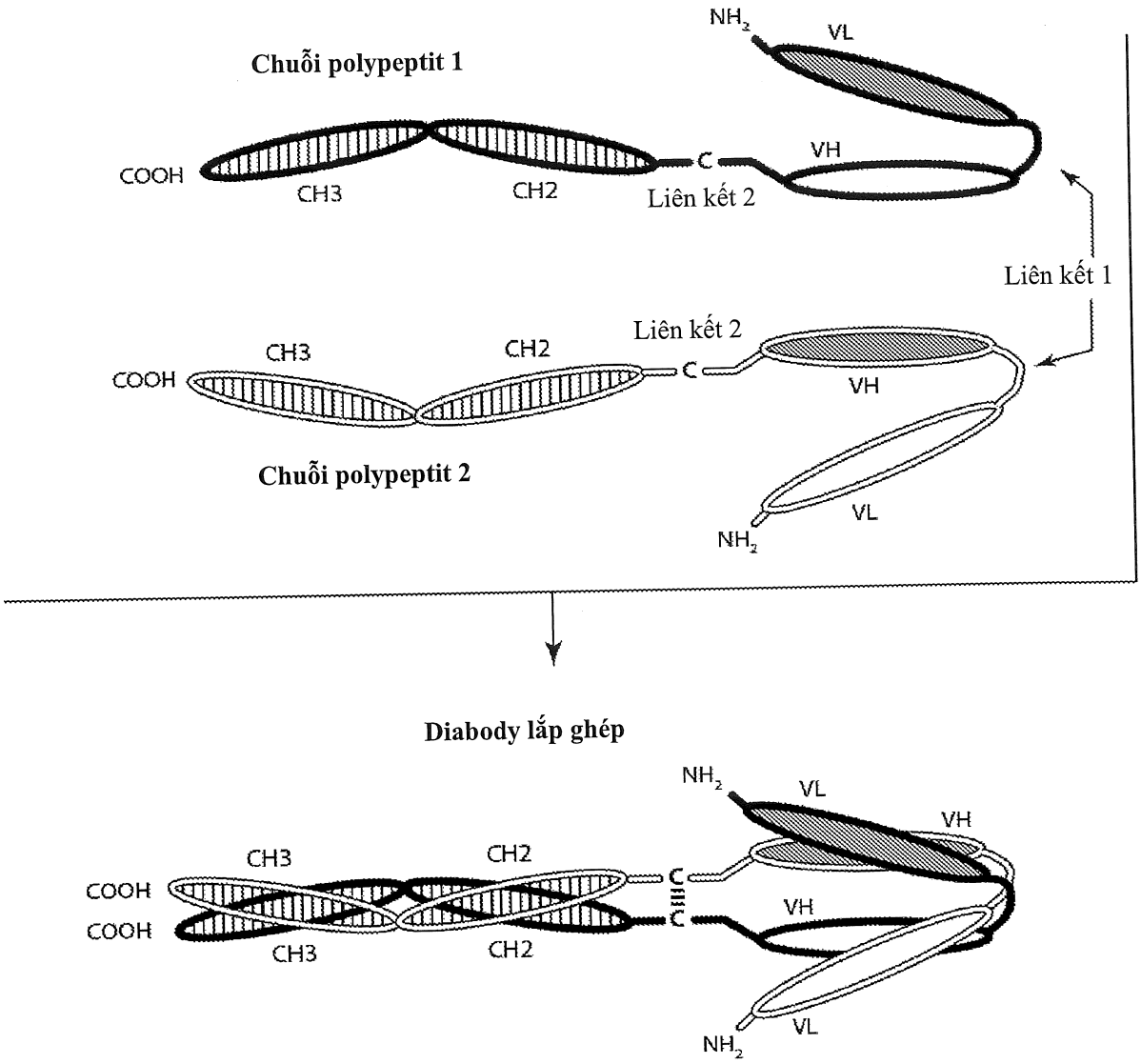

Chuỗi polypeptit 1
NH2
VL
COOH
CH3
CH2
C
Liên kết 2
VH
Liên kết 1
Liên kết 2
CH3
CH2
COOH
C
VH
Chuỗi polypeptit 2
VL
NH2
Diabody lắp ghép
NH2
VL
VH
CH3
CH2
COOH
COOH
C
C
VH
CH3
CH2
VL
NH2

Fig. 2

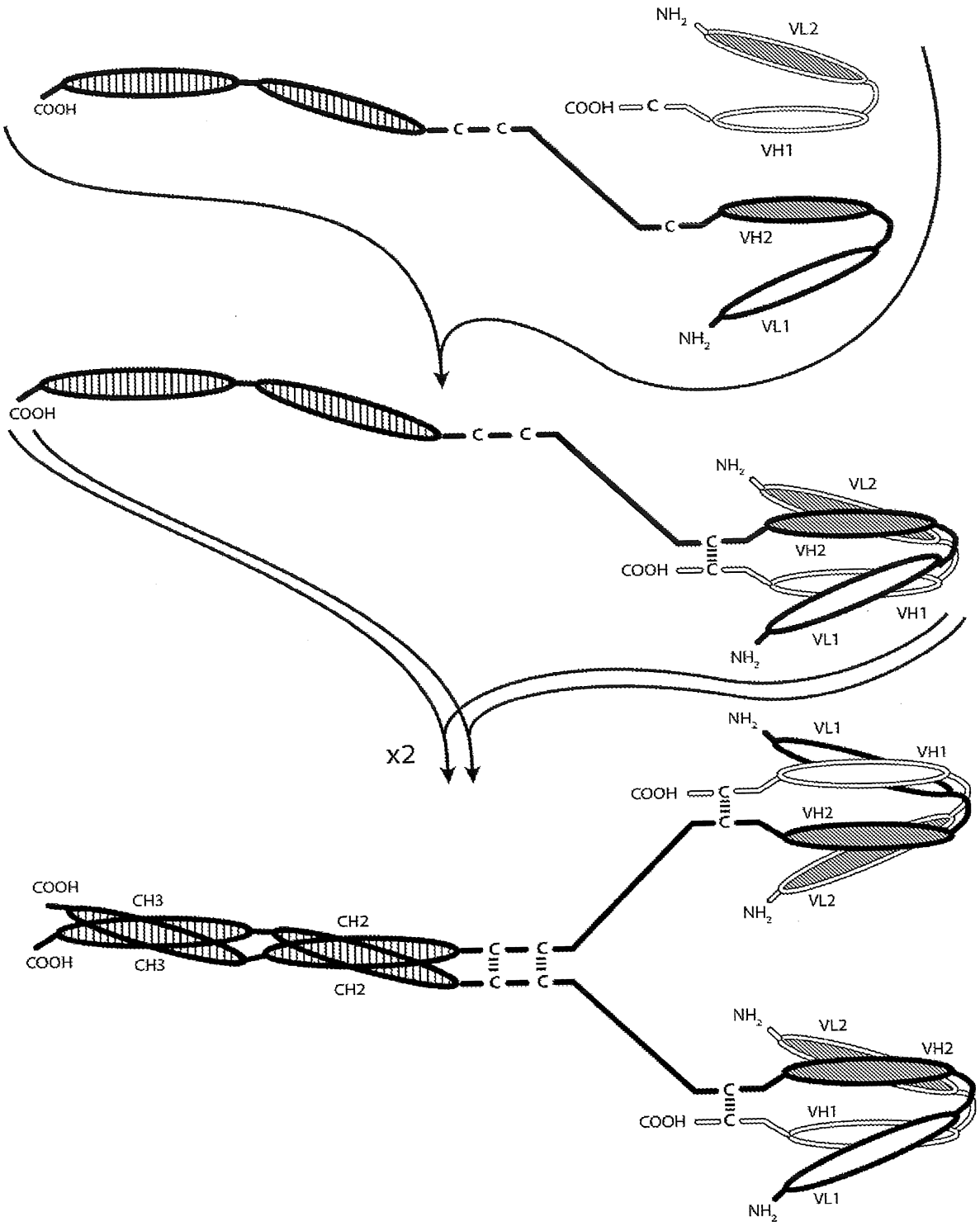


Fig. 3A

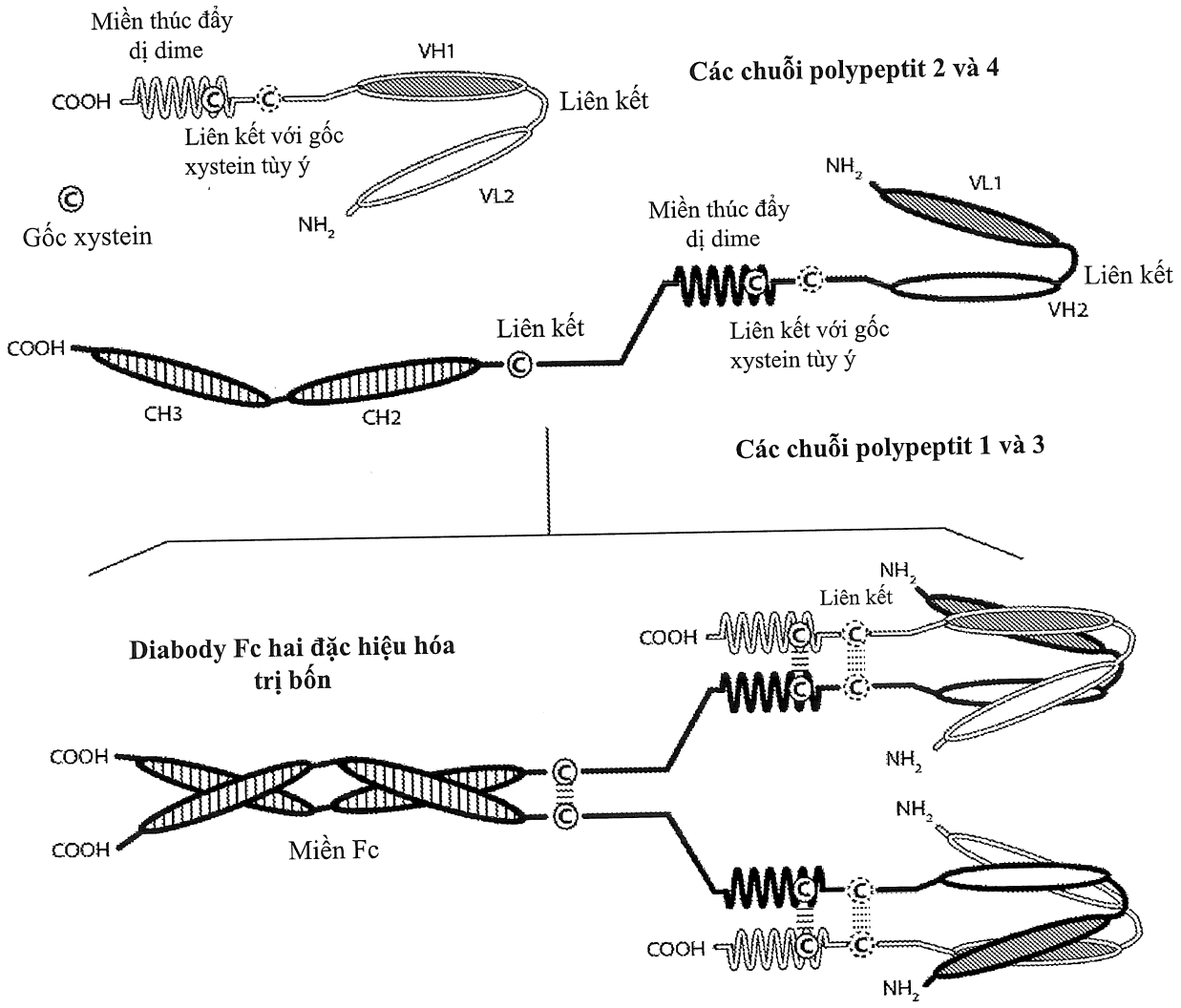

Miền thúc đẩy
dị dime
VH1
COOH
Liên kết
Liên kết với gốc
xystein tùy ý
VL2
NH2
Gốc xystein
Các chuỗi polypeptit 2 và 4
NH2
VL1
Miền thúc đẩy
dị dime
Liên kết
VH2
Liên kết với gốc
xystein tùy ý
Liên kết
COOH
CH3
CH2
Các chuỗi polypeptit 1 và 3
NH2
Liên kết
COOH
Diabody Fc hai đặc hiệu hóa
trị bốn
COOH
COOH
Miền Fc
NH2
NH2
COOH
NH2

Fig. 3B

5/39

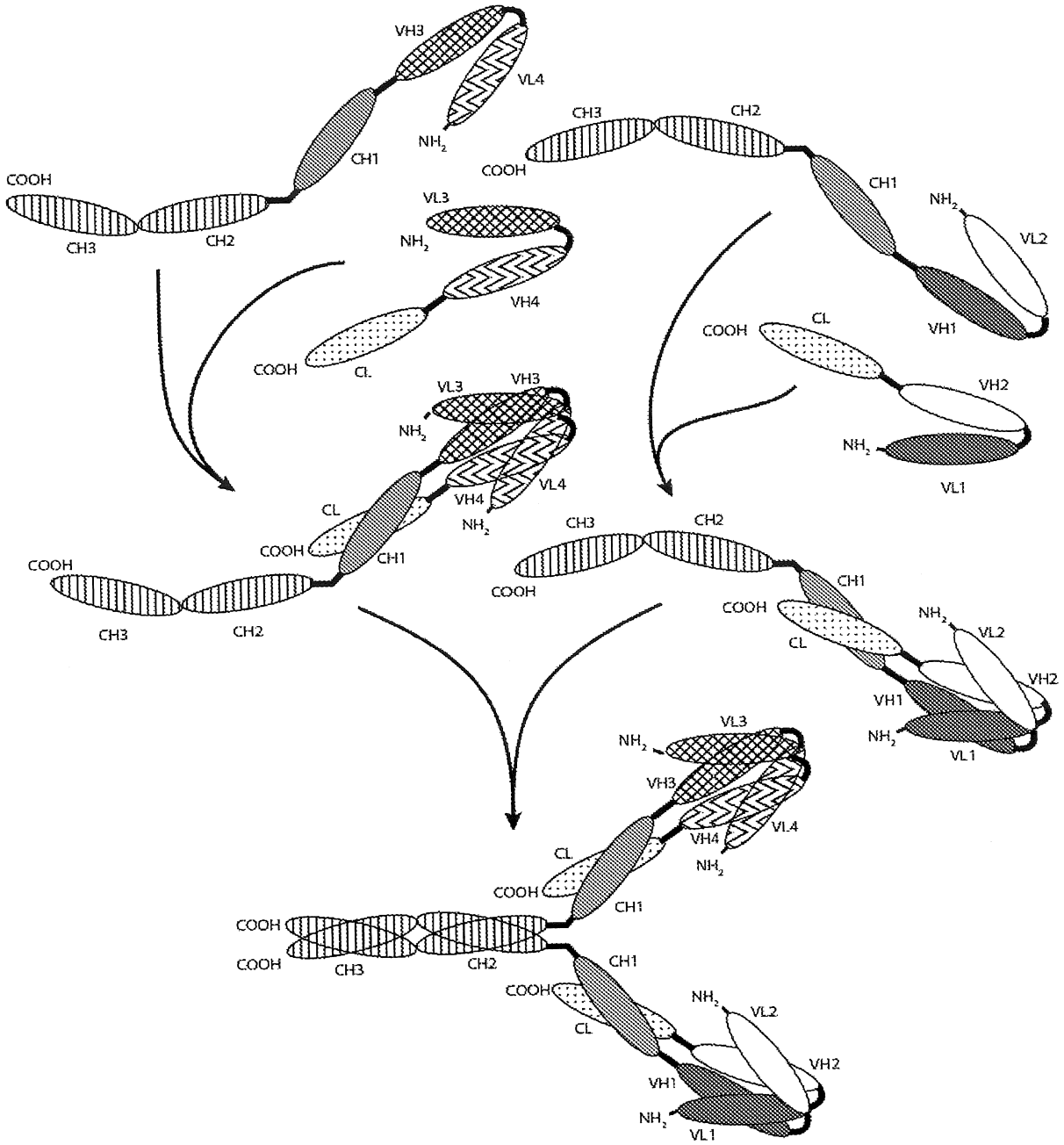


Fig. 3C

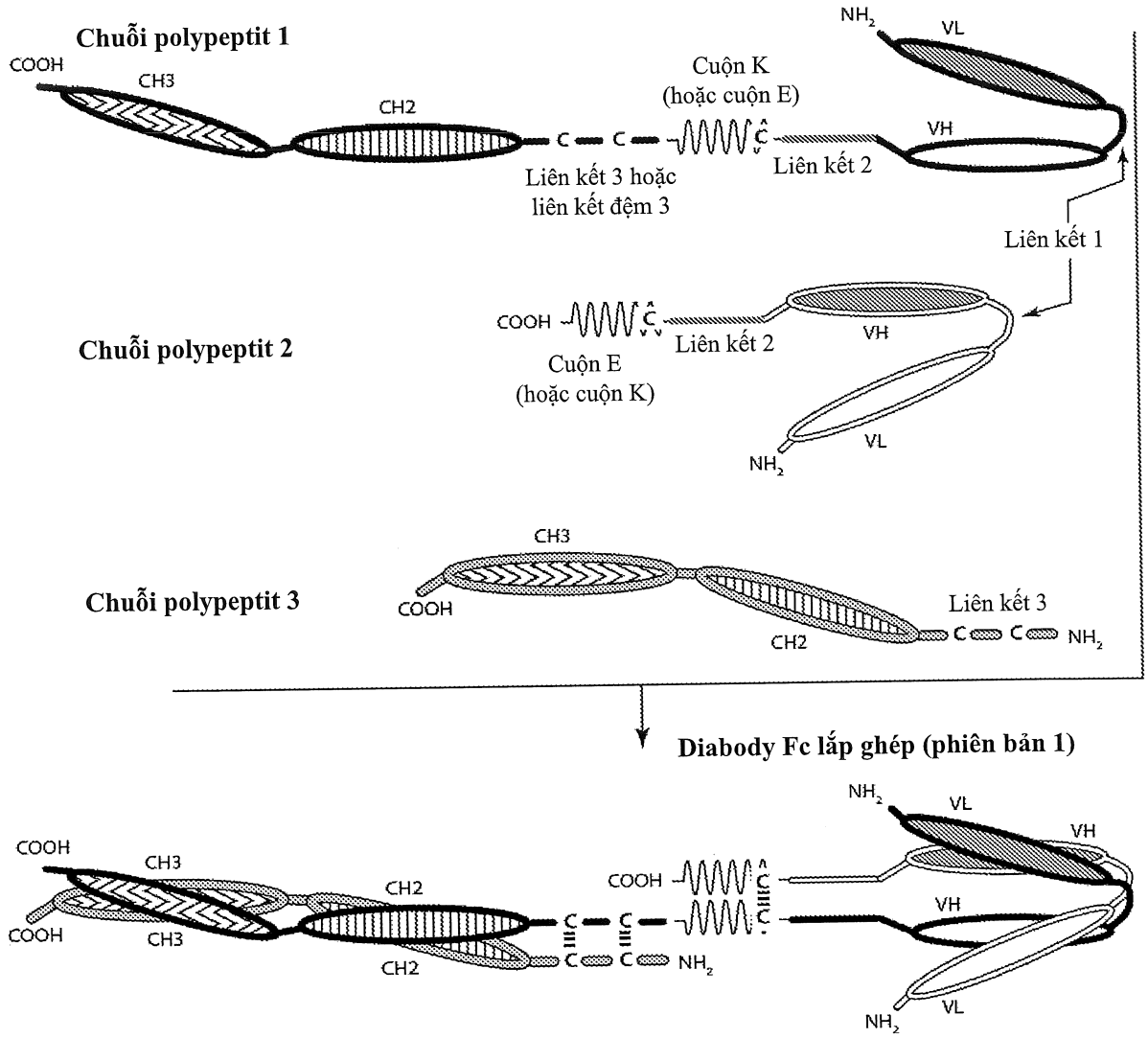

Chuỗi polypeptit 1
COOH
CH3
CH2
Cuộn K
(hoặc cuộn E)
NH2
VL
VH
Liên kết 3 hoặc
liên kết đệm 3
Liên kết 2
Liên kết 1
Chuỗi polypeptit 2
COOH
Cuộn E
(hoặc cuộn K)
Liên kết 2
VH
VL
NH2
Chuỗi polypeptit 3
CH3
COOH
CH2
Liên kết 3
NH2
Diabody Fc lắp ghép (phiên bản 1)
COOH
CH3
CH2
COOH
CH3
CH2
COOH
NH2
NH2
VL
VH
VH
VL
NH2

