



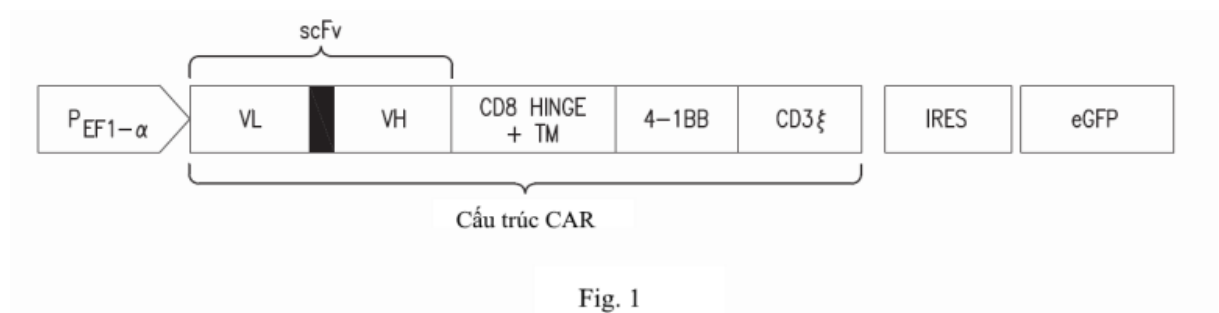
- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0045923
(51)^{2020.01} C07K 19/00; C12N 15/867; C12N 15/63; C07K 16/28; C12N 15/62 (13) B

-
- (21) 1-2021-00338 (22) 18/07/2019
(86) PCT/US2019/042452 18/07/2019 (87) WO 2020/018825 23/01/2020
(30) 62/700,615 19/07/2018 US
(45) 26/05/2025 446 (43) 25/06/2021 399A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA
(72) DILILLO, David (US); DELFINO, Frank (US); BRAY, Kevin (US); MEAGHER, Thomas, Craig (US); KIRSHNER, Jessica (US); SINESHCHEKOVA, Olga (US).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)
-

- (54) THỤ THỂ KHÁNG NGUYÊN KHẢM ĐẶC HIỆU KHÁNG NGUYÊN TRƯỞNG THÀNH TẾ BÀO B (BCMA) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(21) 1-2021-00338

(57) Sáng chế đề cập đến kháng nguyên trưởng thành tế bào B (BCMA) được biểu hiện trên các tương bào ác tính. Sáng chế đề cập đến các thụ thể kháng nguyên khả đặc hiệu BCMA và tế bào biểu hiện các thụ thể kháng nguyên khả này. Theo các phương án xác định, tế bào thiết kế biểu hiện thụ thể kháng nguyên khả theo sáng chế có khả năng ức chế sự phát triển của các khối u biểu hiện BCMA. Tế bào thiết kế theo sáng chế hữu dụng trong điều trị bệnh và rối loạn trong đó đáp ứng miễn dịch nhằm đích BCMA được điều chỉnh tăng hoặc được cảm ứng là mong muốn và/hoặc có lợi về mặt trị liệu. Ví dụ, tế bào thiết kế biểu hiện thụ thể kháng nguyên khả đặc hiệu BCMA theo sáng chế hữu dụng trong điều trị các ung thư khác nhau, bao gồm bệnh đa u tủy xương.



Tham chiếu tới danh mục trình tự

Đơn này kết hợp bằng cách tham chiếu danh mục trình tự được đệ trình ở dạng có thể đọc được trên máy vi tính ở dạng hồ sơ 10455WO01-Sequence.txt, được thiết lập ngày 17 tháng 07 năm 2019 và chứa dung lượng 66907 byte.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thụ thể kháng nguyên khảm (chimeric antigen receptor - CAR), và tế bào thiết kế bao gồm thụ thể kháng nguyên khảm này, chúng có tính đặc hiệu đối với kháng nguyên trưởng thành tế bào B (B-cell maturation antigen - BCMA), và phương pháp sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng nguyên trưởng thành tế bào B (BCMA), còn được biết là TNFRSF17, hoặc CD269, là protein xuyên màng type III thiếu peptit nhận tín hiệu và chứa miền ngoại bào giàu xystein. BCMA, cùng với các protein có họ hàng gần, thúc đẩy sự sống sót tế bào B ở các giai đoạn phát triển riêng biệt. BCMA được biểu hiện duy nhất trong các tế bào dòng tế bào B, đặc biệt ở vùng gian nang của tủy xương cũng như ở các nguyên tương bào và các tương bào biệt hóa. BCMA được cảm ứng chọn lọc trong quá trình biệt hóa tương bào, và cần thiết cho sự sống sót tối ưu của các tương bào sống lâu trong tủy xương. Trong bệnh đa u tủy xương, BCMA được biểu hiện nhiều trên tương bào ác tính ở mức tăng cao, và sự biểu hiện của BCMA gia tăng tiến triển từ các tế bào bình thường đến tế bào đa u tủy xương hoạt động. BCMA cũng được biểu hiện ở các khối u ác tính tế bào B khác, bao gồm cả bệnh tăng globulin đại phân tử Waldenström, u lymphô Burkitt, và u lymphô tế bào B lớn lan tỏa. Tai *et al.*, *Immunotherapy*, 7(11):1187-1199, 2015.

Miễn dịch trị liệu tự thân, phương pháp này liên quan đến việc truyền các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên tự thân được sinh ra bên ngoài cơ thể, là chiến lược hứa hẹn trong điều trị các nhiễm trùng do virus và ung thư. Tế bào T sử dụng trong miễn dịch trị liệu tự thân có thể được sinh ra bằng cách nhân rộng các tế bào T đặc hiệu kháng nguyên hoặc chuyển hướng tế bào T thông qua công nghệ thao tác gen.

Tính đặc hiệu mới trong tế bào T đã được tạo ra một cách thành công thông qua sự chuyển gen của các thụ thể tế bào T chuyển gen hoặc các thụ thể kháng nguyên khảm (CARs) (Jena, Dotti et al. 2010). CAR là các thụ thể tổng hợp chứa phần hướng đích mà phần này kết hợp với một hoặc nhiều miền tín hiệu trong phân tử dung hợp đơn. Nói chung, phần liên kết của CAR bao gồm miền liên kết kháng nguyên của kháng thể chuỗi đơn (scFv), bao gồm các đoạn biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng được nối bằng đoạn nối linh hoạt. Các miền tín hiệu của CAR thế hệ đầu tiên có nguồn gốc từ vùng bào tương của các chuỗi CD3zeta hoặc chuỗi gama thụ thể Fc. Các CAR thế hệ thứ nhất đã được chứng minh là làm chuyển hướng thành công hoạt tính gây độc tế bào của tế bào T. Tuy nhiên, chúng không tạo ra sự nhân rộng và hoạt tính chống khối u lâu dài *in vivo*. Các miền tín hiệu từ các phân tử đồng kích thích, cũng như các miền xuyên màng và miền bản lề đã được bổ sung để tạo ra các CAR thuộc thế hệ thứ hai và thứ ba, dẫn tới một số thử nghiệm trị liệu thành công ở người. Ví dụ, tế bào T chuyển hướng CAR đặc hiệu đối với kháng nguyên biệt hóa tế bào B CD19 đã được chứng minh có hiệu quả mạnh trong điều trị các khối u ác tính của tế bào B, trong khi tế bào T chuyển hướng TCR đã tỏ ra có lợi ở các bệnh nhân bị ung thư rắn. Tác giả Stauss *et al.* mô tả các chiến lược cải biến các CAR và TCR trị liệu, để sử dụng trong điều trị ung thư, ví dụ, để tăng cường thực hiện chức năng tác động đặc hiệu kháng nguyên và giới hạn độc tính của các tế bào T thiết kế (*Current Opinion in Pharmacology* 2015, 24:113-118).