Fig. 4A

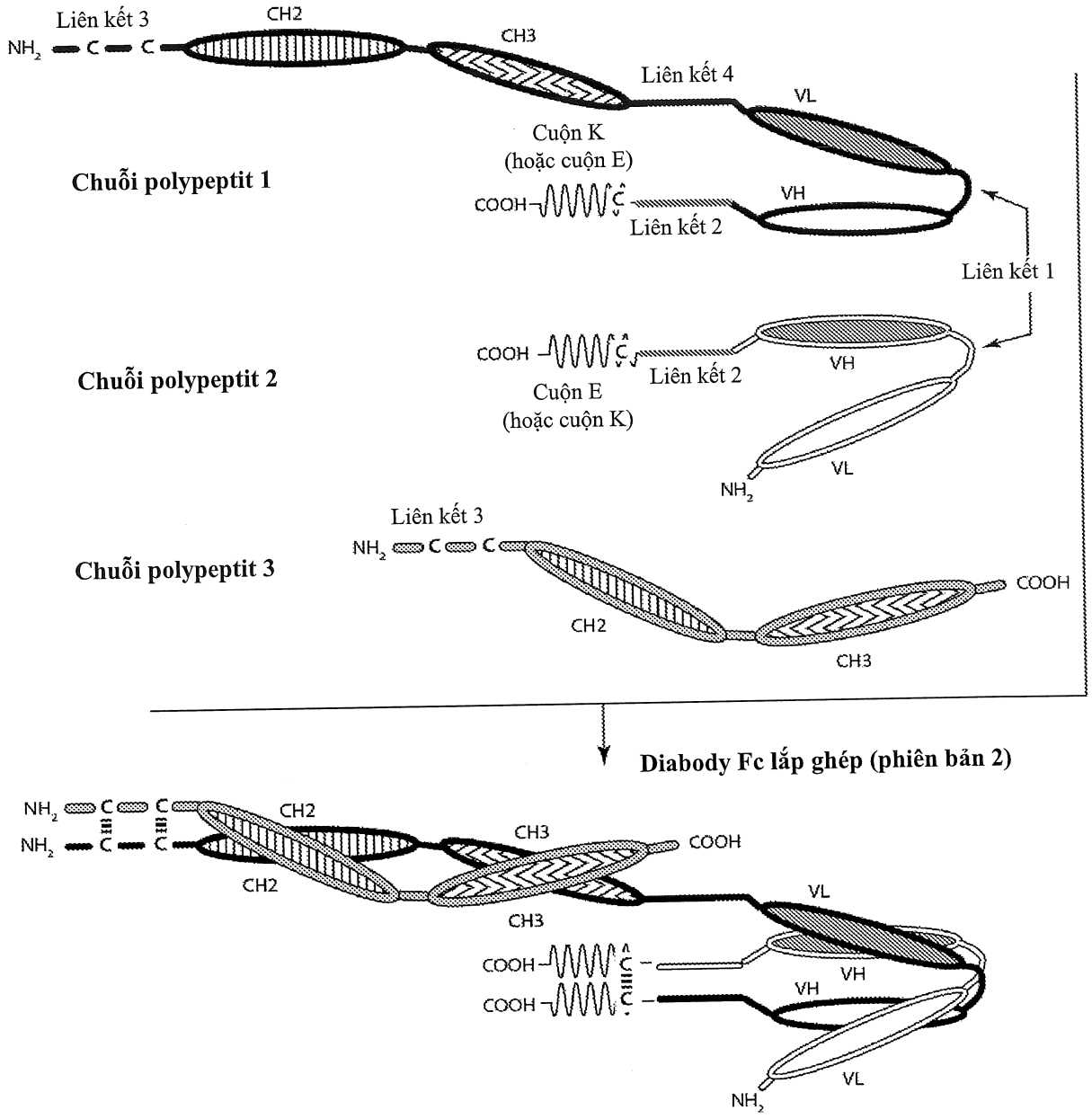

Liên kết 3
CH2
CH3
Liên kết 4
VL
Cuộn K
(hoặc cuộn E)
Chuỗi polypeptit 1
COOH
VH
Liên kết 2
Liên kết 1
COOH
Liên kết 2
VH
Chuỗi polypeptit 2
Cuộn E
(hoặc cuộn K)
VL
Liên kết 3
Chuỗi polypeptit 3
COOH
CH2
CH3
Diabody Fc lắp ghép (phiên bản 2)
CH2
CH3
COOH
CH2
VL
CH3
COOH
VH
VH
COOH
VL

Fig. 4B

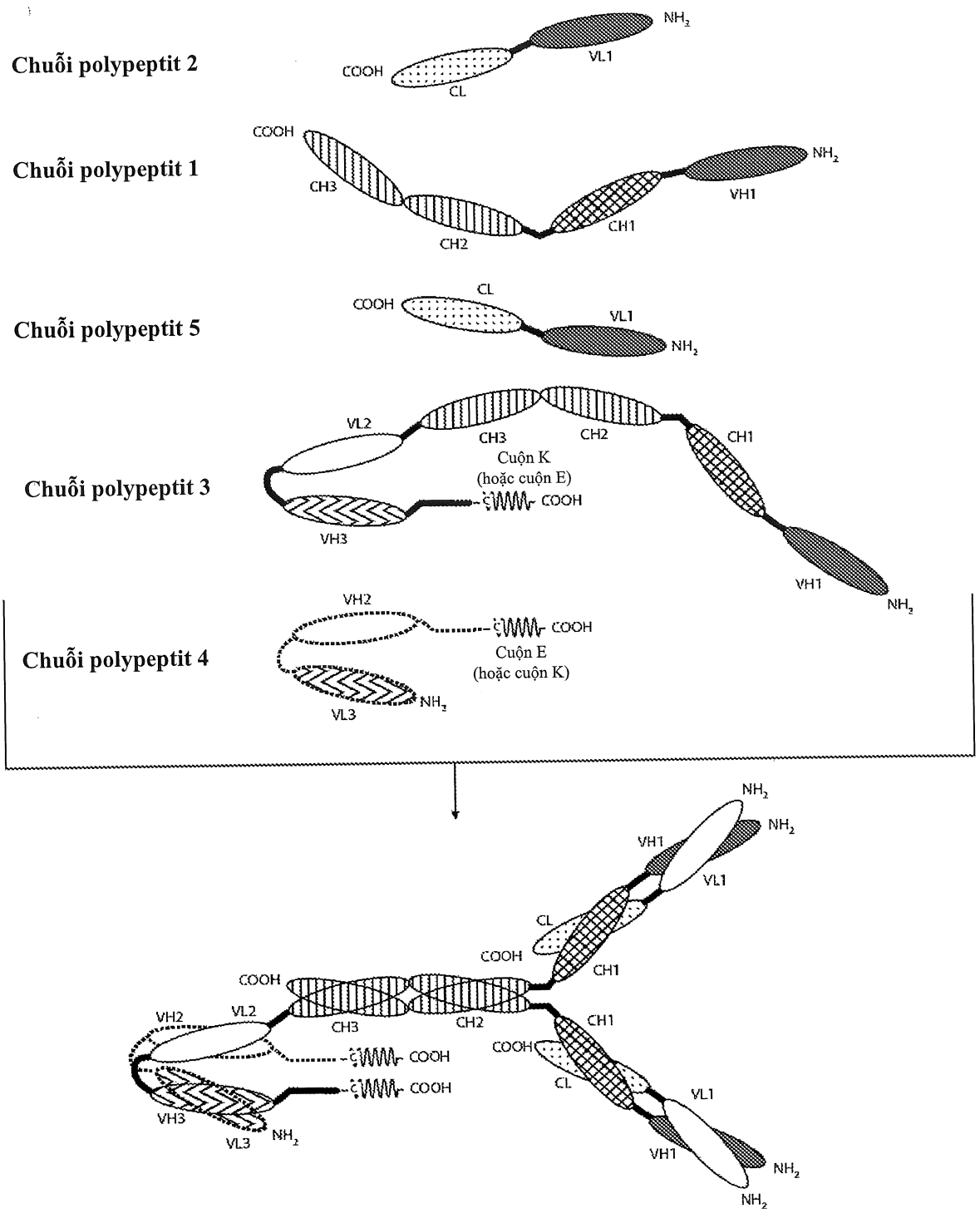

Chuỗi polypeptit 2
COOH
CL
VL1
NH2
Chuỗi polypeptit 1
COOH
CH3
CH2
CH1
VH1
NH2
Chuỗi polypeptit 5
COOH
CL
VL1
NH2
Chuỗi polypeptit 3
VL2
CH3
CH2
CH1
Cuộn K
(hoặc cuộn E)
COOH
VH3
VH1
NH2
Chuỗi polypeptit 4
VH2
COOH
Cuộn E
(hoặc cuộn K)
VL3
NH2
NH2
NH2
VH1
VL1
CL
COOH
CH1
COOH
VH2
VL2
CH3
CH2
CH1
COOH
COOH
COOH
CL
VL1
VH3
VL3
NH2
VH1
NH2
NH2

Fig. 5

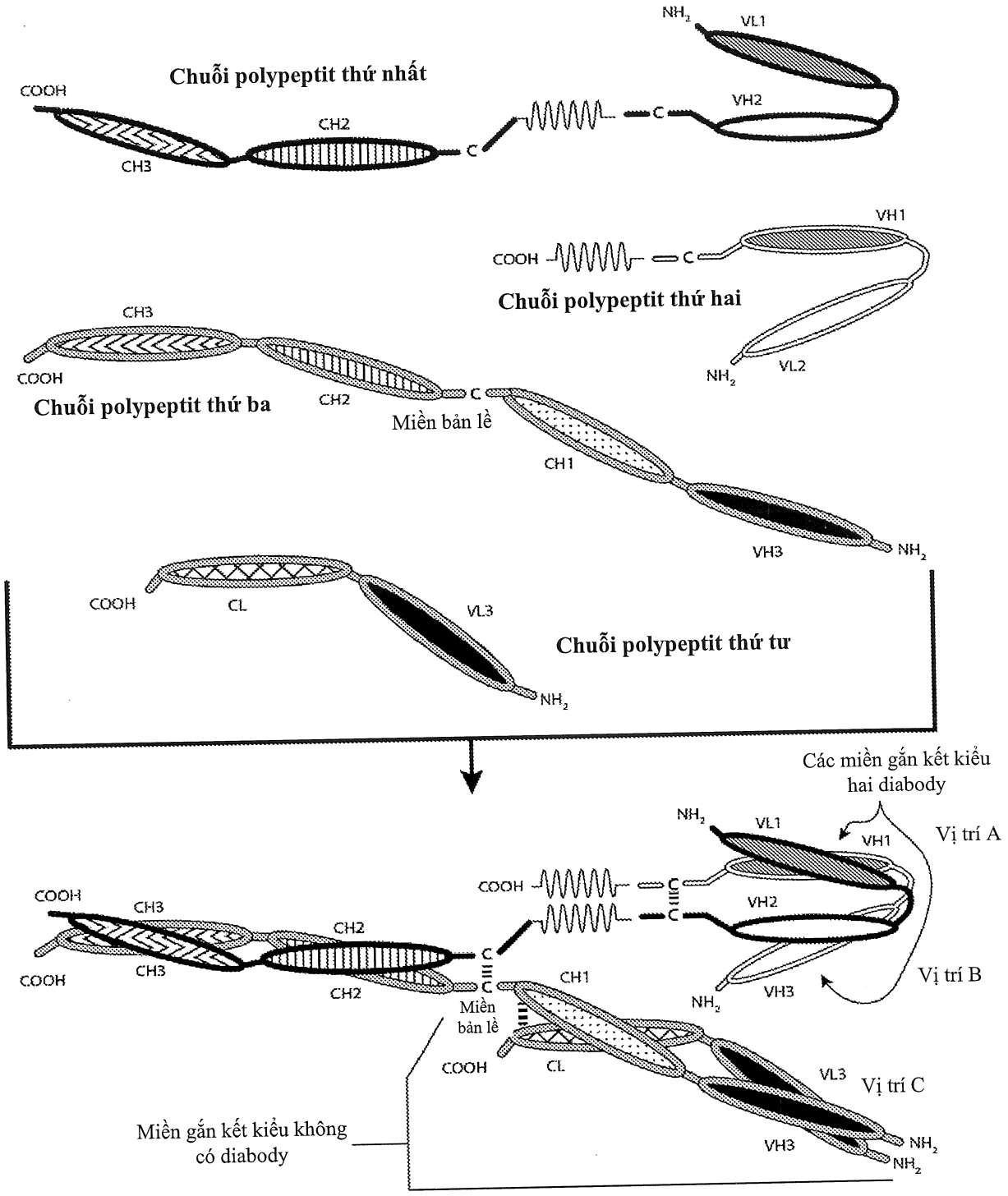

Chuỗi polypeptit thứ nhất
COOH
CH3
CH2
C
C
NH2
VL1
VH2
COOH
C
VH1
Chuỗi polypeptit thứ hai
NH2
VL2
CH3
COOH
Chuỗi polypeptit thứ ba
CH2
C
Miền bản lề
CH1
VH3
NH2
COOH
CL
VL3
Chuỗi polypeptit thứ tư
NH2
Các miền gắn kết kiểu hai diabody
NH2
VL1
VH1
Vị trí A
COOH
C
C
VH2
COOH
CH3
CH2
C
C
COOH
CH3
CH2
CH1
Miền bản lề
NH2
VH3
Vị trí B
COOH
CL
VL3
Vị trí C
Miền gắn kết kiểu không có diabody
VH3
NH2
NH2

Fig. 6A

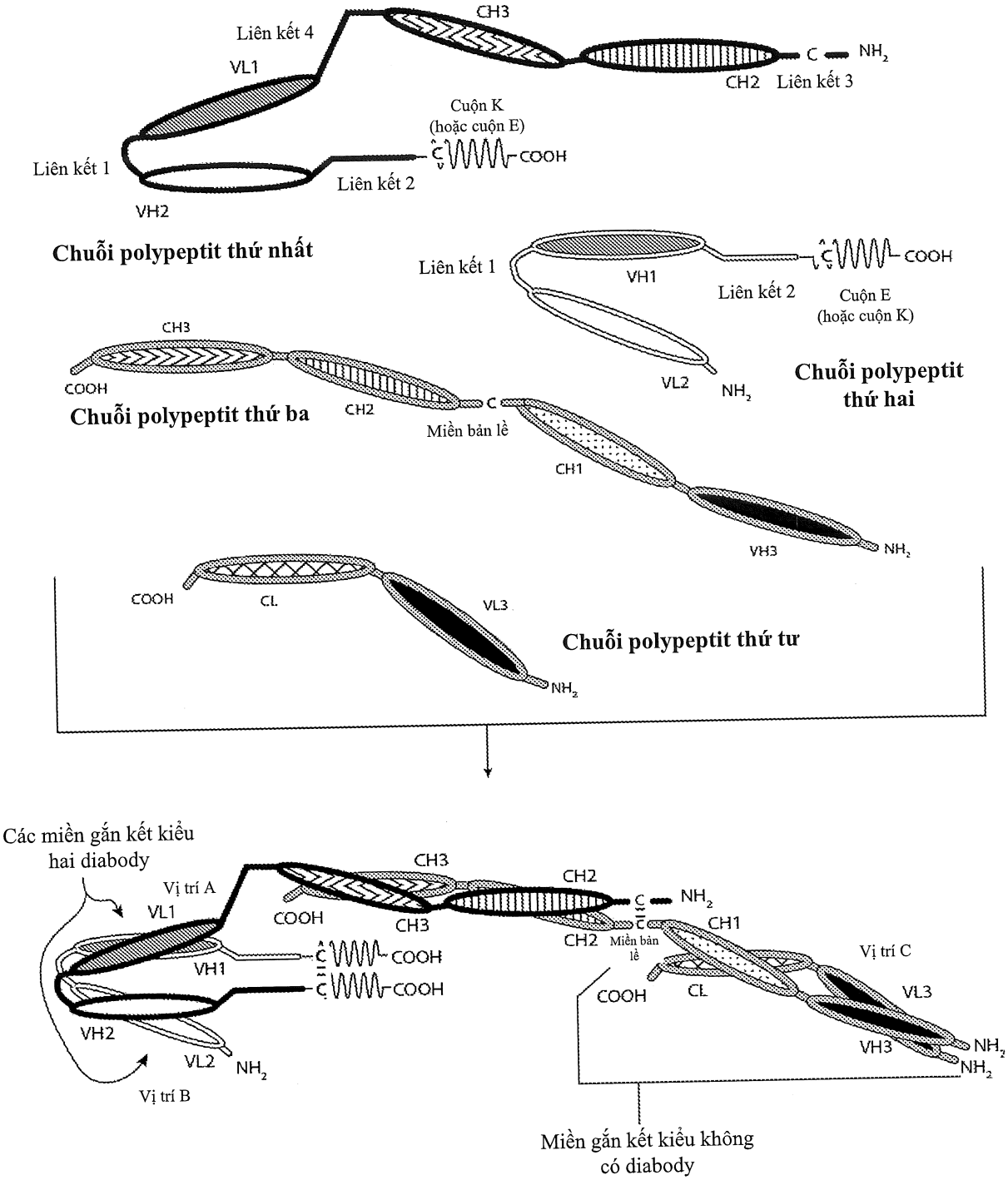

CH3
Liên kết 4
VL1
C
NH2
CH2
Liên kết 3
Cuộn K
(hoặc cuộn E)
COOH
Liên kết 1
Liên kết 2
VH2
Chuỗi polypeptit thứ nhất
Liên kết 1
VH1
COOH
Liên kết 2
Cuộn E
(hoặc cuộn K)
CH3
COOH
VL2
NH2
Chuỗi polypeptit thứ hai
Chuỗi polypeptit thứ ba
CH2
C
Miền bản lề
CH1
VH3
NH2
COOH
CL
VL3
Chuỗi polypeptit thứ tư
NH2
Các miền gắn kết kiểu
hai diabody
Vị trí A
VL1
CH3
CH2
COOH
CH3
C
NH2
CH1
CH2
Miền bản
lề
VH1
COOH
COOH
Vị trí C
COOH
CL
VL3
VH2
VH3
NH2
VL2
NH2
NH2
Vị trí B
Miền gắn kết kiểu không
có diabody

Fig. 6B

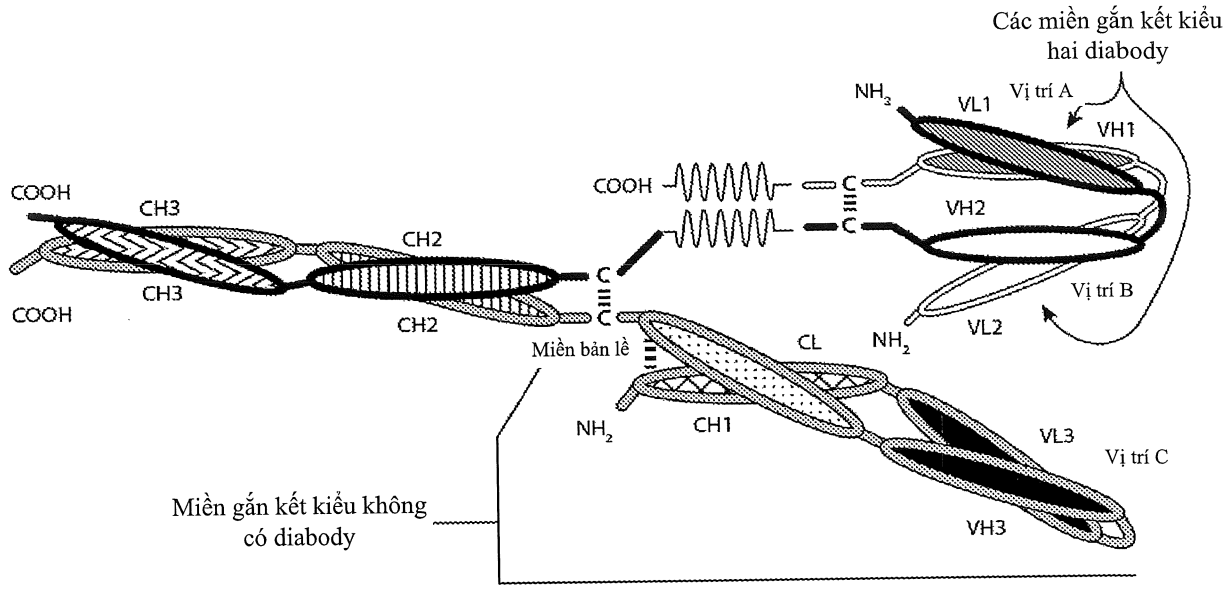

Các miền gắn kết kiểu
hai diabody
Vị trí A
NH3
VL1
VH1
COOH
CH3
CH2
COOH
VH2
Vị trí B
VL2
NH2
CL
Miền bản lề
CH1
VL3
Vị trí C
VH3
Miền gắn kết kiểu không
có diabody

Fig. 6C

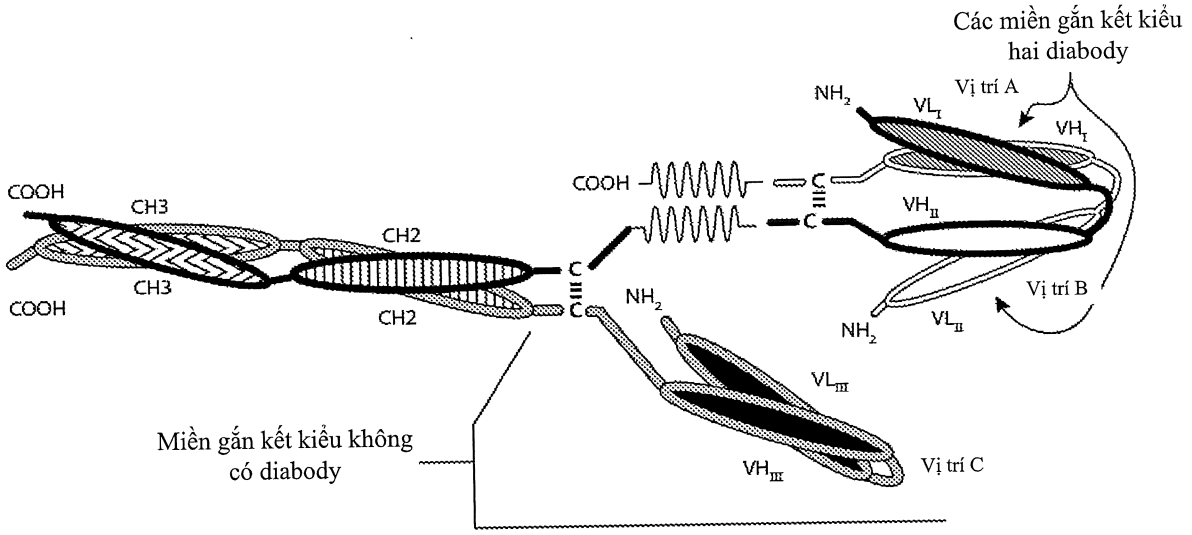

Các miền gắn kết kiểu
hai diabody
Vị trí A
NH2
VLI
VHI
COOH
CH3
CH2
VHII
Vị trí B
VLII
VLIII
VHIII
Vị trí C
Miền gắn kết kiểu không
có diabody

Fig. 6D

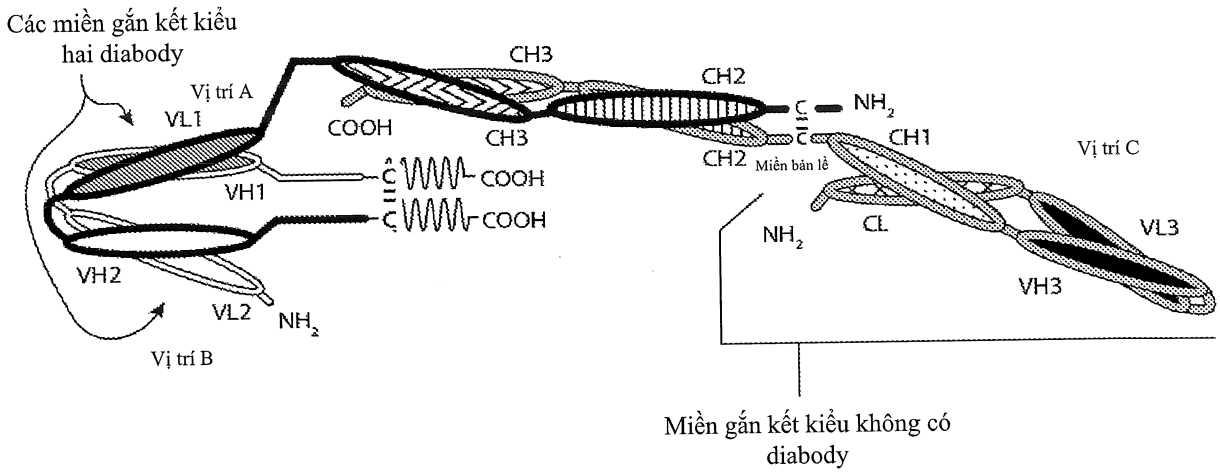

Các miền gắn kết kiểu
hai diabody
Vị trí A
VL1
VH1
VH2
VL2
NH2
Vị trí B
COOH
COOH
COOH
CH3
CH3
CH2
CH2
Miền bản lề
NH2
CH1
CL
NH2
Vị trí C
VL3
VH3
Miền gắn kết kiểu không có
diabody

Fig. 6E

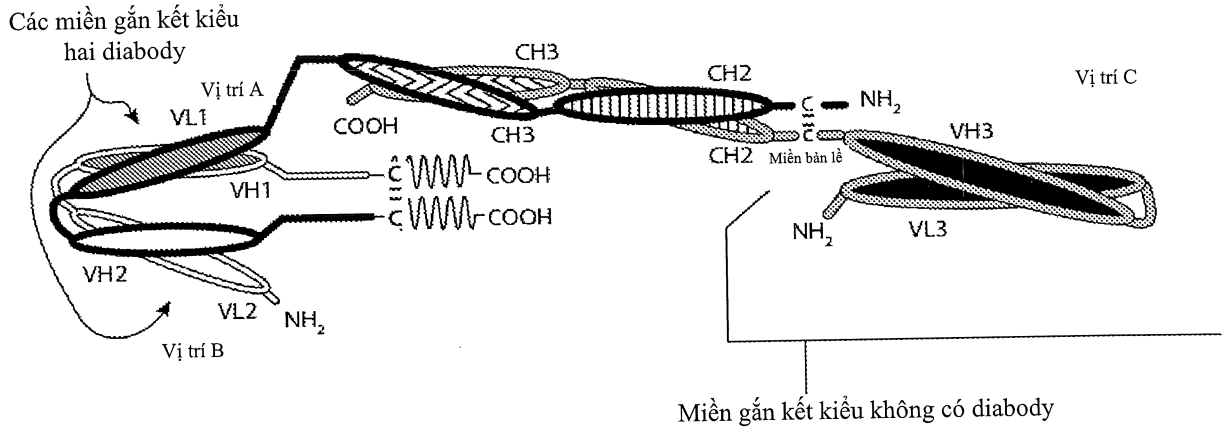

Các miền gắn kết kiểu
hai diabody
Vị trí A
VL1
VH1
VH2
VL2
NH2
Vị trí B
COOH
COOH
COOH
CH3
CH3
CH2
CH2
Miền bản lề
NH2
VH3
NH2
VL3
Vị trí C
Miền gắn kết kiểu không có diabody

Fig. 6F

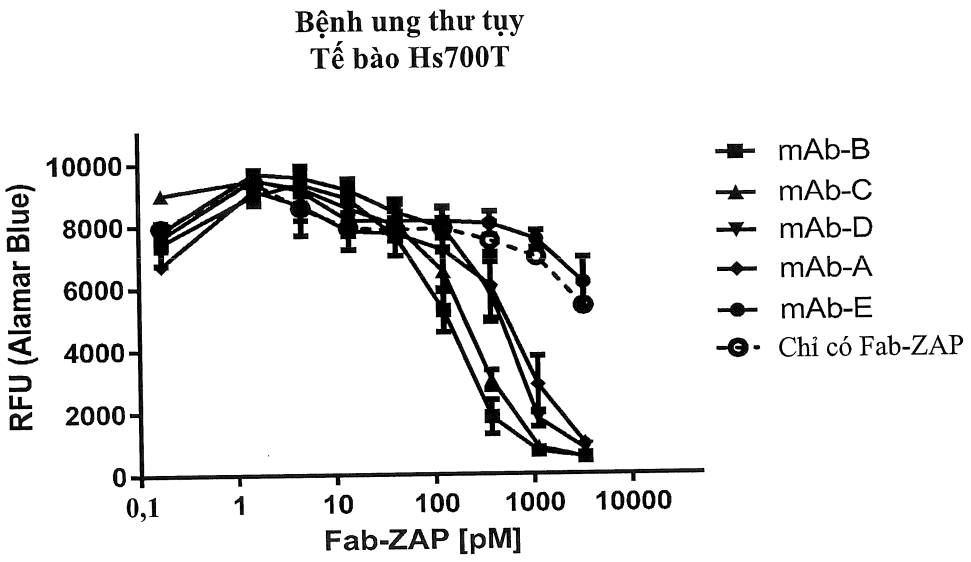

Bệnh ung thư tụy
Tế bào Hs700T
RFU (Alamar Blue)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0,1
1
10
100
1000
10000
Fab-ZAP [pM]
mAb-B
mAb-C
mAb-D
mAb-A
mAb-E
Chỉ có Fab-ZAP

Fig. 7

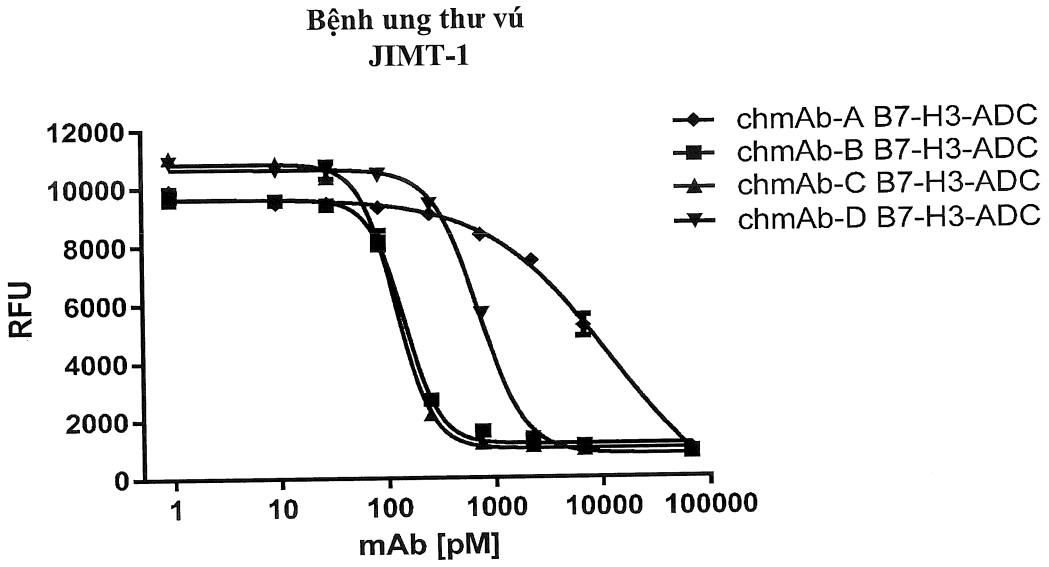

Bệnh ung thư vú
JIMT-1
chmAb-A B7-H3-ADC
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC
RFU
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
1
10
100
1000
10000
100000
mAb [pM]

Fig. 8A

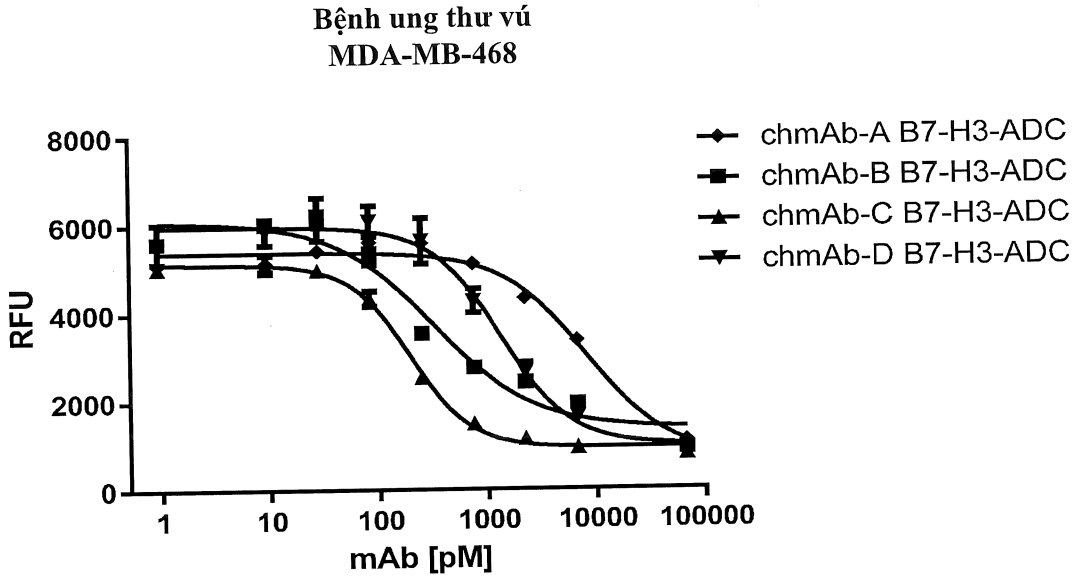

Bệnh ung thư vú
MDA-MB-468
chmAb-A B7-H3-ADC
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC
RFU
8000
6000
4000
2000
0
1
10
100
1000
10000
100000
mAb [pM]

Fig. 8B

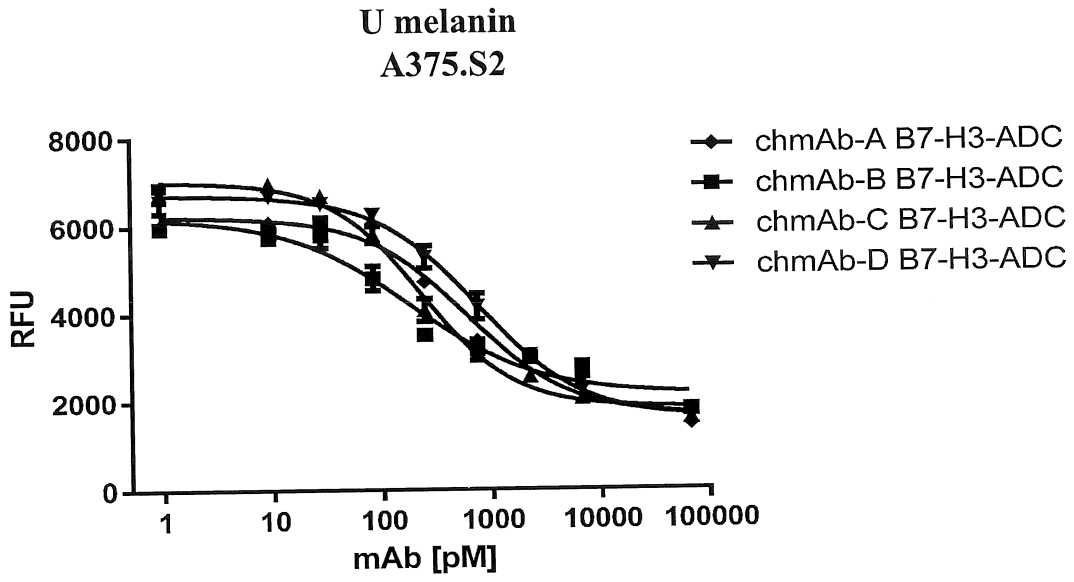

U melanin
A375.S2
8000
6000
4000
2000
0
RFU
1
10
100
1000
10000
100000
mAb [pM]
chmAb-A B7-H3-ADC
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 8C