Tế bào thiết kế biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm mà hướng đích vào BCMA sẽ được sử dụng trong các cơ sở trị liệu trong đó sự tiêu diệt hướng đích đặc hiệu và thông qua trung gian tế bào T đối với các tế bào biểu hiện BCMA là mong muốn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến thụ thể kháng nguyên khảm đặc hiệu kháng nguyên trưởng thành tế bào B (BCMA) bao gồm, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: (a) miền liên kết phối tử ngoại bào bao gồm miền liên kết kháng nguyên kháng BCMA; (b) miền bản lề; (c) miền xuyên màng; và (d) miền tế bào chất bao gồm miền đồng kích thích và miền tín hiệu.

Trong một số trường hợp, miền liên kết phối tử ngoại bào bao gồm miền đoạn biến đổi chuỗi đơn kháng BCMA (scFv) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) và

vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR). Theo một số phương án, miền scFv kháng BCMA bao gồm đoạn nối giữa LCVR và HCVR. Trong một số trường hợp, thụ thể kháng nguyên khảm còn bao gồm đoạn nối giữa miền liên kết phối tử ngoại bào (ví dụ, miền scFv) và miền bản lề. Trong một số trường hợp, đoạn nối bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 93-96. Theo một số phương án, đoạn nối là đoạn nối $(G4S)_n$, trong đó n nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

Trong một số trường hợp, miền bản lề, miền xuyên màng, hoặc cả hai, đều từ polypeptit CD8 α . Trong một số trường hợp, miền đồng kích thích bao gồm miền đồng kích thích 4-1BB. Trong một số trường hợp, miền tín hiệu bao gồm miền tín hiệu CD3zeta. Theo một số phương án, miền bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 97. Theo một số phương án, miền xuyên màng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 98. Theo một số phương án, miền đồng kích thích 4-1BB bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 99. Theo một số phương án, miền tín hiệu CD3zeta bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 100.

Trong một số trường hợp, LCVR bao gồm các vùng quyết định bổ cứu (CDRs) của LCVR bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58 và 74. Trong một số trường hợp, LCVR bao gồm các miền LCDR1- LCDR2-LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin, lần lượt của các trình tự SEQ ID NO: 12-14-16, 28-30-32, 44-46-48, 60-62-64, hoặc 76-78-80. Trong một số trường hợp, HCVR bao gồm các CDR của HCVR bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 và 66. Trong một số trường hợp, HCVR bao gồm các miền HCDR1- HCDR2-HCDR3 bao gồm các trình tự axit amin, lần lượt của các trình tự SEQ ID NO: 4-6-8, 20-22-24, 36-38-40, 52-54-56, hoặc 68-70-72.

Theo một số phương án, LCVR bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58 và 74, hoặc trình tự axit amin có mức tương đồng trình tự 95% đến 99% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58 và 74; và HCVR bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 và 66, hoặc trình tự axit amin có mức tương đồng trình tự 95% đến 99% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 và 66. Trong một số trường hợp, LCVR bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO:

10, 26, 42, 58 và 74, và HCVR bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50 và 66.

Theo một số phương án, miền scFv bao gồm cặp trình tự axit amin LCVR/HCVR bao gồm các trình tự axit amin của các trình tự SEQ ID NO: 10/2, 26/18, 42/34, 58/50, hoặc 74/66. Trong một số trường hợp, LCVR và HCVR được nối bằng đoạn nối, tùy ý là đoạn nối $(G4S)_n$ trong đó $n=1-3$.

Trong một số trường hợp, thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, hoặc SEQ ID NO: 90. Theo một số phương án, thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 82. Theo một số phương án, thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 84. Theo một số phương án, thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 86. Theo một số phương án, thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 88. Theo một số phương án, thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 90.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic phân lập mã hóa cho thụ thể kháng nguyên khảm được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 81, 83, 85, 87 và 89.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vector bao gồm phân tử axit nucleic được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, vector là vector ADN, vector ARN, plasmit, vector lentivirus, vector adenovirus, hoặc vector retrovirus. Theo một số phương án, vector là vector lentivirus.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào bao gồm phân tử axit nucleic, hoặc vector được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, tế bào là tế bào T người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào thiết kế bao gồm thụ thể kháng nguyên khảm như được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, tế bào thiết kế là tế bào miễn dịch. Trong một số trường hợp, tế bào miễn dịch là tế bào gây miễn dịch. Trong một số trường hợp, tế bào gây miễn dịch là lymphô bào T. Theo một số phương án, lymphô bào T là lymphô bào T gây viêm, lymphô bào T gây độc tế bào, lymphô bào T điều hòa, hoặc lymphô bào T hỗ trợ. Theo một số phương án, tế bào thiết kế là lymphô bào T gây độc tế bào CD8+.

Trong một số trường hợp, tế bào thiết kế theo sáng chế là để sử dụng trong điều trị ung thư biểu hiện BCMA. Trong một số trường hợp, ung thư biểu hiện BCMA là bệnh đa u tủy xương.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào T người thiết kế bao gồm thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: (a) miền liên kết phối tử ngoại bào bao gồm miền đoạn biến đổi chuỗi đơn kháng BCMA (scFv) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) và vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR); (b) miền bản lề; (c) miền xuyên màng; và (d) miền tế bào chất bao gồm miền đồng kích thích 4-1BB và miền tín hiệu CD3zeta.

Trong một số trường hợp, miền scFv bao gồm cặp trình tự axit amin LCVR/HCVR bao gồm các trình tự axit amin của các trình tự SEQ ID NO: 10/2, 26/18, 42/34, 58/50, hoặc 74/66. Trong một số trường hợp, miền bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 97. Trong một số trường hợp, miền xuyên màng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 98. Trong một số trường hợp, miền đồng kích thích 4-1BB bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 99. Trong một số trường hợp, miền tín hiệu CD3zeta bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 100.