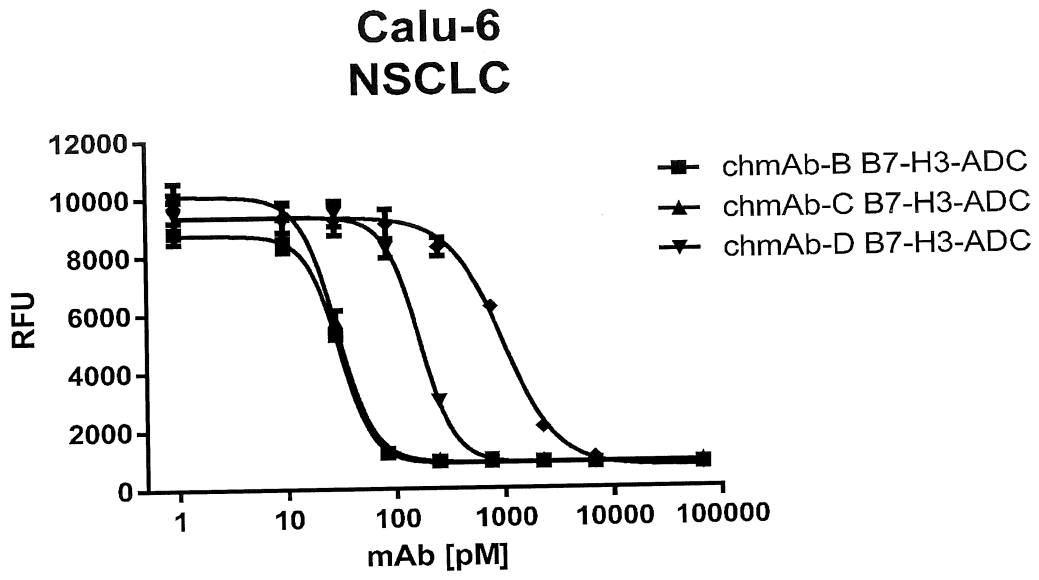

Calu-6
NSCLC
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
RFU
1
10
100
1000
10000
100000
mAb [pM]
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 8D

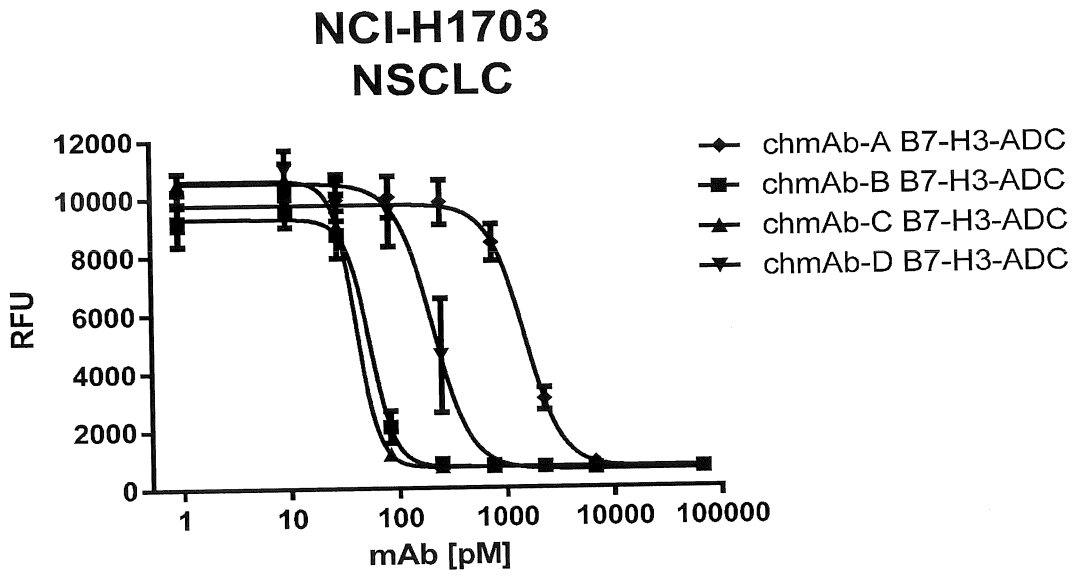

NCI-H1703
NSCLC
RFU
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
1
10
100
1000
10000
100000
mAb [pM]
chmAb-A B7-H3-ADC
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 8E

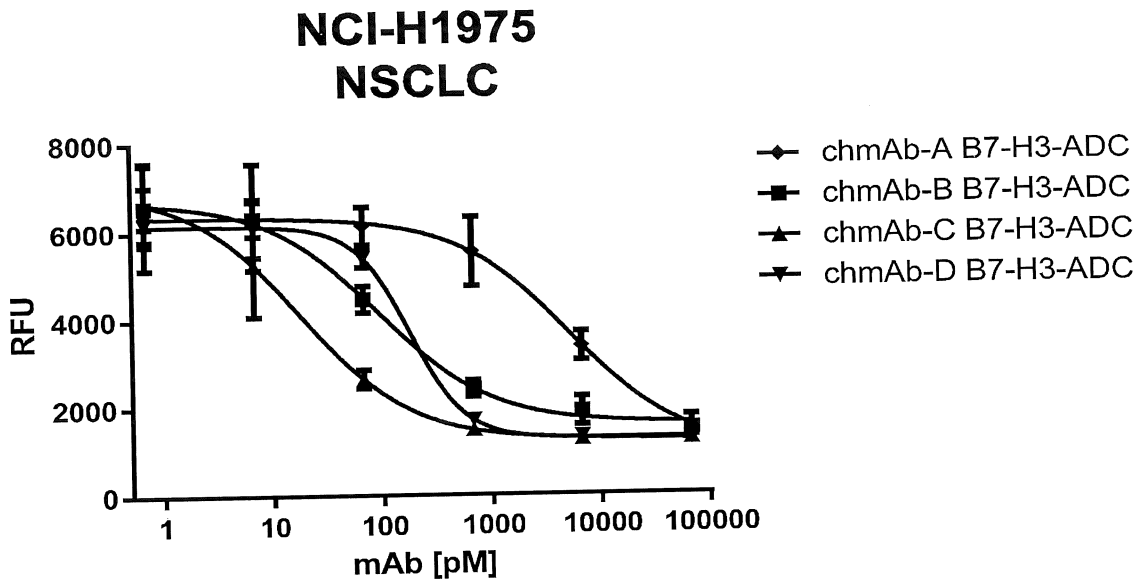

NCI-H1975
NSCLC
RFU
8000
6000
4000
2000
0
1
10
100
1000
10000
100000
mAb [pM]
chmAb-A B7-H3-ADC
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 8F

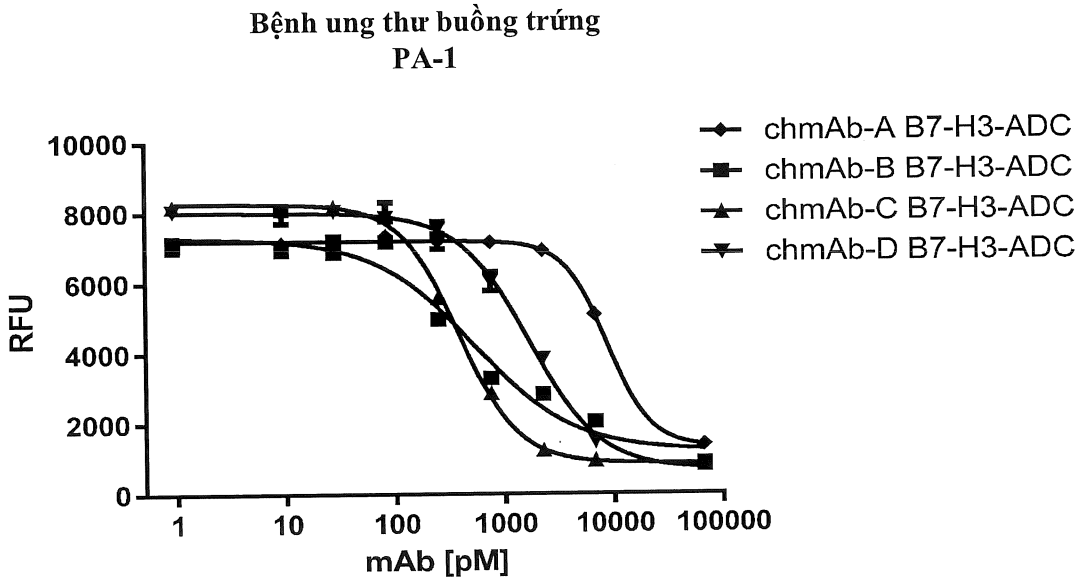

Bệnh ung thư buồng trứng
PA-1
chmAb-A B7-H3-ADC
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC
RFU
10000
8000
6000
4000
2000
0
1
10
100
1000
10000
100000
mAb [pM]

Fig. 8G

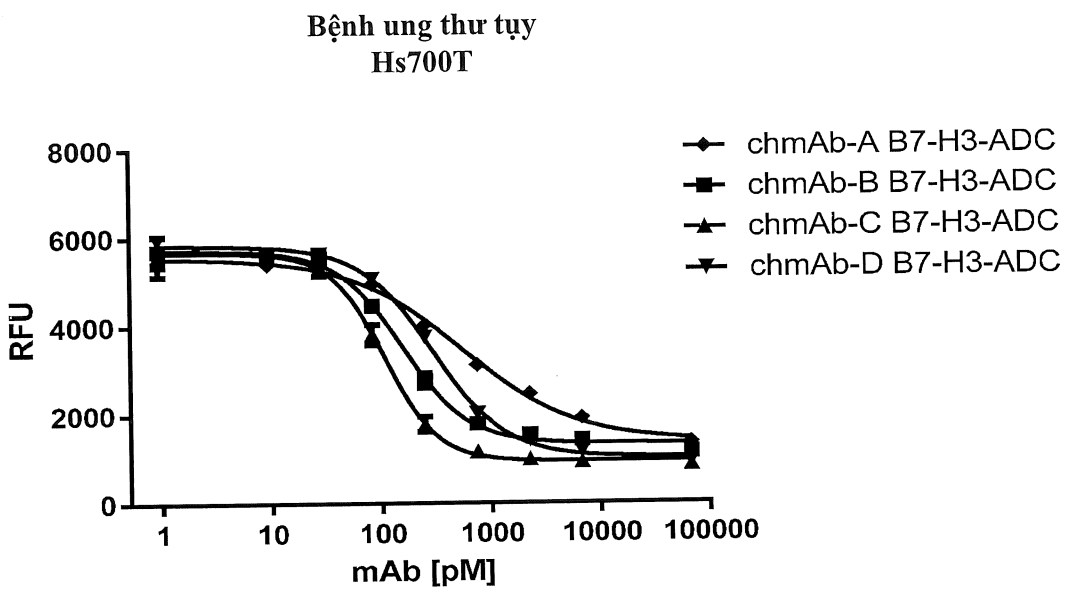

Bệnh ung thư tụy
Hs700T
chmAb-A B7-H3-ADC
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC
RFU
8000
6000
4000
2000
0
1
10
100
1000
10000
100000
mAb [pM]

Fig. 8H

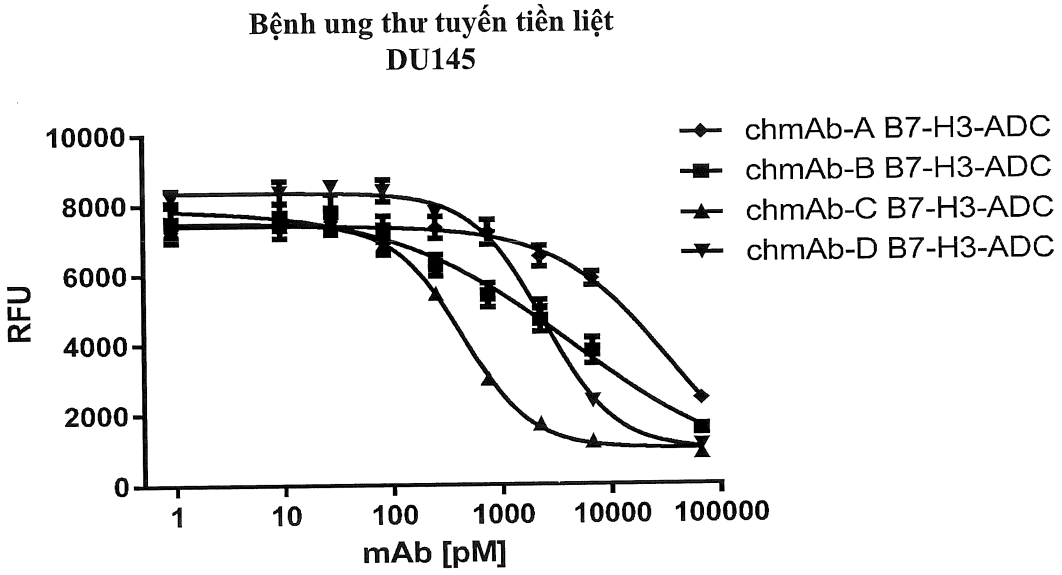

Bệnh ung thư tuyến tiền liệt
DU145
10000
8000
6000
4000
2000
0
RFU
1
10
100
1000
10000
100000
mAb [pM]
chmAb-A B7-H3-ADC
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 8I

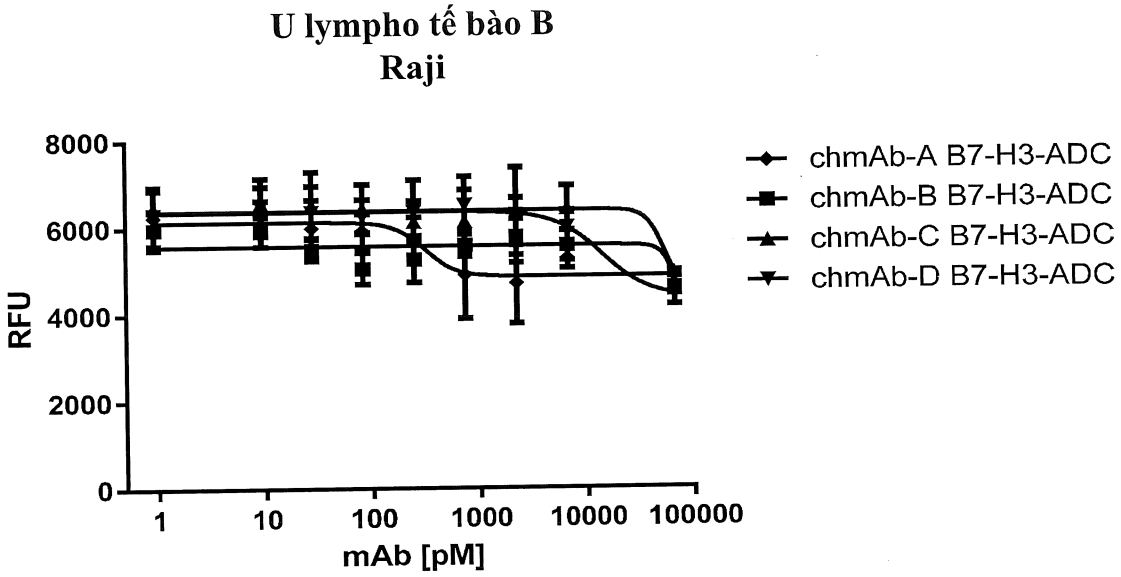

U lympho tế bào B
Raji
8000
6000
4000
2000
0
RFU
1
10
100
1000
10000
100000
mAb [pM]
chmAb-A B7-H3-ADC
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 8J

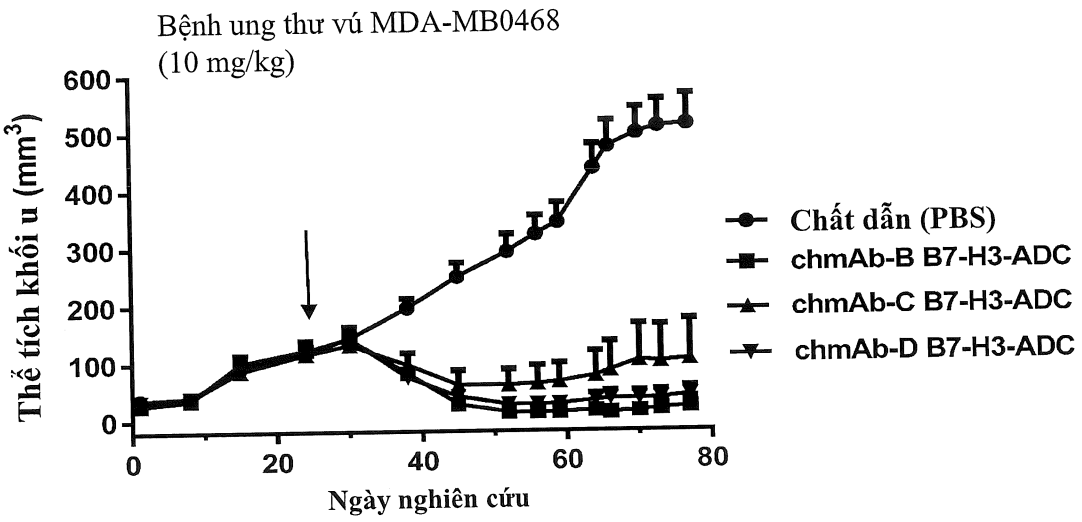

Bệnh ung thư vú MDA-MB0468
(10 mg/kg)
Thể tích khối u (mm3)
600
500
400
300
200
100
0
0
20
40
60
80
Ngày nghiên cứu
Chất dẫn (PBS)
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 9

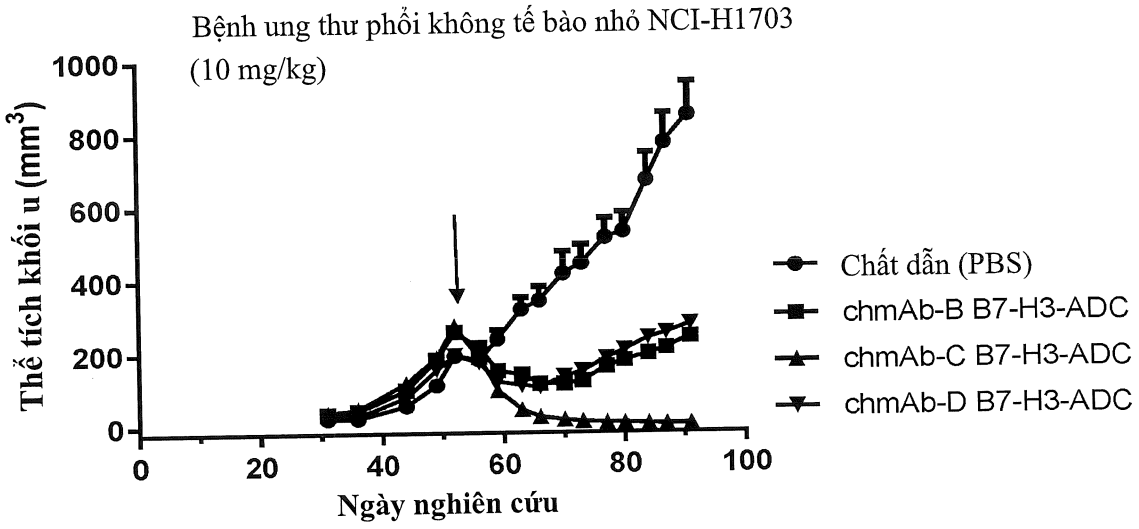


Fig. 10A

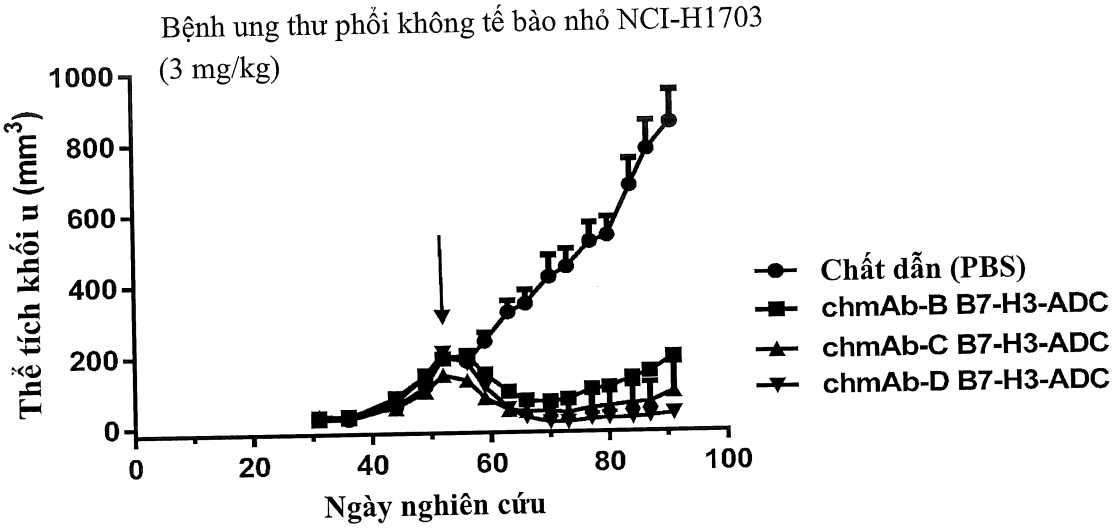


Fig. 10B

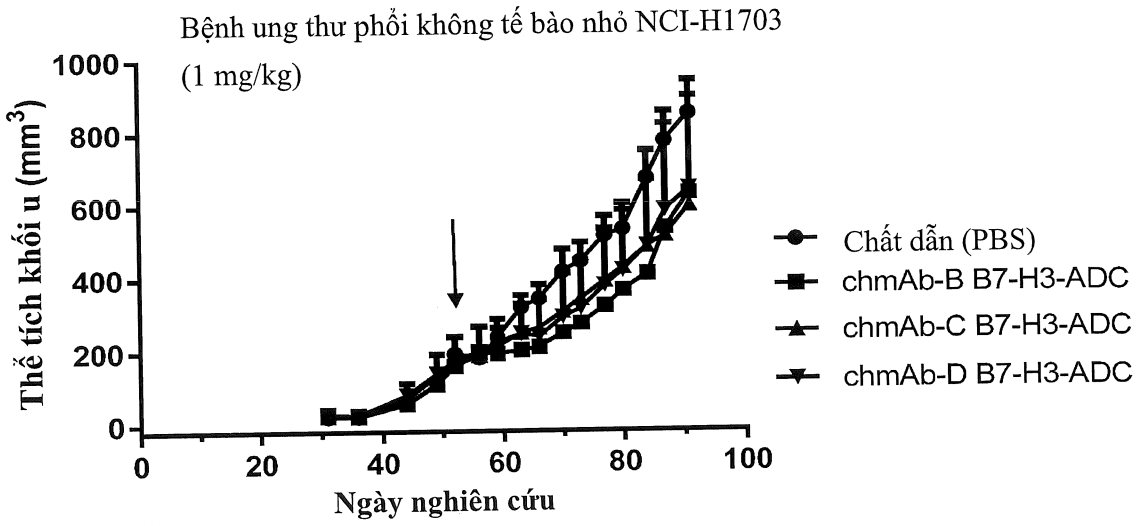

Bệnh ung thư phổi không tế bào nhỏ NCI-H1703
(1 mg/kg)
Thể tích khối u (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
Ngày nghiên cứu
Chất dẫn (PBS)
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 10C

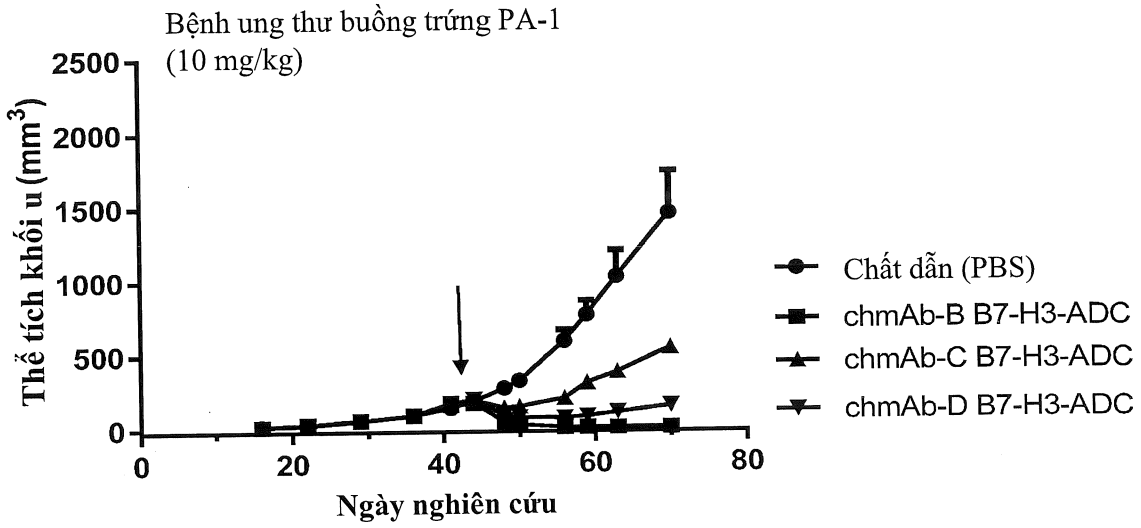


Fig. 11A

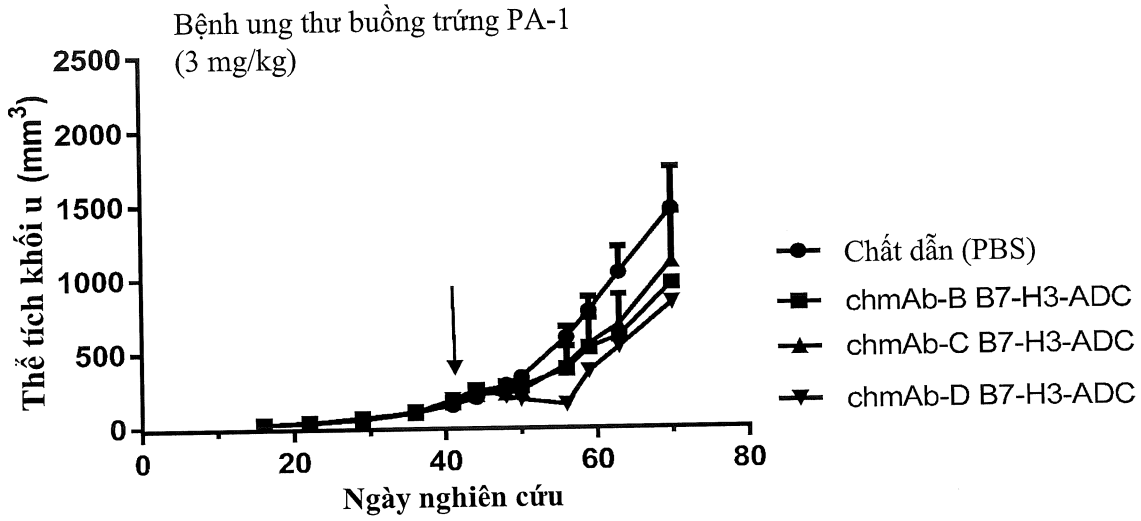


Fig. 11B

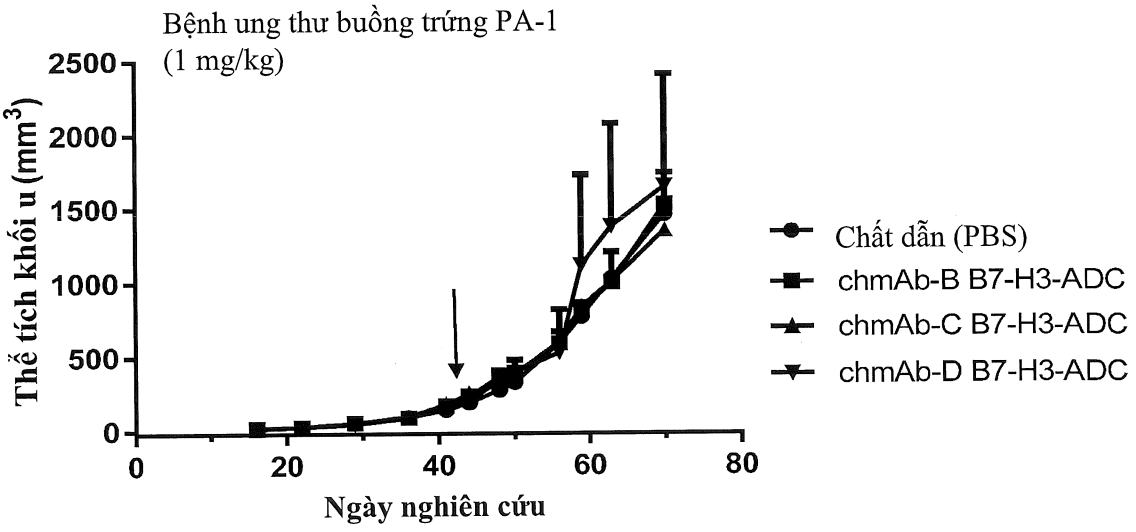

Bệnh ung thư buồng trứng PA-1
(1 mg/kg)
Thể tích khối u (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
Ngày nghiên cứu
Chất dẫn (PBS)
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 11C

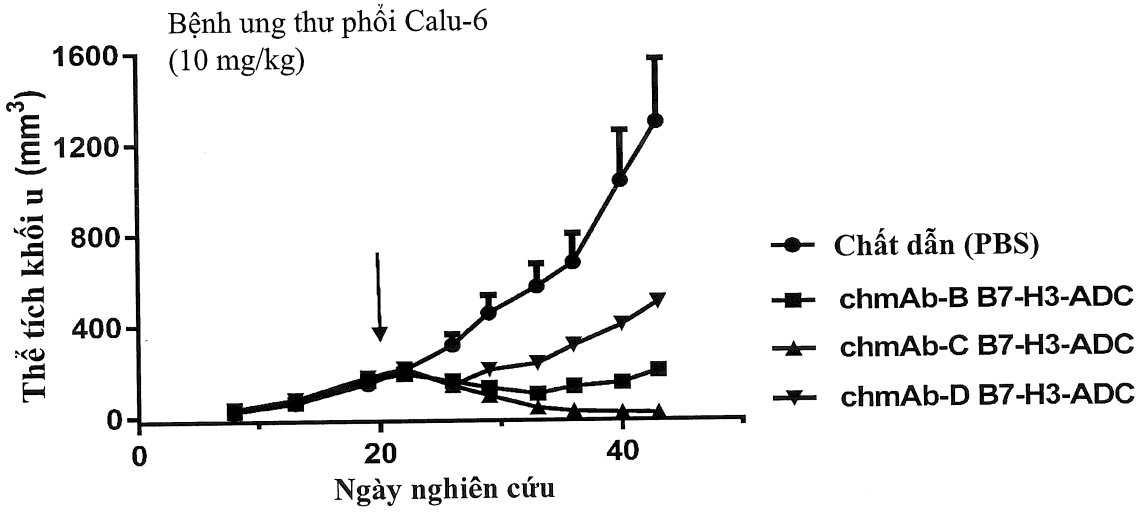


Fig. 12A

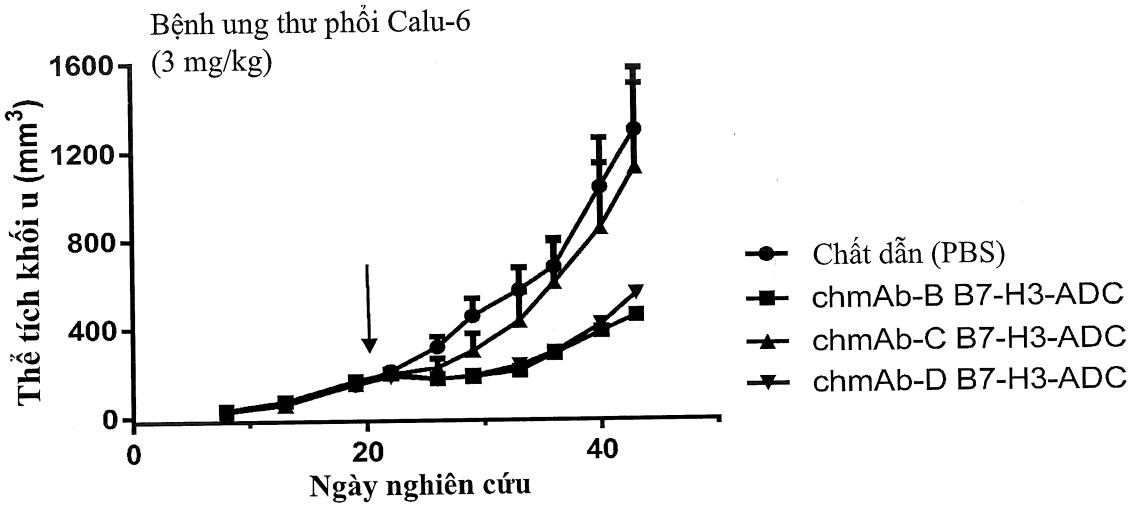


Fig. 12B

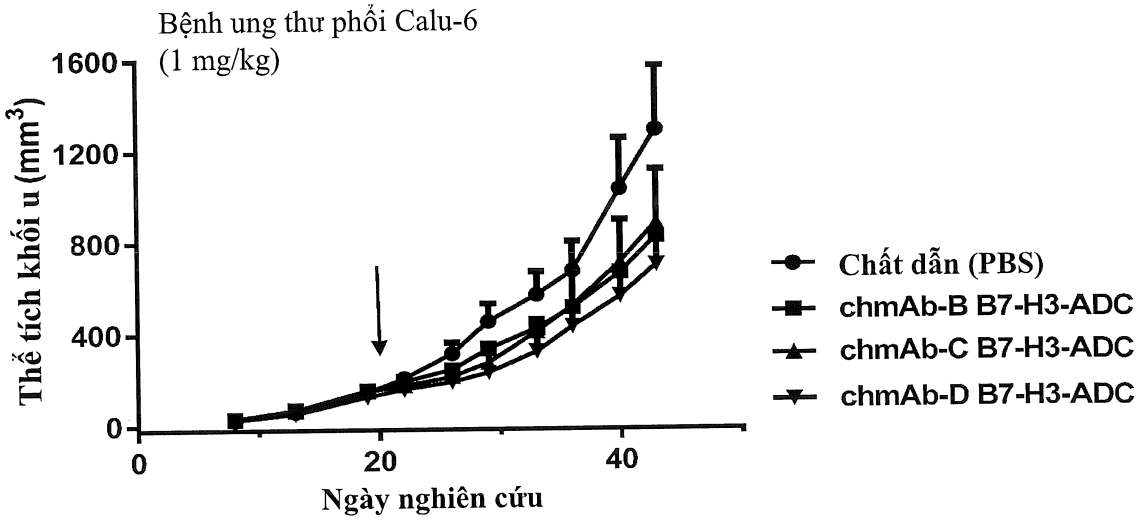

Bệnh ung thư phổi Calu-6
(1 mg/kg)
Thể tích khối u (mm3)
1600
1200
800
400
0
0
20
40
Ngày nghiên cứu
Chất dẫn (PBS)
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 12C