Theo một số phương án, tế bào T người thiết kế bao gồm thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 82. Theo một số phương án, tế bào T người thiết kế bao gồm thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 84. Theo một số phương án, tế bào T người thiết kế bao gồm thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 86. Theo một số phương án, tế bào T người thiết kế bao gồm thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 88. Theo một số phương án, tế bào T người thiết kế bao gồm thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 90.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm tế bào T người biến đổi gen và chất mang dược dụng, trong đó tế bào T người biến đổi gen bao gồm thụ thể kháng nguyên khảm như được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, dược phẩm là để sử dụng trong điều trị ung thư biểu hiện BCMA. Theo một số phương án, ung thư biểu hiện BCMA là bệnh đa u tủy xương.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào thiết kế như được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này. Trong một số trường hợp, dược phẩm là để sử dụng

trong điều trị ung thư biểu hiện BCMA. Theo một số phương án, ung thư biểu hiện BCMA là bệnh đa u tủy xương.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng thụ thể kháng nguyên khảm, phân tử axit nucleic, vectơ, tế bào hoặc tế bào thiết kế như được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này trong sản xuất thuốc để điều trị ung thư biểu hiện BCMA. Trong một số trường hợp, ung thư biểu hiện BCMA là bệnh đa u tủy xương. Theo các phương án khác nhau, các thụ thể kháng nguyên khảm, phân tử axit nucleic, vectơ, tế bào, hoặc tế bào thiết kế được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này được dự định để sử dụng trong phương pháp bất kỳ được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này. Ví dụ, theo một số phương án, CAR hoặc tế bào thiết kế thảo luận trong bản mô tả này là để sử dụng trong y học hoặc để sử dụng trong điều trị ung thư như được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tăng cường hoạt tính lymphô bào T ở đối tượng bao gồm, việc đưa vào trong đối tượng lymphô bào T chứa thụ thể kháng nguyên khảm như được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị đối tượng đang bị ung thư bao gồm, việc đưa vào trong đối tượng lượng có hiệu quả điều trị của lymphô bào T chứa thụ thể kháng nguyên khảm như được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp kích thích đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T với quần thể hoặc mô tế bào đích ở đối tượng bao gồm bước dùng cho đối tượng một lượng hữu hiệu của tế bào được biến đổi gen để biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm như được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra miễn dịch chống khối u ở đối tượng, phương pháp bao gồm bước dùng cho đối tượng một lượng hữu hiệu của tế bào được biến đổi gen để biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm như được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này.

Theo một số phương án về phương pháp được thảo luận ở trên, đối tượng là con người. Trong một số trường hợp, đối tượng đang bị bệnh đa u tủy xương, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính dòng B, bệnh bạch cầu lympho bào mãn tính tế bào B, u lymphô không Hodgkin tế bào B, bệnh bạch cầu và u lymphô, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, u lymphô Hodgkin, hoặc bệnh bạch cầu nguyên bào

lympho cấp tính trẻ em. Theo một số phương án, đối tượng đang bị bệnh đa u tủy xương.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp thiết kế quần thể tế bào để biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm, trong đó phương pháp bao gồm các bước: (a) tạo ra quần thể tế bào miễn dịch; (b) đưa vào trong các tế bào miễn dịch này phân tử axit nucleic mã hóa cho thụ thể kháng nguyên khảm như được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này; (c) nuôi cấy tế bào miễn dịch trong điều kiện để biểu hiện các phân tử axit nucleic; và (d) phân lập các tế bào miễn dịch biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm ở bề mặt tế bào. Trong một số trường hợp, phương pháp còn bao gồm việc thu quần thể tế bào miễn dịch từ đối tượng trước khi đưa phân tử axit nucleic vào.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị ung thư biểu hiện BCMA ở đối tượng, trong đó phương pháp bao gồm các bước: (a) thiết kế quần thể tế bào theo phương pháp được thảo luận ở trên; và (b) lại đưa quần thể tế bào miễn dịch biểu hiện các thụ thể kháng nguyên khảm vào trong đối tượng. Theo một số phương án, ung thư biểu hiện BCMA là bệnh đa u tủy xương.

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng khi xem xét phần mô tả chi tiết tiếp theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 minh họa cấu trúc nucleotit minh họa để biểu hiện cấu trúc thụ thể kháng nguyên khảm (CAR). Cấu trúc nucleotit minh họa bao gồm kháng BCMA VL-đoạn nối-VH scFv, miền bản lề và miền xuyên màng CD8 ở người, miền đồng kích thích 4-1BB, miền tín hiệu CD3zeta, và trình tự IRES:eGFP để theo dõi các tế bào biến đổi CAR.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi sáng chế được mô tả, cần hiểu rằng, sáng chế này không bị giới hạn ở các phương pháp và điều kiện thực nghiệm cụ thể đã mô tả, vì các phương pháp và điều kiện như vậy có thể thay đổi. Cũng cần hiểu rằng, thuật ngữ sử dụng trong bản mô tả này chỉ duy nhất nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không dự định để giới hạn, vì phạm vi bảo hộ của sáng chế sẽ chỉ bị giới hạn bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo. Các phương án bất kỳ hoặc dấu hiệu của các phương án này có thể được kết hợp với nhau, và những sự kết hợp như vậy chính xác được bao hàm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Bất kỳ giá trị riêng biệt nào được thảo luận ở trên hoặc trong bản

mô tả này có thể được kết hợp với giá trị liên quan khác được thảo luận ở trên hoặc trong bản mô tả này để viện dẫn một khoảng với các giá trị biểu thị các đầu trên và đầu dưới của khoảng, và các khoảng như vậy được bao hàm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế này.

Trừ khi được xác định theo cách khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa tương tự như thông thường được hiểu bởi một người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc về lĩnh vực này. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khoảng,” khi được sử dụng trong tham chiếu tới một giá trị bằng số viện dẫn cụ thể, có nghĩa rằng, giá trị có thể thay đổi so với giá trị viện dẫn không lớn hơn 1%. Ví dụ, như được sử dụng ở đây, các diễn đạt “khoảng 100” bao gồm cả 99 và 101 và tất cả các giá trị nằm ở giữa (ví dụ, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.).

Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu mô trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong thực hành và thử nghiệm sáng chế, song các phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên bây giờ sẽ được mô tả. Tất cả các công bố patent, đơn và công bố non-patent nêu ra ở đây được kết hợp tham khảo trong bản mô tả này.