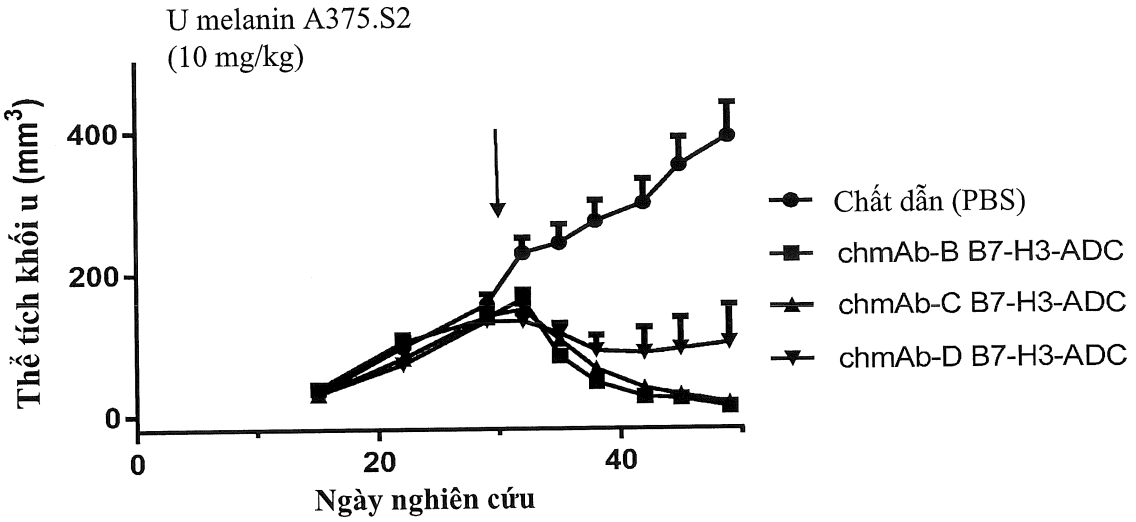


Fig. 13A

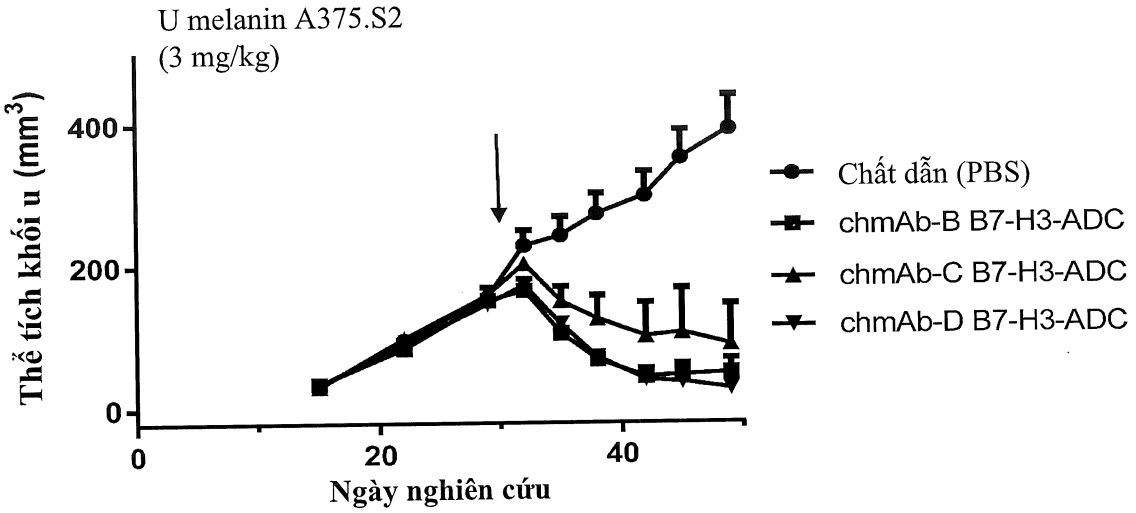


Fig. 13B

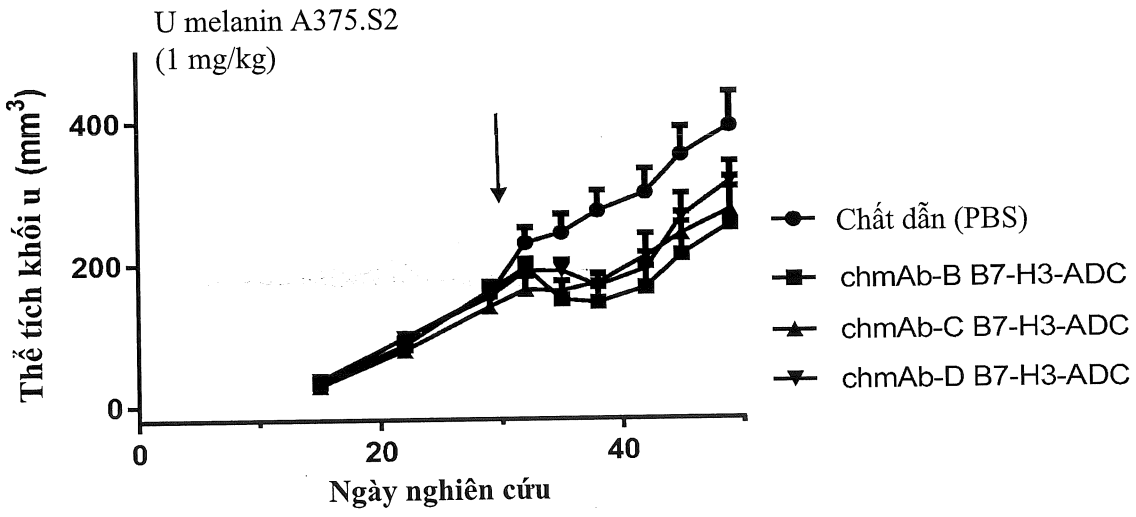

U melanin A375.S2
(1 mg/kg)
Thể tích khối u (mm3)
400
200
0
0
20
40
Ngày nghiên cứu
Chất dẫn (PBS)
chmAb-B B7-H3-ADC
chmAb-C B7-H3-ADC
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 13C

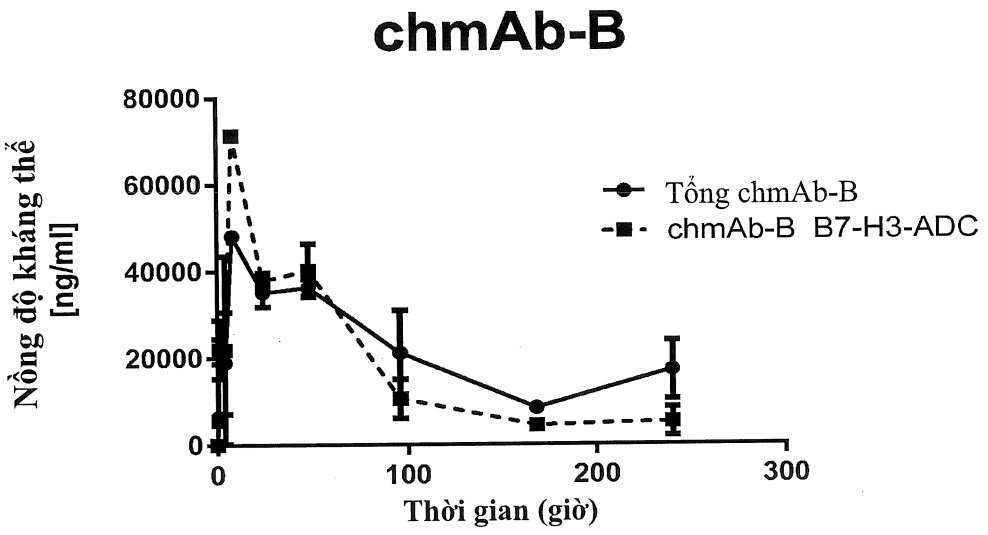


Fig. 14A

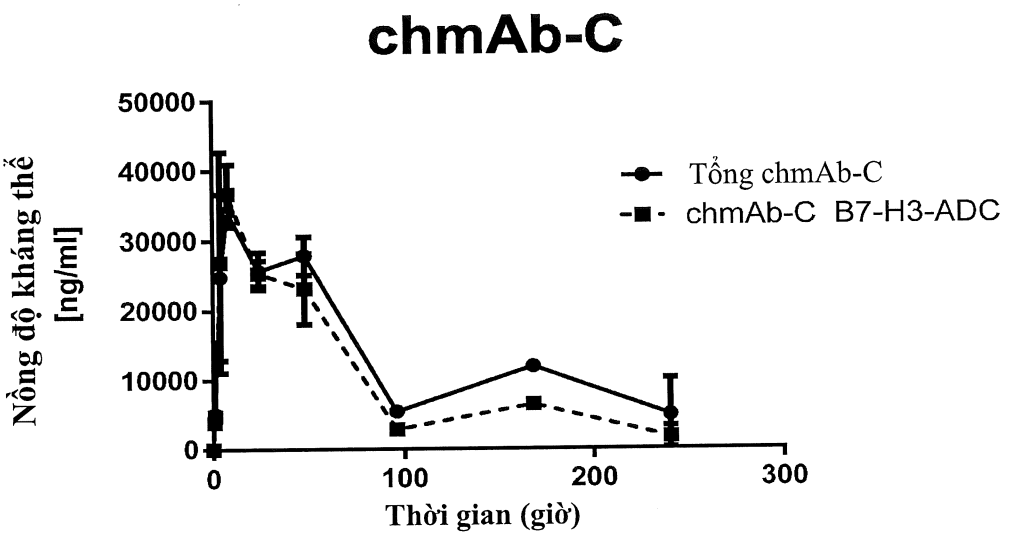


Fig. 14B

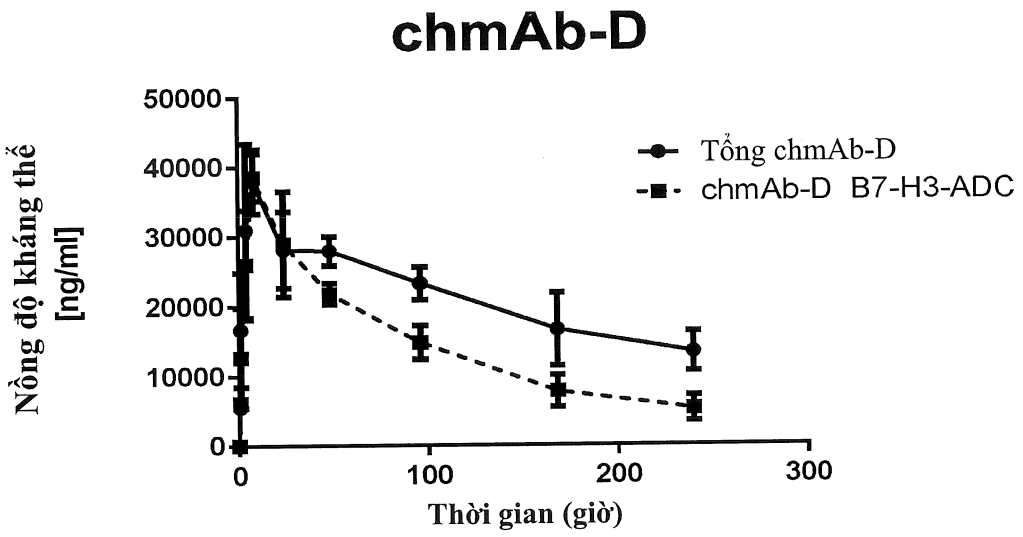

chmAb-D
Nồng độ kháng thể [ng/ml]
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
100
200
300
Thời gian (giờ)
Tổng chmAb-D
chmAb-D B7-H3-ADC

Fig. 14C

Calu-6
Ủ trong 7 ngày

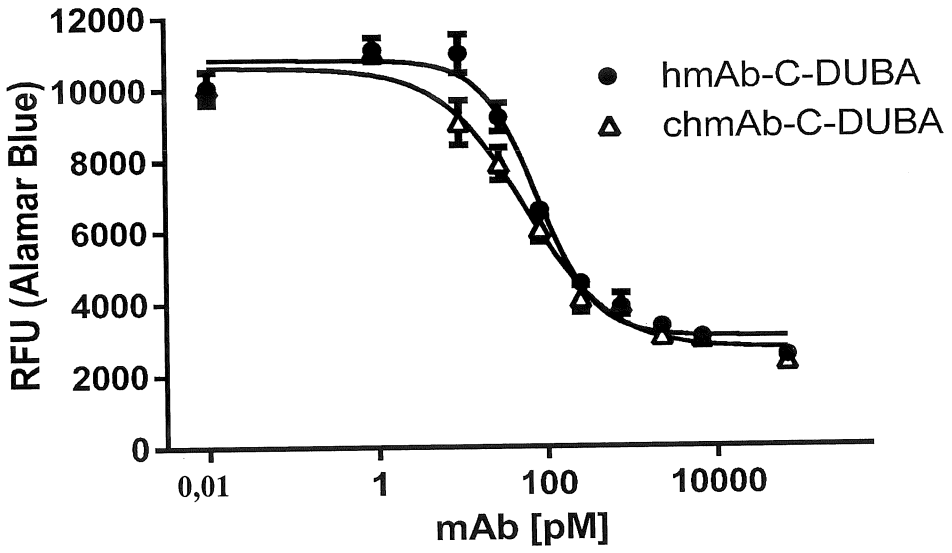


Fig. 15A

NCI-H1703
Ủ trong 7 ngày

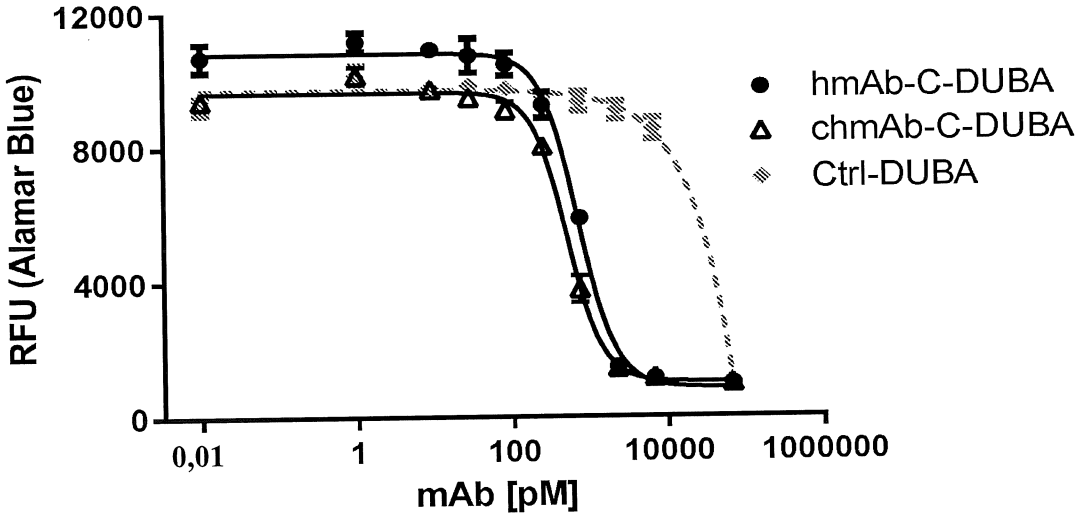


Fig. 15B

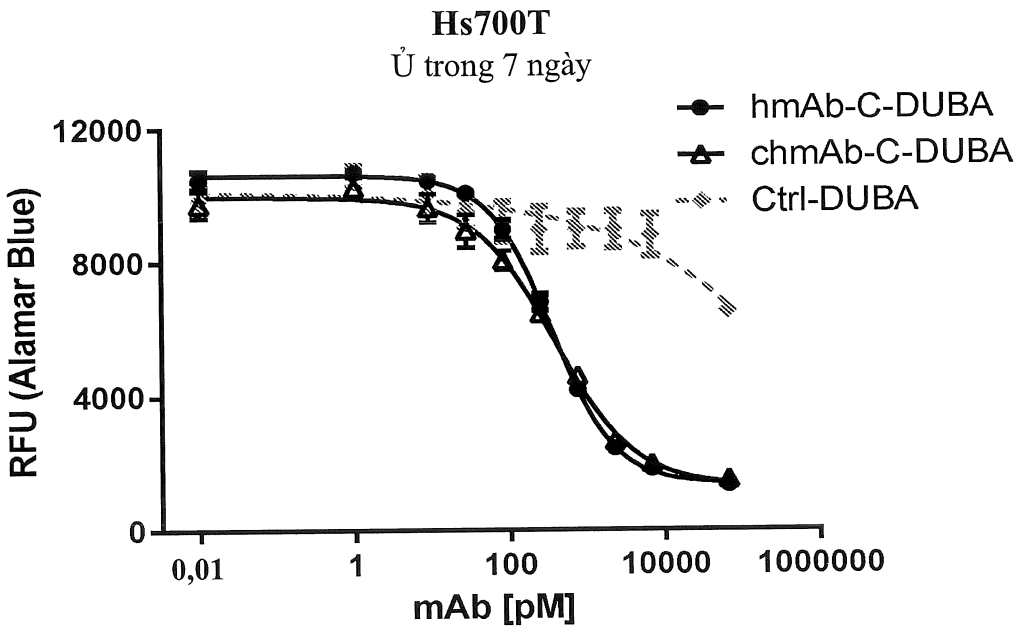


Fig. 15C

Nghiên cứu hiệu quả *in vivo* liều chia nhiều lần của các tế bào hmAb-C-DUBA - Calu-6

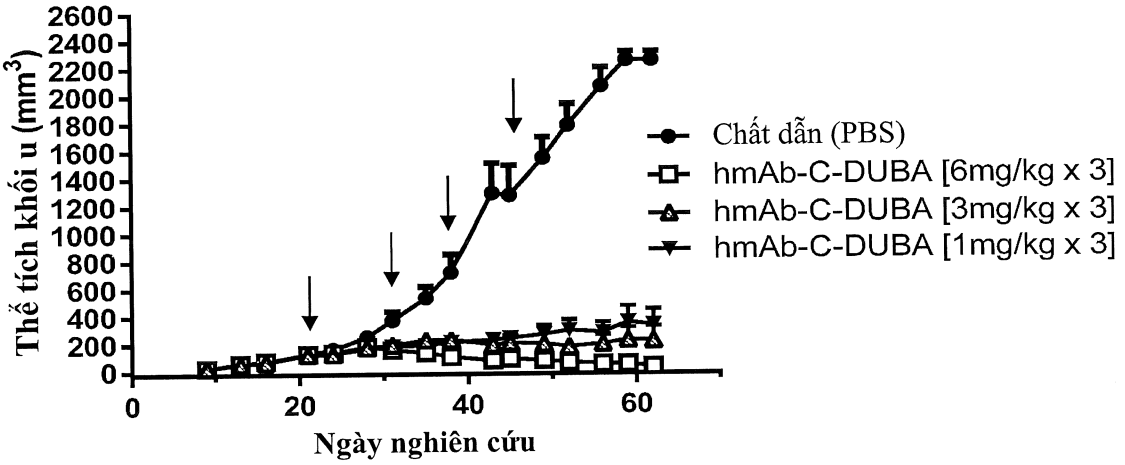


Fig. 16

Nghiên cứu hiệu quả *in vivo* liều duy nhất của các tế bào hmAb-C-DUBA - Calu-6

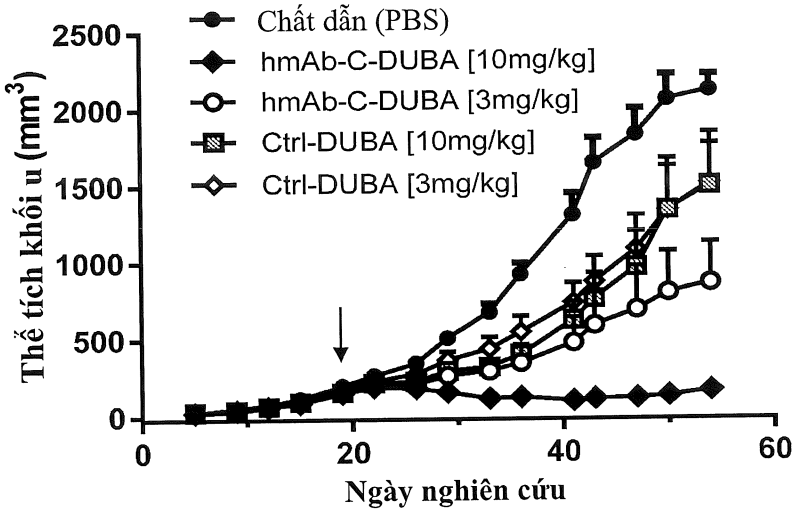


Fig. 17

Nghiên cứu hiệu quả *in vivo* liều duy nhất của các tế bào hmAb-C-DUBA - PA-1

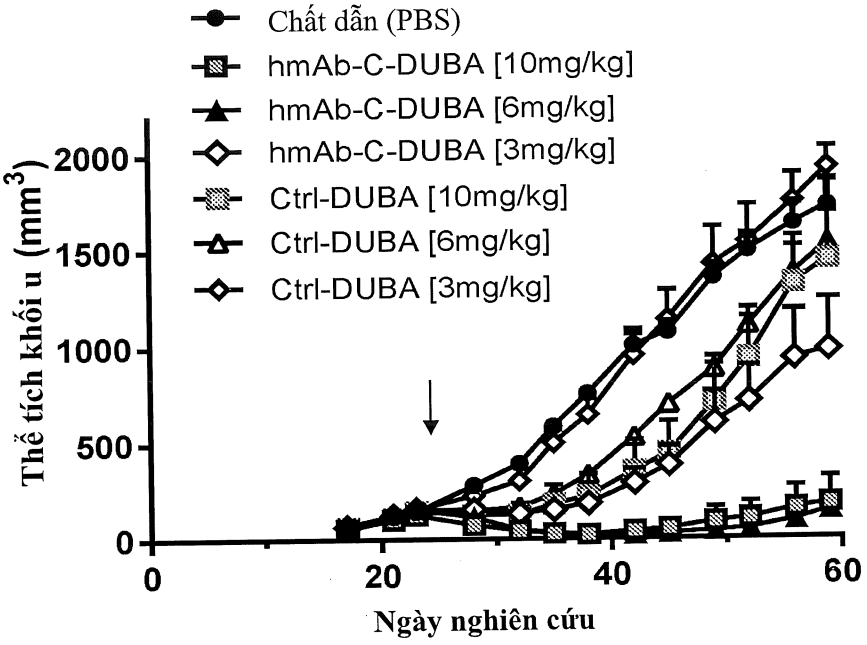


Fig. 18

Nghiên cứu hiệu quả *in vivo* liều duy nhất của các tế bào hmAb-C-DUBA - u melanin A375.S2

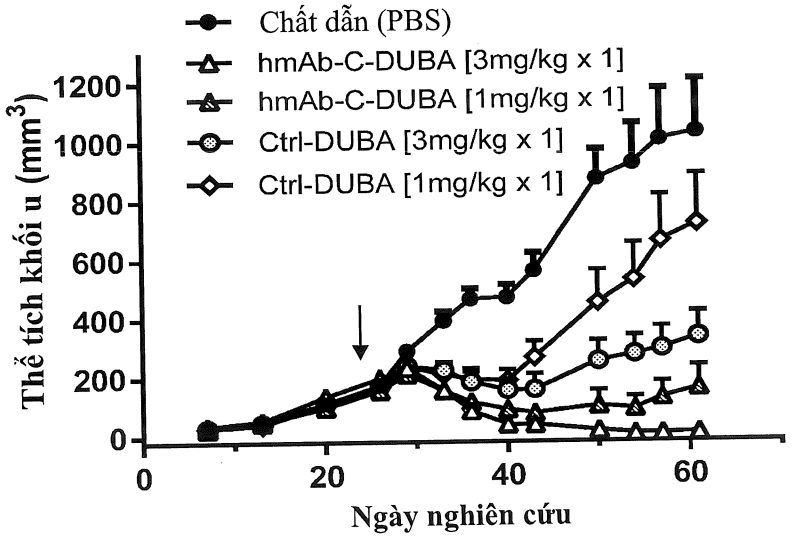


Fig. 19

Ghép khác loài mô đệm mỡ vú MDA-MB-468 đối với kháng B7-H3-DUBA (dữ liệu liều duy nhất 6 mg/kg)

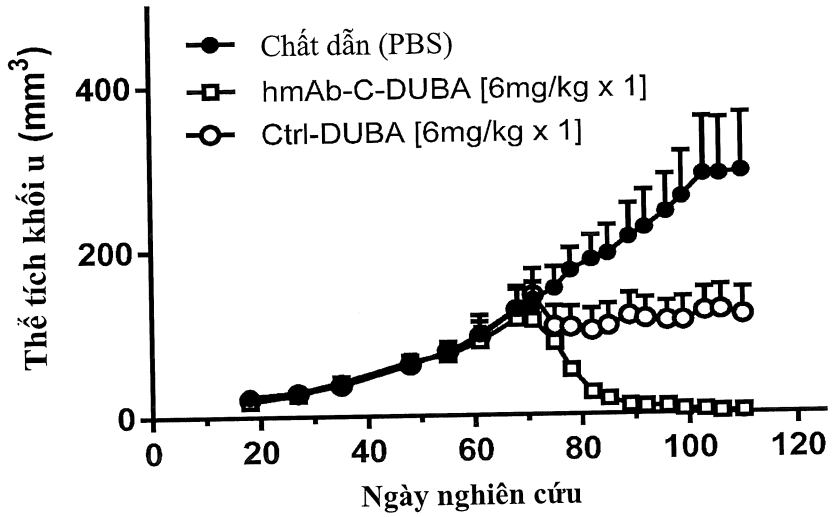


Fig. 20A

Ghép khác loài mô đệm mỡ vú MDA-MB-468 đối với kháng B7-H3-DUBA (dữ liệu liều duy nhất 3 mg/kg)

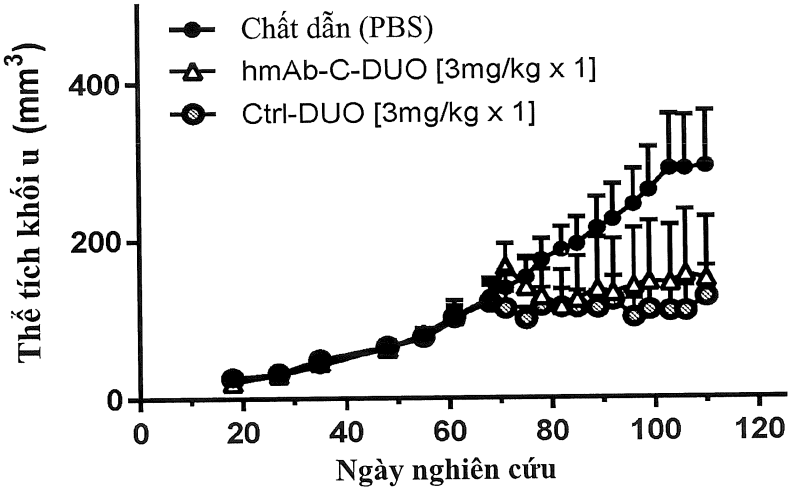


Fig. 20B

Ghép khác loài mô đệm mỡ vú MDA-MB-468 đối với kháng B7-H3-DUBA (dữ liệu liều chia ba 3 mg/kg)

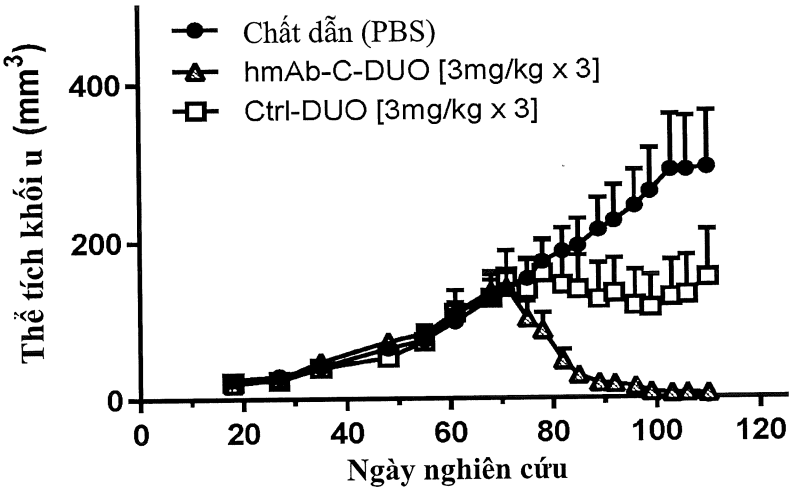


Fig. 20C

Ghép khác loài mô đệm mỡ vú MDA-MB-468 đối với kháng B7-H3-DUBA (tất cả dữ liệu)

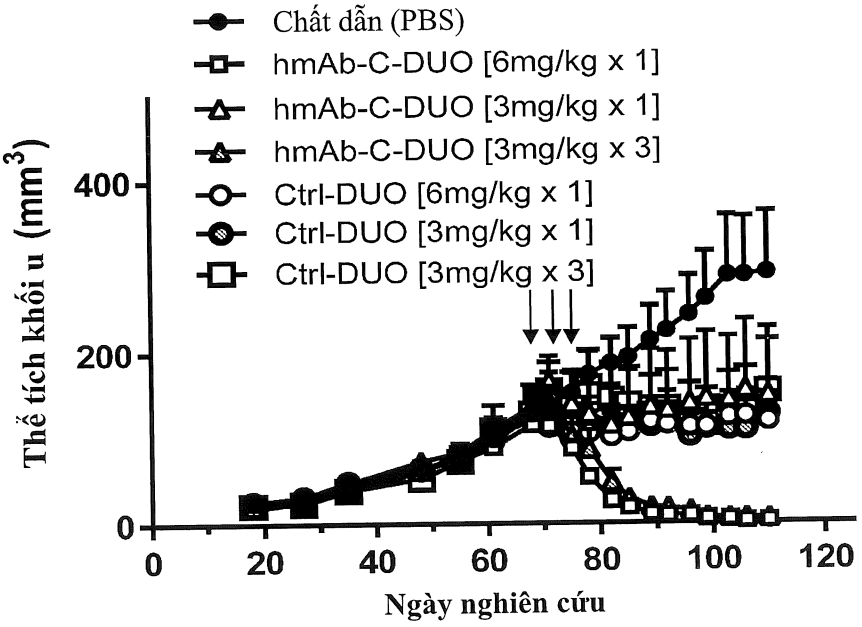


Fig. 20D

Ghép khác loài dưới da PA-1 đối với kháng B7-H3-DUBA
(dữ liệu liều duy nhất hoặc liều chia đôi, 10 mg/kg)

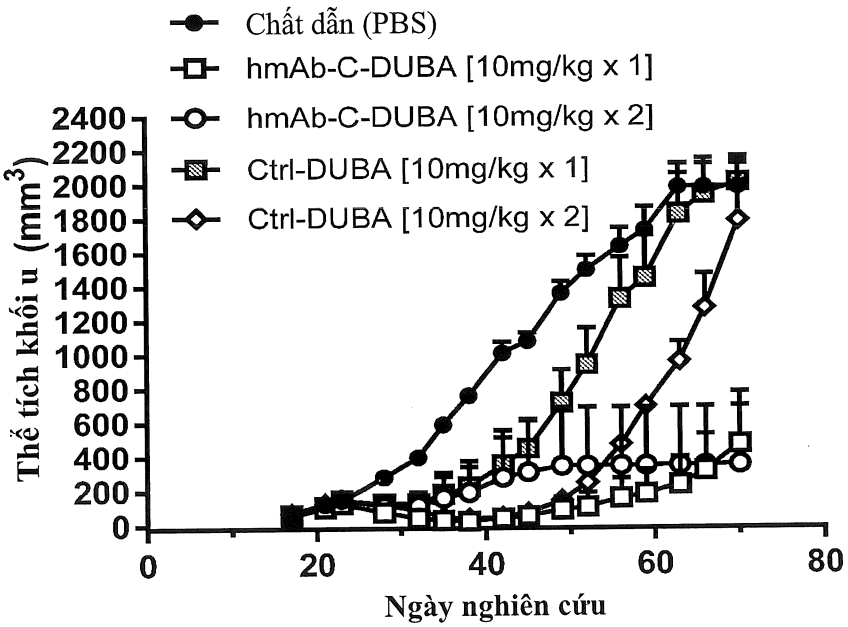


Fig. 21A

Ghép khác loài dưới da PA-1 đối với kháng B7-H3-DUBA
(dữ liệu liều duy nhất hoặc liều chia bốn, 6 mg/kg)

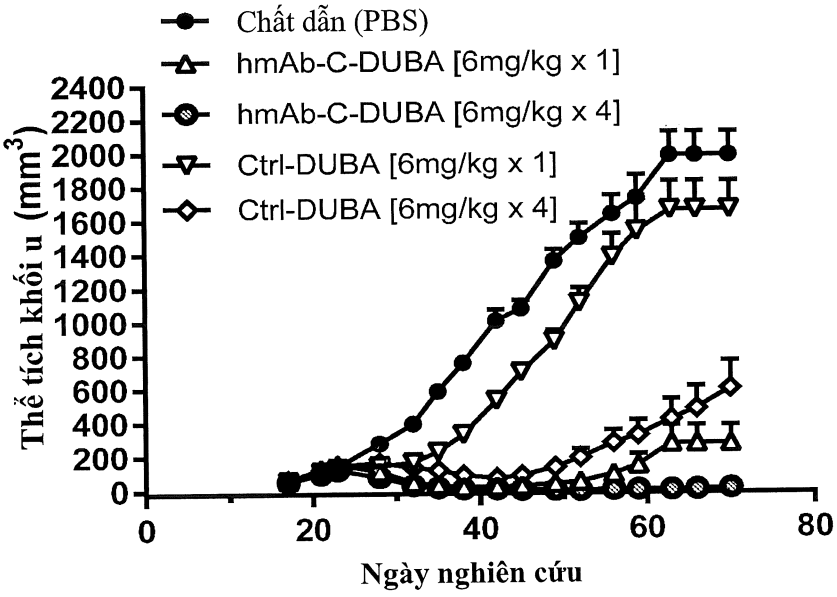


Fig. 21B

Ghép khác loài dưới da PA-1 đối với kháng B7-H3-DUBA (liều duy nhất, 3 mg/kg)

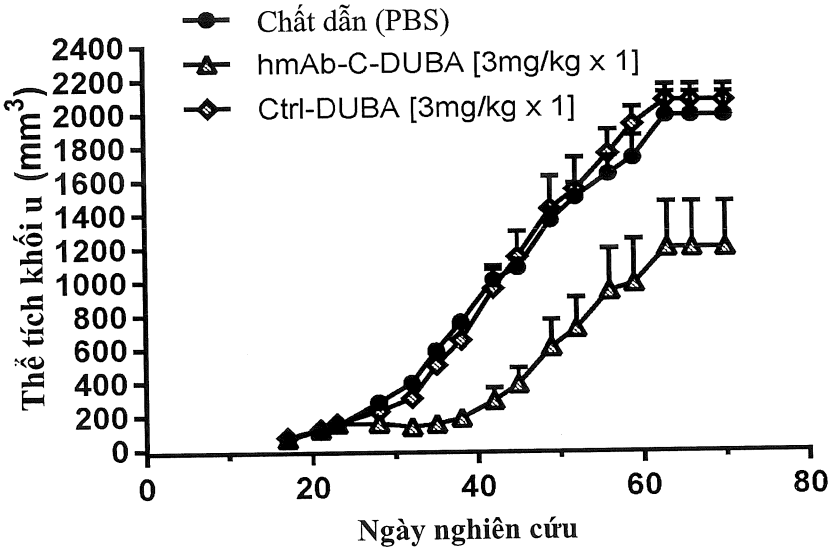


Fig. 21C

Ghép khác loài dưới da PA-1 đối với B7-H3-DUBA (tất cả dữ liệu)

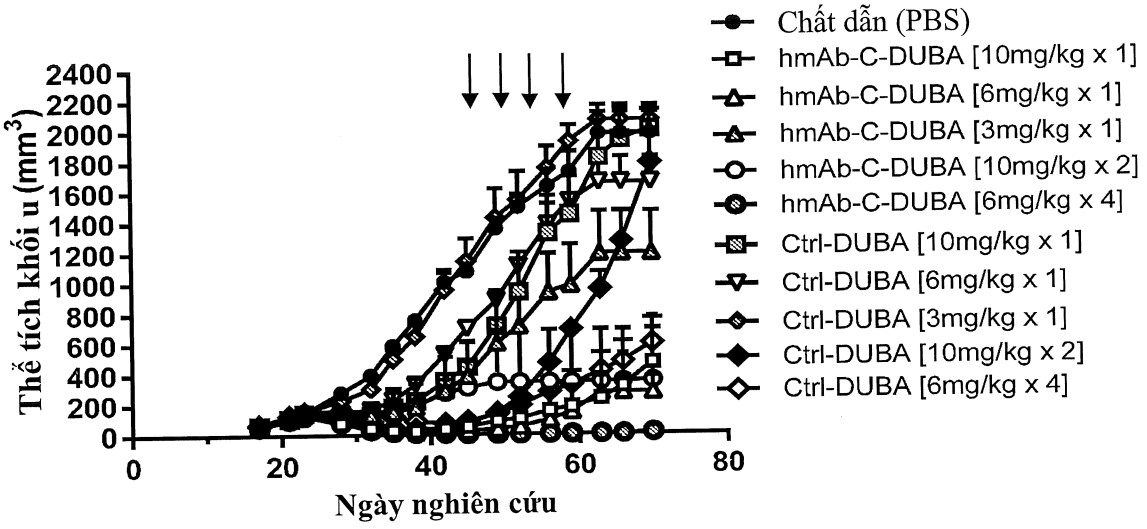


Fig. 21D

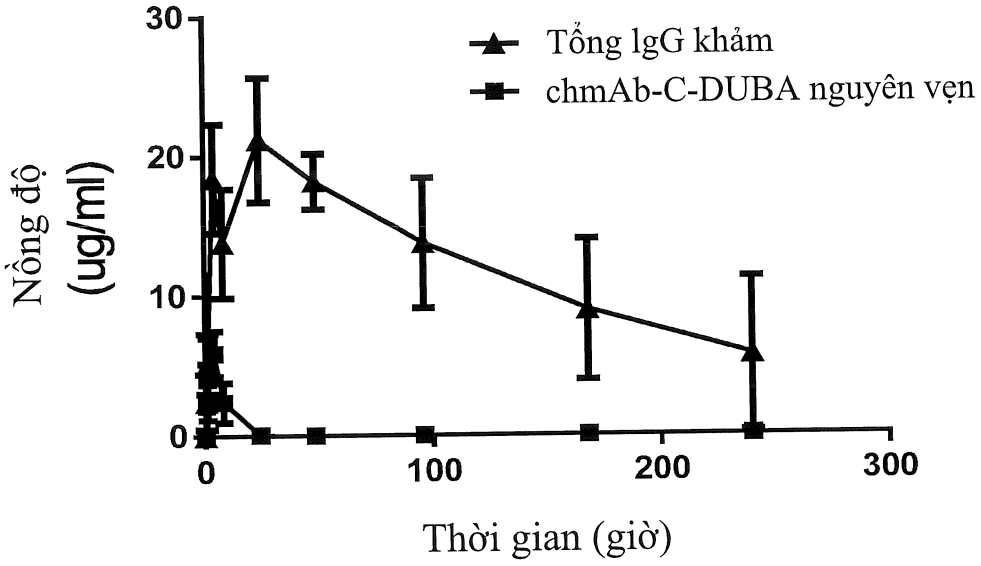

30
20
10
0
Nồng độ
(ug/ml)
Tổng lgG khảm
chmAb-C-DUBA nguyên vẹn
0
100
200
300
Thời gian (giờ)