Phần định nghĩa

Cách diễn đạt “BCMA,” như được sử dụng ở đây, để chỉ kháng nguyên trưởng thành tế bào B. BCMA (còn được biết là TNFRSF17 và CD269) là protein bề mặt tế bào được biểu hiện ở các tương bào ác tính, và đóng vai trò trung tâm trong việc điều chỉnh sự trưởng thành và biệt hóa tế bào B thành các tương bào tạo ra globulin miễn dịch. Như được sử dụng ở đây, “BCMA” để chỉ protein BCMA người trừ khi được xác định rõ là từ các loài không phải người (ví dụ, “BCMA chuột,” “BCMA khỉ,” v.v.). Protein BCMA người có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 101.

Như được sử dụng ở đây, “kháng thể mà liên kết BCMA” hoặc “kháng thể kháng BCMA” bao gồm cả các kháng thể và các đoạn nối kháng nguyên của chúng mà nhận diện theo cách đặc hiệu BCMA.

Thuật ngữ “miền liên kết phối tử” và “miền liên kết kháng nguyên” được sử dụng thay đổi lẫn nhau được trong bản mô tả này, và đề cập tới phần của thụ thể kháng nguyên khảm hoặc kháng thể tương ứng mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên xác định trước (ví dụ, BCMA). Thuật ngữ tham chiếu “kháng thể tương ứng” để chỉ kháng

thể mà các vùng CDR hoặc các vùng biến đổi (HCVR và LCVR) sử dụng trong thụ thể kháng nguyên khảm có nguồn gốc từ kháng thể đó. Ví dụ, các cấu trúc thụ thể kháng nguyên khảm được thảo luận trong ví dụ 2 bao gồm scFvs với các vùng biến đổi có nguồn gốc từ các kháng thể kháng BCMA đặc hiệu. Các kháng thể kháng BCMA này là “các kháng thể tương ứng” với các thụ thể kháng nguyên khảm tương ứng.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng ở đây, nghĩa là phân tử hoặc phức phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ bao gồm ít nhất một vùng quyết định bổ cứu (CDR) mà vùng này liên kết đặc hiệu với hoặc tương tác với một kháng nguyên cụ thể (ví dụ, BCMA). Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm cả các phân tử globulin miễn dịch gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối thông bằng các liên kết disulfit, cũng như các multime của nó (ví dụ, IgM). Thuật ngữ “kháng thể” cũng bao gồm cả các phân tử globulin miễn dịch gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối thông bằng các liên kết disulfit. Mỗi một chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (trong bản mô tả này được viết tắt là HCVR hoặc V_H) và vùng ổn định chuỗi nặng. Vùng ổn định chuỗi nặng bao gồm ba miền, C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} . Mỗi một chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (trong bản mô tả này được viết tắt là LCVR hoặc V_L) và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Vùng ổn định chuỗi nhẹ bao gồm một miền (C_{L1}). Các vùng V_H và V_L có thể được chia nhỏ thêm thành các vùng siêu biến đổi, gọi là các vùng quyết định bổ cứu (CDRs), được đặt xen rải rác với các vùng bảo tồn hơn, được gọi là vùng khuôn (FR). Mỗi một V_H và V_L gồm có ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amin đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án khác của sáng chế, các FR của kháng thể kháng BCMA (hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó) có thể giống với các trình tự dòng mầm của người, hoặc có thể được cải biến theo cách tự nhiên hoặc nhân tạo. Trình tự tương đồng axit amin có thể được xác định dựa vào phân tích song song của hai hoặc nhiều CDR.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng ở đây, cũng bao gồm cả các đoạn nối kháng nguyên của các phân tử kháng thể đầy đủ. Thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, “đoạn nối kháng nguyên” của kháng thể, và tương tự, như được sử dụng ở đây, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ xuất hiện tự nhiên, có thể thu được theo phương pháp enzym, tổng hợp, hoặc biến đổi gen mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức. Các đoạn nối kháng nguyên của kháng thể

có thể thu được, ví dụ, từ các phân tử kháng thể đầy đủ sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp bất kỳ như các kỹ thuật phân giải protein hoặc công nghệ gen tái tổ hợp liên quan đến việc thao tác và biểu hiện ADN mã hóa cho các miền biến đổi và tùy ý ổn định kháng thể. ADN như vậy được biết và/hoặc dễ dàng có được từ, ví dụ, các nguồn thương mại, các thư viện ADN (bao gồm, ví dụ, các thư viện thực khuẩn thể-kháng thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN có thể được giải trình tự và được thao tác hóa học hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều miền biến đổi và/hoặc ổn định vào trong cấu hình thích hợp, hoặc để đưa vào các đơn vị mã hóa, tạo ra các gốc xystein, cải biến, bổ sung hoặc xóa các axit amin, v.v..

Ví dụ không giới hạn về các đoạn nối kháng nguyên bao gồm: (i) đoạn Fab; (ii) đoạn F(ab')₂; (iii) đoạn Fd; (iv) đoạn Fv; (v) phân tử Fv (scFv) chuỗi đơn; (vi) đoạn dAb; và (vii) đơn vị nhận biết tối thiểu bao gồm các gốc axit amin mà chúng bắt chước vùng siêu biến đổi của kháng thể (ví dụ, vùng quyết định bổ cứu phân lập (CDR) như CDR3 peptit), hoặc FR3-CDR3-FR4 peptit cường bức. Các phân tử thiết kế khác, như các kháng thể đặc hiệu miền, các kháng thể miền đơn, các kháng thể xóa miền, các kháng thể khảm, các kháng thể ghép CDR, lưỡng thể (diabody), kháng thể tam liên (triabody), kháng thể tứ liên (tetrabody), kháng thể kích thước nhỏ (minibody), kháng thể kích thước siêu nhỏ (nanobody) (ví dụ, nanobody hóa trị một, nanobody hóa trị hai, v.v.), được phẩm miễn dịch dạng modul nhỏ (small modular immunopharmaceutical - SMIPs), và các miền IgNAR biến đổi của cá mập, cũng được bao gồm trong thuật ngữ diễn đạt “đoạn nối kháng nguyên,” như được sử dụng ở đây.

Đoạn nối kháng nguyên của kháng thể điển hình sẽ bao gồm ít nhất một miền biến đổi. Miền biến đổi có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và thường sẽ bao gồm ít nhất một CDR mà nó liền kề với hoặc trong cùng khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong các đoạn nối kháng nguyên có miền V_H kết hợp với miền V_L, các miền V_H và V_L có thể có thể nằm ở vị trí tương đối với nhau theo các sắp xếp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là dime và chứa các dime V_H-V_H, V_H-V_L hoặc V_L-V_L. Theo cách khác, đoạn nối kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền monome V_H hoặc V_L.

Theo các phương án xác định, đoạn nối kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi được liên kết đồng hóa trị với ít nhất một miền ổn định. Cấu

hình minh họa không giới hạn của các miền biến đổi và ổn định mà có thể được tìm thấy bên trong đoạn nối kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm: (i) V_H-C_{H1} ; (ii) V_H-C_{H2} ; (iii) V_H-C_{H3} ; (iv) $V_H-C_{H1}-C_{H2}$; (v) $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (vi) $V_H-C_{H2}-C_{H3}$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_{H1} ; (ix) V_L-C_{H2} ; (x) V_L-C_{H3} ; (xi) $V_L-C_{H1}-C_{H2}$; (xii) $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (xiii) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$; và (xiv) V_L-C_L . Trong một cấu hình bất kỳ của các miền biến đổi và ổn định, bao gồm bất kỳ trong số các cấu hình minh họa liệt kê ở trên, các miền biến đổi và ổn định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết miền bản lề hoặc vùng liên kết toàn bộ hoặc một phần. Miền bản lề có thể bao gồm ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn) axit amin dẫn đến sự liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa các miền biến đổi và/hoặc ổn định liên kề trong một phân tử polypeptit đơn. Ngoài ra, đoạn nối kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm homo-dime hoặc hetero-dime (hoặc multime khác) có cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình miền biến đổi và miền ổn định liệt kê ở trên kết hợp theo kiểu không đồng hóa trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều miền monome V_H hoặc V_L (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfit).

Theo các phương án xác định, kháng thể kháng BCMA là kháng thể người. Thuật ngữ “kháng thể người”, như được sử dụng ở đây, dự định bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người. Các kháng thể người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc gây đột biến đặc hiệu điểm *in vitro* hoặc bằng đột biến soma *in vivo*), ví dụ trong các CDR và đặc biệt là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể người”, như được sử dụng ở đây, không dự định bao gồm các kháng thể trong đó các trình tự CDR thu được từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác, như chuột, đã được ghép lên các trình tự khung của người.

Theo một số phương án, các kháng thể có thể là kháng thể người tái tổ hợp. Thuật ngữ “kháng thể người tái tổ hợp”, như được sử dụng ở đây, dự định bao gồm tất cả các kháng thể người mà được bào chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các phương tiện tái tổ hợp, như các kháng thể được biểu hiện sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nạp vào trong tế bào chủ (được mô tả thêm dưới đây), các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người library tái tổ hợp, tổ hợp (được mô tả thêm dưới đây), các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) mà nó được

chuyển gen cho các gen globulin miễn dịch ở người (ví dụ, xem trong Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) hoặc các kháng thể được bào chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng phương tiện khác bất kỳ mà liên quan đến việc tách các trình tự gen globulin miễn dịch ở người thành các trình tự ADN khác. Kháng thể người tái tổ hợp như vậy có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người. Tuy nhiên, theo các phương án xác định, kháng thể người tái tổ hợp như vậy được cho tiến hành gây đột biến *in vitro* (hoặc, khi động vật chuyển gen cho các trình tự Ig ở người được sử dụng, sự gây đột biến soma *in vivo*) và do đó, trình tự axit amin của các vùng V_H và V_L của các kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, trong khi thu được từ và có liên quan đến các trình tự V_H và V_L dòng mầm của người, có thể không tồn tại tự nhiên bên trong danh mục dòng mầm kháng thể người *in vivo*.

Các kháng thể người có thể tồn tại ở hai dạng có liên quan với mức không tương đồng ở miền bản lề. Ở một dạng, phân tử globulin miễn dịch bao gồm cấu trúc bốn chuỗi ổn định xấp xỉ 150-160 kDa trong đó các dime được giữ với nhau bằng liên kết disulfit chuỗi nặng liên chuỗi. Ở dạng thứ hai, các dime không được liên kết thông qua các liên kết disulfit liên chuỗi và một phân tử khoảng 75-80 kDa được tạo ra bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng liên kết đồng hóa trị (nửa kháng thể). Các dạng này cực kỳ khó tách, ngay cả sau khi tinh sạch ái lực.

Tần suất xuất hiện của dạng thứ hai trong các lớp kháng thể IgG nguyên vẹn khác nhau là do, nhưng không bị giới hạn ở, những sự khác nhau về cấu trúc liên quan đến lớp kháng thể vùng bản lề của kháng thể. Sự thay thế axit amin đơn ở vùng bản lề của miền bản lề IgG4 người có thể làm giảm đáng kể sự xuất hiện của dạng thứ hai (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) tới các mức điển hình quan sát được sử dụng miền bản lề IgG1 người. Sáng chế này bao gồm các kháng thể có một hoặc nhiều đột biến ở miền bản lề, vùng C_H2 hoặc C_H3 mà có thể được mong muốn, ví dụ, trong sản xuất, để cải thiện hiệu suất của dạng kháng thể mong muốn.

Kháng thể có thể là các kháng thể phân lập. “Kháng thể phân lập,” như được sử dụng ở đây, nghĩa là kháng thể mà đã được nhận dạng và tách và/hoặc thu hồi từ ít nhất một thành phần trong môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, kháng thể mà đã được tách hoặc lấy ra từ ít nhất một thành phần của sinh vật, hoặc từ mô hoặc tế bào trong đó kháng thể tồn tại tự nhiên hoặc được tạo ra tự nhiên, là “kháng thể phân lập” cho

các mức đích của sáng chế. Kháng thể phân lập cũng bao gồm cả kháng thể tại chỗ bên trong tế bào tái tổ hợp. Kháng thể phân lập là kháng thể mà đã được cho tiến hành ít nhất một bước tinh chế hoặc phân lập. Theo các phương án xác định, kháng thể phân lập có thể hầu như không chứa các vật liệu tế bào và/hoặc chất hóa học khác.

Các kháng thể kháng BCMA được bộc lộ trong bản mô tả này có thể bao gồm một hoặc nhiều sự thay thế, thêm vào và/hoặc xóa axit amin trong các vùng khung và/hoặc vùng CDR của các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với các trình tự dòng mầm tương ứng mà các kháng thể có nguồn gốc từ đó. Các đột biến như vậy có thể được xác định dễ dàng bằng cách so sánh các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này với các trình tự dòng mầm có sẵn từ, ví dụ, các cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công khai. Sáng chế bao gồm cả các kháng thể, và các đoạn nối kháng nguyên của chúng, mà thu được từ bất kỳ trong số các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó một hoặc nhiều axit amin bên trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR được gây đột biến ở (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc từ đó, hoặc ở (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác của người, hoặc ở sự thay thế axit amin bảo toàn của (các) gốc dòng mầm tương ứng (những thay đổi về trình tự như vậy trong bản mô tả này được gọi chung là “các đột biến dòng mầm”). Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực, khởi đầu bằng các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể dễ dàng tạo ra nhiều kháng thể và đoạn nối kháng nguyên bao gồm một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng biệt hoặc tổ hợp của chúng. Theo các phương án xác định, tất cả các gốc khung và/hoặc CDR bên trong các miền V_H và/hoặc V_L được gây đột biến ngược trở lại các gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm ban đầu mà kháng thể có nguồn gốc từ đó. Theo các phương án khác, chỉ các gốc xác định được gây đột biến ngược trở lại trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ, chỉ các đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1 hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ các gốc đột biến được tìm thấy trong CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều trong số các gốc khung và/hoặc gốc CDR được gây đột biến ở (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác (tức là, trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm mà kháng thể ban đầu có nguồn gốc từ đó). Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều đột biến dòng mầm trong các vùng khung và/hoặc vùng CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng biệt

nhất định được gây đột biến ở gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm cụ thể trong khi các gốc xác định khác mà khác với trình tự dòng mầm ban đầu được giữ nguyên hoặc được gây đột biến ở gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác. Khi đã thu được, các kháng thể và đoạn nối kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể được thử nghiệm dễ dàng về một hoặc nhiều đặc tính mong muốn, như tính đặc hiệu liên kết được cải thiện, ái lực liên kết tăng, các đặc tính sinh học đối kháng hoặc chủ vận được cải thiện hoặc tăng cao (tùy theo từng trường hợp), tính sinh miễn dịch giảm, v.v.. Các kháng thể và đoạn nối kháng nguyên thu được theo phương thức chung này được bao gồm trong sáng chế.

Các kháng thể kháng BCMA có thể bao gồm các biến thể của trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ trong bản mô tả này có một hoặc nhiều thay thế bảo toàn. Ví dụ, các kháng thể kháng BCMA có thể có các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR với, ví dụ, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v.. sự thay thế axit amin bảo toàn so với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR đã nêu trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “epitope” để chỉ thể quyết định kháng nguyên mà nó tương tác với điểm liên kết kháng nguyên đặc hiệu ở vùng biến đổi của phân tử kháng thể được biết là paratope. Một kháng nguyên đơn có thể có nhiều hơn một epitope. Do vậy, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau trên kháng nguyên và có thể có các tác dụng sinh học khác nhau. Các epitope có thể ở dạng cấu hình hoặc thẳng. Epitope cấu hình được tạo ra bởi các axit amin nằm kề nhau về mặt không gian từ các đoạn khác nhau của mạch polypeptit thẳng. Epitope thẳng là một epitope được tạo ra bởi các gốc axit amin liên kề trong mạch polypeptit. Trong trường hợp xác định, epitope có thể bao gồm các gốc của sacarit, nhóm phosphoryl, hoặc nhóm sulfonyl trên kháng nguyên.

Thuật ngữ “độ đồng nhất đáng kể” hoặc “đồng nhất đáng kể,” khi đề cập đến axit nucleic hoặc đoạn của nó, chỉ ra rằng, khi được sắp thẳng tối ưu với các xen đoạn hoặc xóa đoạn nucleotit thích hợp với axit nucleic khác (hoặc sợi bổ trợ của nó), có độ đồng nhất về trình tự nucleotit ở ít nhất khoảng 95%, và tốt hơn nữa ít nhất khoảng 96%, 97%, 98% hoặc 99% các bazơ nucleotit, khi được xác định bằng giải thuật đã biết bất kỳ về độ đồng nhất trình tự, như FASTA, BLAST hoặc Gap, như được thảo luận dưới

đây. Phân tử axit nucleic có độ đồng nhất đáng kể với phân tử axit nucleic tham chiếu có thể, trong các tình huống xác định, mã hóa cho polypeptit có trình tự axit amin giống hoặc gần như tương tự như polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic tham chiếu.

Khi được áp dụng cho các polypeptit, thuật ngữ “độ tương đồng đáng kể” hoặc “tương đồng đáng kể” có nghĩa là, hai trình tự peptit, khi được sắp thẳng tối ưu, như bằng các chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng các chỉ số gap mặc định (default gap weights), có chung ít nhất 95% độ đồng nhất trình tự, thậm chí tốt hơn nữa ít nhất 98% hoặc 99% độ đồng nhất trình tự. Tốt hơn, các vị trí gốc mà không đồng nhất sẽ khác nhau bởi các thay thế axit amin bảo toàn. “Sự thay thế axit amin bảo toàn” là sự thay thế trong đó một gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin khác có chuỗi bên (nhóm R) với các tính chất hóa học tương tự (ví dụ, tích điện hoặc tính kỵ nước). Nói chung, sự thay thế axit amin bảo toàn sẽ không làm thay đổi đáng kể đặc tính chức năng của protein. Trong trường hợp mà hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi các thay thế bảo toàn, tỷ lệ % đồng nhất trình tự hoặc mức độ tương đồng có thể được điều chỉnh theo hướng tăng để hiệu chỉnh bản chất bảo toàn của sự thay thế. Các phương tiện để tiến hành sự điều chỉnh này là đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, xem trong tài liệu của Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, được kết hợp trong bản mô tả này bằng cách tham khảo. Ví dụ về các nhóm axit amin mà có các chuỗi bên có các tính chất hóa học tương tự bao gồm (1) các chuỗi bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) các chuỗi bên hydroxyl béo: serin và threonin; (3) các chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; (4) các chuỗi bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) các chuỗi bên kiềm: lysin, arginin, và histidin; (6) các chuỗi bên axit: aspartat và glutamat, và (7) các chuỗi bên chứa lưu huỳnh là xystein và methionin. Các nhóm thay thế axit amin bảo toàn được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Theo cách khác, sự thay thế bảo toàn là bất kỳ sự thay đổi nào mà có giá trị dương trong ma trận khả năng log PAM250 được bộc lộ trong tài liệu của Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445, được kết hợp trong bản mô tả này bằng cách tham khảo. Sự thay thế “bảo toàn vừa phải” là bất kỳ sự thay đổi nào có giá trị không phải giá trị âm trong ma trận khả năng log PAM250.

Độ tương đồng trình tự đối với các polypeptit, mà còn được đề cập là độ đồng nhất trình tự, điển hình được xác định sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein phối chọn thích ứng các trình tự tương đồng sử dụng các số đo về độ tương đồng được ấn định cho các thay thế, mất đoạn khác nhau và các cải biến khác, bao gồm các thay thế axit amin bảo toàn. Ví dụ, phần mềm GCG chứa các chương trình như Gap và Bestfit mà có thể được sử dụng với các thông số ngầm định để xác định độ tương đồng trình tự hoặc độ đồng nhất trình tự giữa các polypeptit có quan hệ gần gũi, như các polypeptit tương đồng từ các loài khác nhau của các sinh vật hoặc giữa protein kiểu dại và protein đột biến của nó. Ví dụ, xem trong GCG Version 6.1. Các trình tự polypeptit cũng có thể được so sánh sử dụng FASTA sử dụng các thông số hằng định hoặc khuyến cáo, chương trình trong GCG Version 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) cung cấp sự sắp thẳng hàng và tỷ lệ % đồng nhất trình tự của các vùng gối lên nhau thích hợp nhất giữa các trình tự truy vấn và tìm kiếm (Pearson (2000) *supra*). Giải thuật được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa số lượng lớn trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình vi tính BLAST, nhất là BLASTP hoặc TBLASTN, sử dụng các thông số ngầm định. Ví dụ, xem trong tài liệu của Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 và Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, mỗi một tài liệu nêu trên được kết hợp trong bản mô tả này bằng cách tham khảo.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “axit nucleic” hoặc “polynucleotit” để chỉ các nucleotit và/hoặc polynucleotit, như axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc axit ribonucleic (ARN), oligonucleotit, các đoạn được tạo ra bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), và các đoạn được tạo ra bằng hoạt động bất kỳ trong số các hoạt động thắt, phân cắt, hoạt động của men endonucleaza và hoạt động của men exonucleaza. Các phân tử axit nucleic có thể bao gồm các monome mà là các nucleotit xuất hiện tự nhiên (như ADN và ARN), hoặc các chất tương tự của các nucleotit xuất hiện tự nhiên (ví dụ, dạng đối hình của các nucleotit xuất hiện tự nhiên), hoặc tổ hợp của cả hai. Các nucleotit cải biến có thể có thay đổi ở các gốc đường và/hoặc ở các gốc bazơ pyrimidin hoặc purin. Những sự cải biến gốc đường bao gồm, ví dụ, sự thay thế một hoặc nhiều nhóm hydroxyl bằng các halogen, nhóm alkyl, các nhóm amin, và azido, hoặc các gốc đường có thể có chức năng ở dạng các ete hoặc este. Ngoài ra, toàn bộ gốc đường có thể được thay thế bằng các cấu trúc tương tự về mặt không gian

và điện tử, như các chất tương tự aza-đường và đường cacbon vòng. Ví dụ về các cải biến ở gốc bazơ bao gồm các purin và pyrimidin được alkyl hóa, các purin hoặc pyrimidin được axyl hóa, hoặc các chất thay thế dị vòng đã biết khác. Các monome axit nucleic có thể được liên kết bằng các liên kết phosphodiester hoặc các liên kết tương tự thuộc liên kết này. Các axit nucleic có thể ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép.

Thuật ngữ “thụ thể kháng nguyên khảm” (CAR) để chỉ các phân tử mà chúng kết hợp miền liên kết đối với thành phần có mặt trên tế bào đích, ví dụ tính đặc hiệu dựa vào kháng thể của kháng nguyên mong muốn (ví dụ, kháng nguyên khối u, như BCMA) với miền nội bào kích hoạt thụ thể tế bào T để tạo ra protein khảm mà nó thể hiện hoạt tính miễn dịch kháng tế bào đích đặc hiệu. Thông thường, các CAR gồm có miền liên kết kháng thể mạch đơn ngoại bào (scFv) được dung hợp với miền tín hiệu nội bào của phức thụ thể kháng nguyên tế bào T mạch zeta, và có khả năng, khi được biểu hiện trong các tế bào T, để chuyển hướng sự nhận dạng kháng nguyên dựa vào tính đặc hiệu của kháng thể đơn dòng.

Thuật ngữ “vector,” như được sử dụng ở đây, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vectơ virus, plasmid, vectơ ARN hoặc phân tử ADN hoặc ARN thẳng hoặc hình tròn mà nó có thể bao gồm các axit nucleic nhiễm sắc thể, không phải nhiễm sắc thể, bản tổng hợp hoặc tổng hợp. Trong một số trường hợp, vectơ là các vectơ có khả năng sao chép tự động (vectơ episom) và/hoặc biểu hiện các axit nucleic mà các vectơ này được liên kết với chúng (vectơ biểu hiện). Rất nhiều vectơ thích hợp đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực và có sẵn trên thị trường. Vectơ virus bao gồm retrovirus, adenovirus, parvovirus (ví dụ, virus kết hợp adeno), coronavirus, các virus ARN sợi âm như orthomyxovirus (ví dụ, virus influenza), rhabdovirus (ví dụ, virus gây bệnh dại và virus gây viêm miệng mụn nước), paramyxovirus (ví dụ, sởi và Sendai), các virus ARN sợi dương như picornavirus và alphavirus, và các virus ADN sợi kép bao gồm adenovirus, herpesvirus (ví dụ, virus Herpes Simplex type 1 và 2, virus Epstein-Barr, virus cự bào), và poxvirus (ví dụ, gây bệnh đậu bò, bệnh đậu gia cầm và gây bệnh đầu hoàng yến). Các virus khác bao gồm virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus, và virus viêm gan chẳng hạn. Ví dụ về retrovirus bao gồm: virus gây bệnh bạch cầu - sarcoma ở gia cầm, các virus type C, type B ở động vật có vú, virus type D, nhóm HTLV-BLV, và lentivirus.

“Miền đồng kích thích” hoặc “phân tử đồng kích thích” để chỉ đối tác liên kết cùng nguồn gốc trên tế bào T mà nó liên kết đặc hiệu với phối tử đồng kích thích, bằng cách đó trung gian cho đáp ứng đồng kích thích bởi tế bào, như nhưng không bị giới hạn ở đáp ứng tăng sinh. Các phân tử đồng kích thích bao gồm, không bị giới hạn ở, phân tử MHC loại I, thụ thể phối tử BTLA và Toll. Ví dụ về các phân tử đồng kích thích bao gồm CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137) (SEQ ID NO: 99), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, kháng nguyên kết hợp chức năng lymphô bào-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 và phối tử mà liên kết đặc hiệu với CD83 và tương tự. Phân tử đồng kích thích là phân tử trên bề mặt tế bào khác với thụ thể kháng nguyên hoặc các phối tử của chúng cần thiết cho đáp ứng miễn dịch hiệu quả.

“Phối tử đồng kích thích” để chỉ phân tử trên tế bào trình diện kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu phân tử đồng kích thích cùng nguồn gốc trên tế bào T, bằng cách đó cung cấp tín hiệu mà, ngoài tín hiệu chính được cung cấp bởi, ví dụ, sự liên kết của phức TCR/CD3 với phân tử MHC tải nạp với peptit, trung gian cho đáp ứng tế bào T, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, kích hoạt đáp ứng tăng sinh, biệt hóa và tương tự. Phối tử đồng kích thích có thể bao gồm nhưng không bị giới hạn ở CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, phối tử đồng kích thích cảm ứng (ICOS-L), phân tử kết dính giữa các tế bào (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, thụ thể lymphotoxin beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, chất chủ vận hoặc kháng thể mà nó liên kết thụ thể phối tử Toll và phối tử mà nó liên kết đặc hiệu với B7-H3.

“Tín hiệu đồng kích thích” đề cập đến tín hiệu, mà kết hợp với tín hiệu chính, như tín hiệu gắn TCR/CD3, dẫn tới đáp ứng tăng sinh tế bào T và/hoặc điều chỉnh theo hướng tăng hoặc điều chỉnh theo hướng giảm của các phân tử chính.

Thuật ngữ “miền liên kết phối tử ngoại bào,” như được sử dụng ở đây, đề cập đến oligo- hoặc polypeptit mà có khả năng liên kết phối tử, ví dụ, phân tử trên bề mặt tế bào. Ví dụ, miền liên kết phối tử ngoại bào có thể được chọn để nhận dạng phối tử mà nó tác động như là dấu ấn bề mặt tế bào ở các tế bào đích liên quan với một tình trạng bệnh cụ thể (ví dụ, ung thư). Ví dụ về dấu ấn bề mặt tế bào mà có thể tác động như các phối tử bao gồm các dấu ấn bề mặt tế bào liên quan đến các bệnh nhiễm trùng do virus, vi khuẩn và ký sinh trùng, bệnh tự miễn và các tế bào ung thư.

Thuật ngữ “đối tượng” hoặc “đối tượng bị bệnh” như được sử dụng ở đây bao gồm tất cả các thành viên của thế giới động vật bao gồm cả các động vật linh trưởng không phải người và con người. Theo một phương án, đối tượng bị bệnh là người bị ung thư (ví dụ, bệnh đa u tủy xương).

“Miền truyền tín hiệu” hoặc “miền tín hiệu” của CAR, như được sử dụng ở đây, chịu trách nhiệm về sự truyền tín hiệu nội bào sau khi liên kết miền liên kết phối tử ngoại bào với đích dẫn đến sự kích hoạt tế bào miễn dịch và đáp ứng miễn dịch. Nói cách khác, miền truyền tín hiệu chịu trách nhiệm về sự kích hoạt ít nhất một trong số các chức năng tác động bình thường của tế bào miễn dịch mà CAR được biểu hiện trong đó. Ví dụ, chức năng tác động của tế bào T có thể là hoạt tính hủy tế bào hoặc hoạt tính trợ giúp bao gồm cả sự tiết các xytokin. Do vậy, thuật ngữ “miền truyền tín hiệu” đề cập đến phần protein mà phần này truyền tín hiệu chức năng tác động và hướng tế bào vào việc thực hiện chức năng chuyên biệt. Ví dụ về các miền truyền tín hiệu để sử dụng trong CAR có thể là các trình tự tế bào chất của thụ thể tế bào T và các đồng thụ thể mà chúng tác động phối hợp để khởi phát sự truyền tín hiệu sau khi tiếp hợp thụ thể kháng nguyên, cũng như dẫn xuất hoặc biến thể bất kỳ của các trình tự này và trình tự tổng hợp bất kỳ mà có cùng khả năng chức năng. Trong một số trường hợp, các miền tín hiệu bao gồm hai nhóm trình tự truyền tín hiệu tế bào chất riêng biệt, nhóm khởi phát sự kích hoạt chính phụ thuộc kháng nguyên, và nhóm tác động theo cách không phụ thuộc kháng nguyên để tạo ra tín hiệu thứ cấp hoặc tín hiệu đồng kích thích. Các trình tự truyền tín hiệu tế bào chất chính có thể bao gồm các motif truyền tín hiệu mà chúng được biết là các motif kích hoạt dựa vào tyrosin thụ thể miễn dịch ITAM. Các ITAM xác định rõ các motif truyền tín hiệu tìm thấy trong đuôi nội bào chất của nhiều thụ thể mà chúng dùng làm các điểm liên kết của các tyrosin kinaza loại syk/zap70. Các ITAM minh họa bao gồm các loại thu được từ TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, FcRepsilon, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b và CD66d. Theo một số phương án, miền truyền tín hiệu của CAR có thể bao gồm miền tín hiệu CD3zeta (SEQ ID NO: 100).

Các thụ thể kháng nguyên khảm (CAR)

Các thụ thể kháng nguyên khảm (CAR) làm chuyển hướng tính đặc hiệu tế bào T về phía các kháng nguyên nhận dạng bởi kháng thể được biểu hiện trên bề mặt của tế

bào (ví dụ, tế bào ung thư), trong khi các thụ thể tế bào T (TCR) mở rộng phạm vi các đích bao gồm cả kháng nguyên nội bào (ví dụ, kháng nguyên khối u).

Một khía cạnh theo sáng chế đề cập đến thụ thể kháng nguyên khảm (CAR) mà nó đặc hiệu đối với kháng nguyên trưởng thành tế bào B (BCMA) được biểu hiện trên bề mặt của các tương bào ác tính. Theo một phương án theo sáng chế, CAR như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm miền liên kết đặc hiệu đích ngoại bào, miền xuyên màng, miền tín hiệu nội bào (như miền tín hiệu thu được từ CD3zeta hoặc FcRgamma), và/hoặc một hoặc nhiều các miền tín hiệu đồng kích thích thu được từ phân tử đồng kích thích, như, nhưng không bị giới hạn ở, 4-1BB. Theo một phương án, CAR bao gồm cả miền bản lề hoặc vùng đệm giữa miền liên kết ngoại bào và miền xuyên màng, như miền bản lề CD8alpha.

Miền liên kết hoặc miền ngoại bào của CAR cung cấp CAR có khả năng liên kết với kháng nguyên đích mong muốn. Miền liên kết (ví dụ, miền liên kết phối tử hoặc miền liên kết kháng nguyên) có thể là protein, polypeptit, oligopeptit, hoặc peptit bất kỳ mà có khả năng nhận diện theo cách đặc hiệu và liên kết với phân tử sinh học (ví dụ, thụ thể bề mặt tế bào hoặc protein khối u, hoặc thành phần của nó). Miền liên kết bao gồm cả đối tác liên kết bất kỳ được tạo ra theo kiểu tự nhiên, tổng hợp, bán tổng hợp, hoặc tái tổ hợp của phân tử sinh học mong muốn. Ví dụ, và như được mô tả thêm trong bản mô tả này, miền liên kết có thể là các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể, hoặc các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể được nối với nhau theo một mạch đơn và theo định hướng (ví dụ, VL-VH hoặc VH-VL). Nhiều thử nghiệm đã biết để xác định các miền liên kết theo sáng chế mà liên kết đặc hiệu với một đích cụ thể, bao gồm thử nghiệm thấm tách Western, ELISA, đếm tế bào theo dòng chảy, hoặc phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, sử dụng phân tích BIACORE). Đích có thể là kháng nguyên mong muốn trên lâm sàng mà tốt hơn sẽ khởi phát đáp ứng miễn dịch tác động trên đích này dẫn đến sự tiêu diệt khối u. Theo một phương án, kháng nguyên đích của miền liên kết của thụ thể kháng nguyên khảm là protein BCMA trên