Fig. 22

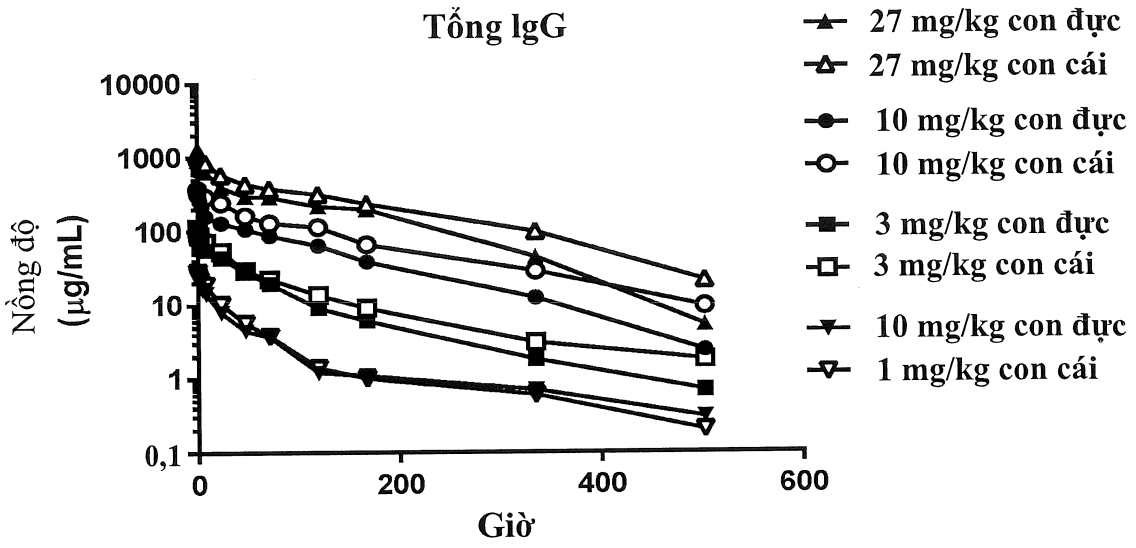


Fig. 23A

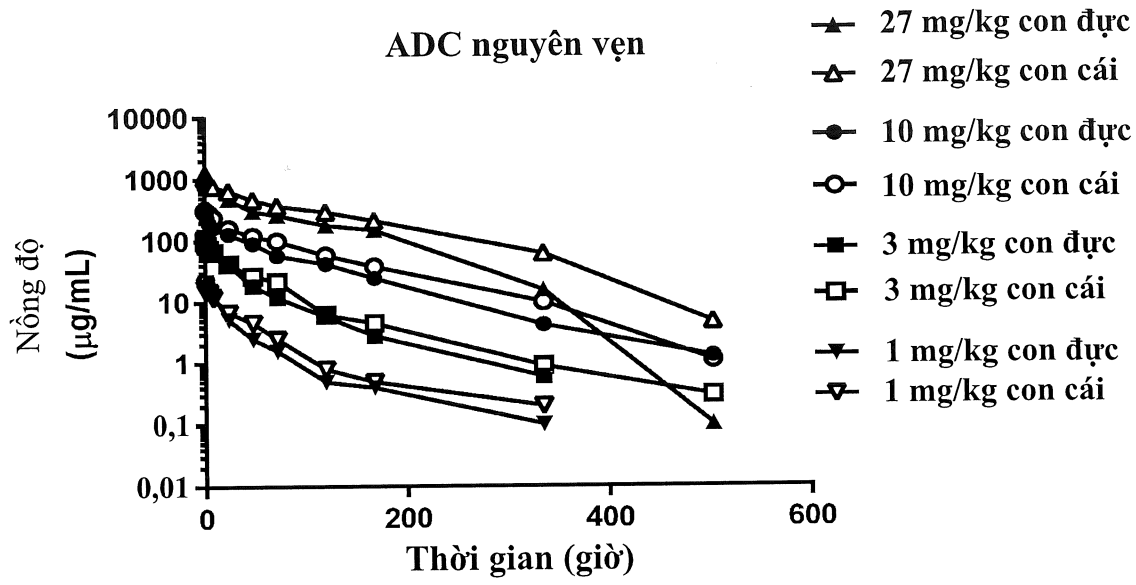


Fig. 23B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MacroGenics, Inc.
Loo, Deryk
Huang, Ling
Johnson, Leslie S.
Son, Thomas
Scribner, Juniper
Bonvini, Ezio

<120> Thể tiếp hợp dược chất kháng thể kháng B7-H3, phân tử gắn kết B7-H3 và dược phẩm bao gồm phân tử gắn kết này

<130> 1301.0143-0144PCT

<150> US 62/432,324
<151> 2016-12-09

<150> US 62/323,249
<151> 2016-04-15

<150> US 62/323,228
<151> 2016-04-15

<160> 106

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền IgG CL Kappa của người

<400> 1

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 2
<211> 104
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(104)
<223> Miền IgG CL Lambda của người

<400> 2

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

<210> 3
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(98)
<223> Miền IgG1 CH1 của người

<400> 3

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

Arg Val

<210> 4
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(98)
<223> Miền IgG2 CH1 của người

<400> 4

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val

<210> 5
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(98)
<223> Miền IgG3 CH1 của người

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
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 Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 6
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(98)
<223> Miền IgG4 CH1 của người

<400> 6

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

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> Miền bản lề IgG1 của người

<400> 7

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 8
<211> 12
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> Miền bản lề IgG2 của người

<400> 8

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 9
<211> 62
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(62)
<223> Miền bản lề IgG3 của người

<400> 9

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
50 55 60

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> Miền bản lề IgG4 của người

<400> 10

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền bản lề IgG4 của người ổn định S228P

<400> 11

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 12
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Miền IgG1 CH2-CH3 của người

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> X là lysin hoặc là không có

<400> 12

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 13
<211> 216
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(216)
<223> Miền IgG2 CH2-CH3 của người

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (216)..(216)
<223> X là lysin hoặc là không có

<400> 13

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
    130   135   140

Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145   150   155   160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
                165   170   175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
            180   185   190

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
    210   215

<210> 14
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Miền IgG3 CH2-CH3 của người

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> X là lysin hoặc là không có

<400> 14

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 15
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Miền IgG4 CH2-CH3 của người

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> X là lysin hoặc là không có

<400> 15

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met

115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
210 215

<210> 16
<211> 534
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(534)
<223> Dạng 4Ig của B7-H3 của người

<400> 16

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu

35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65 70 75 80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
100 105 110

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

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
145 150 155 160

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
165 170 175

Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
180 185 190

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu
195 200 205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
210 215 220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln
225 230 235 240

Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val
245 250 255

Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro
260 265 270

Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr
275 280 285

Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly
290 295 300

Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln
305 310 315 320

Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly
325 330 335

Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val
340 345 350

Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu
355 360 365

Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser
370 375 380

Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln
385 390 395 400

Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
405 410 415

Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
420 425 430

Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
435 440 445

Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
450 455 460

Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
465 470 475 480

Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
485 490 495

Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
500 505 510

Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
515 520 525

Asp Gly Gln Glu Ile Ala
530

<210> 17
<211> 316
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(316)
<223> Dạng 2Ig của B7-H3 của người

<400> 17

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50 55 60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65 70 75 80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
100 105 110

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

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
145 150 155 160

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
165 170 175

Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
180 185 190

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
195 200 205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
210 215 220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
225 230 235 240

Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
245 250 255

Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
260 265 270

Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
275 280 285

Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
290 295 300

Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305 310 315

<210> 18
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(108)
<223> Miền VL của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "mAb-C"

<400> 18

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Pro Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Arg Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(117)
<223> Miền VH của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "mAb-C"

<400> 19

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

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

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

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

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

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

Ala Arg His Asp Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "hmAb-C"

<400> 20

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

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

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

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Pro Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "hmAb-C"

<400> 21

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

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

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

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

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

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

Ala Arg His Asp Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền VL của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "mAb-D"

<400> 22

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly His Ser Pro Glu Ala Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> CDR1 chuỗi nhẹ của kháng thể mAb-D

<400> 23

Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Chuỗi nhẹ CDR2 của kháng thể mAb-D

<400> 24

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDR3 chuỗi nhẹ của kháng thể mAb-D

<400> 25

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 26
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(119)
<223> Miền VL của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "mAb-D"

<400> 26

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg His Gly Tyr Arg Tyr Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(5)
<223> CDR1 chuỗi nặng của kháng thể mAb-D

<400> 27

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(17)
<223> CDR2 chuỗi nặng của kháng thể mAb-D

<400> 28

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(10)
<223> CDR3 chuỗi nặng của kháng thể mAb-D

<400> 29

His Gly Tyr Arg Tyr Glu Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "hmAb-D"

<400> 30

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 31
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "hmAb-D"

<400> 31

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 Ser Ser Phe
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg His Gly Tyr Arg Tyr Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết polypeptit (Liên kết 1)

<400> 32

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit đệm chứa xystein (Liên kết 2)

<400> 33

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết đệm polypeptit (Liên kết thay thế 2)

<400> 34

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết đệm polypeptit (Liên kết thay thế 2)

<400> 35

Leu Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết đệm polypeptit (Liên kết thay thế 2)

<400> 36

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết đệm polypeptit (Liên kết thay thế 2)

<400> 37

Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết đệm polypeptit (Liên kết thay thế 2)

<400> 38

Leu Glu Pro Lys Ser Ser
1 5

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết đệm polypeptit (Liên kết thay thế 2)

<400> 39

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Miền thúc đẩy heterodime

<400> 40

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)
<223> Miền thúc đẩy heterodime

<400> 41

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)
<223> Miền thúc đẩy heterodime

<400> 42

Ala Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> Miền thúc đẩy heterodime

<400> 43

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)
<223> Miền thúc đẩy heterodime

<400> 44

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 45
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền cuộn E thúc đẩy heterodime

<400> 45

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 46
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền cuộn K thúc đẩy heterodime

<400> 46

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 47
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền cuộn E chứa xystein thúc đẩy heterodime

<400> 47

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 48
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền cuộn K chứa xystein thúc đẩy heterodime

<400> 48

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 49
<211> 46
<212> PRT
<213> Streptococcus agalactiae

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(46)
<223> Miền gắn kết albumin 3 (ABD3) của Protein G của chủng Streptococcus G148

<400> 49

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 50
<211> 46
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể khử miễn dịch của miền gắn kết albumin 3 (ABD3) của Protein G của chủng Streptococcus G148

<400> 50

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 51
<211> 46
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể khử miễn dịch của miền gắn kết albumin 3 (ABD3) của Protein G của chủng Streptococcus G148

<400> 51

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 52
<211> 46
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể khử miễn dịch của miền gắn kết albumin 3 (ABD3) của Protein G của chủng Streptococcus G148

<400> 52

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết polypeptit

<400> 53

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 54
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết polypeptit

<400> 54

Val Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 55
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết polypeptit

<400> 55

Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết polypeptit

<400> 56

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 57
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết polypeptit

<400> 57

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 58
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết polypeptit

<400> 58

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Liên kết polypeptit

<400> 59

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 60
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền IgG1 CH2 và CH3 của người L234A/L235A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> X là lysin hoặc là không có

<400> 60

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 61
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể "mang nốt phồng" của miền IgG1 CH2 và CH3 của người

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> X là lysin hoặc là không có

<400> 61

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 62
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể "mang lỗ" của miền IgG1 CH2 và CH3 của người

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> X là lysin hoặc là không có

<400> 62

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 63
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(118)
<223> Miền VH của kháng thể CD2 kháng người của chuột Lo-CD2a

<400> 63

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

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

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

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

Lys Lys Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Lys Phe Asn Tyr Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 64
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> Miền VL của kháng thể CD2 kháng người của chuột Lo-CD2a

<400> 64

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

Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Thr Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Pro Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Phe
85 90 95

Thr His Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 65
<211> 125
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(125)
<223> Miền VH của kháng thể CD3 kháng người của chuột CD3 mAb-1 VH(1)

<400> 65

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 Ser Thr Tyr
20 25 30

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

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

Ser Val Lys Asp 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 Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

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

<210> 66
<211> 125
<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(125)
<223> Miền VH của kháng thể CD3 kháng người của chuột CD3 mAb-1 VH(2)

<400> 66

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 Asp
50 55 60

Ser Val Lys Asp 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 Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

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

<210> 67
<211> 110
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(110)
<223> Miền VL của kháng thể CD3 kháng người của chuột CD3 mAb-1

<400> 67

Gln Ala 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 Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp 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
100 105 110

<210> 68
<211> 125
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(125)
<223> Miền VH của kháng thể CD3 kháng người của chuột CD3 mAb-1 (D65G)

<400> 68

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 Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
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 Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

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

<210> 69
<211> 125
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(125)
<223> Miền VH của kháng thể CD3 kháng người của chuột CD3 mAb-1 thấp

<400> 69

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 Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
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 Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Thr Trp Phe
100 105 110

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

<210> 70
<211> 125
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(125)
<223> Miền VH của kháng thể CD3 kháng người của chuột CD3 mAb-1 nhanh

<400> 70

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 Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
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 Val Arg His Lys Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Thr Trp Phe
100 105 110

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

<210> 71
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(119)
<223> Miền VH của kháng thể CD3 kháng người của chuột OKT3

<400> 71

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

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

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

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền VL của kháng thể CD3 kháng người của chuột OKT3

<400> 72

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
100 105

<210> 73
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> Miền VH của kháng thể CD8 kháng người của chuột OKT8

<400> 73

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

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

Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ser Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 74
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> Miền VL của kháng thể CD8 kháng người của chuột OKT8

<400> 74

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

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

Asp Asn Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Val Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

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

<210> 75
<211> 121

<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> Miền VH của kháng thể CD8 kháng người của chuột TRX2

<400> 75

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
20 25 30

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

Ala Leu Ile Tyr Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Pro His Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 76
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)
<223> Miền VL của kháng thể CD8 kháng người của chuột TRX2

<400> 76

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Ile Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Asn Asn Gly Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 77
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Miền VH của kháng thể CD16 kháng người của chuột 3G8

<400> 77

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

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

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

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 78
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(111)
<223> Miền VL của kháng thể CD16 kháng người của chuột 3G8

<400> 78

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

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

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

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

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

<210> 79
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(117)
<223> Miền VH của kháng thể CD16 kháng người của chuột A9

<400> 79

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Ala Ser Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Arg Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(111)
<223> Miền VL của kháng thể CD16 kháng người của chuột A9

<400> 80

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

Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Asn Thr Gly Thr Val Thr
20 25 30

Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe
35 40 45

Thr Gly Leu Ile Gly His Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr
85 90 95

Asn Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 81
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> Miền VH của kháng thể thụ thể tế bào T kháng người của chuột BMA 031

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 82
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)
<223> Miền VL của kháng thể thụ thể tế bào T kháng người của chuột BMA 031

<400> 82

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 83
<211> 118

<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(118)
<223> Miền VH của kháng thể thụ thể NKG2D kháng người của chuột KYK-1.0

<400> 83

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

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

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

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Arg Phe Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(108)
<223> Miền VL của kháng thể thụ thể NKG2D kháng người của chuột KYK-1.0

<400> 84

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

Thr Ala Arg Ile Pro Cys Gly Gly Asp Asp Ile Glu Thr Lys Ser Val
20 25 30

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

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

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Asp Asn Asn Asp Glu
85 90 95

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

<210> 85
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> Miền VH của kháng thể thụ thể NKG2D kháng người của chuột KYK-2.0

<400> 85

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

1 5 10 15

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

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

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 86
<211> 110
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(110)
<223> Miền VL của kháng thể thụ thể NKG2D kháng người của chuột KYK-2.0

<400> 86

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

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

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 87
<211> 275
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-D1

<400> 87

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

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

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

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Pro Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
115 120 125

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
130 135 140

Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
145 150 155 160

Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
180 185 190

Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
210 215 220

Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
225 230 235 240

Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
245 250 255

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala

260 265 270

Leu Glu Lys
275

<210> 88
<211> 269
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai của DART-D1

<400> 88

Gln Ala 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 Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp 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 Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Asn Thr
165 170 175

Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Asp Gly Gly Ala Met Asp Tyr
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

<210> 89
<211> 273
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất của DART-D2

<400> 89

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
130 135 140

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala
245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
260 265 270

Lys

<210> 90
<211> 270
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai của DART-D2

<400> 90

Gln Ala 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 Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp 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 Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Gly Thr Ile
165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Tyr Arg Tyr Glu Gly Phe
210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
225 230 235 240

Lys Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 91
<211> 503
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ nhất của "DART-D3"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (503)..(503)
<223> X là lysin hoặc là không có

<400> 91

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

130 135 140

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala
245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
260 265 270

Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
275 280 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
500

<210> 92
<211> 270
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ hai của "DART-D3"

<400> 92

Gln Ala 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 Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp 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 Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Gly Thr Ile
165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Tyr Arg Tyr Glu Gly Phe
210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
225 230 235 240

Lys Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 93
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi polypeptit thứ ba của "DART-D3"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (227)..(227)
<223> X là lysin hoặc là không có

<400> 93

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Xaa
225

<210> 94
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cơ chất tetrapeptit của Streptoverticillium mobaraense Transglutaminase

<400> 94

Leu Leu Gln Leu
1

<210> 95
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền VL của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "mAb-A"

<400> 95

Asp Ile Ala Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 96
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(122)
<223> Miền VH của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "mAb-A"

<400> 96

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp

100 105 110

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

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Miền VL của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "mAb-B"

<400> 97

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asp Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 98

<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> Miền VH của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "mAb-B"

<400> 98

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 99
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VL của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "hmAb-B"

<400> 99

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 100
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR1 chuỗi nhẹ của kháng thể kháng B7-H3 được làm tương thích với người "hmAb-B"

<400> 100

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 101

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

<220>
<223> CDR1 chuỗi nhẹ khác của kháng thể kháng B7-H3 được làm tương thích với người
"hmAb-B"

<400> 101

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR2 chuỗi nhẹ của kháng thể kháng B7-H3 được làm tương thích với người "hmAb-B"

<400> 102

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR2 chuỗi nhẹ khác của kháng thể kháng B7-H3 được làm tương thích với người
"hmAb-B"

<400> 103

Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 104
<211> 120
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền VH của kháng thể kháng B7-H3 của chuột "hmAb-B"

<400> 104

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 105
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR2 chuỗi nặng của kháng thể kháng B7-H3 được làm tương thích với người "hmAb-B"

<400> 105

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 106
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR2 chuỗi nặng khác của kháng thể kháng B7-H3 được làm tương thích với người "hmAb-B"

<400> 106

Thr Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly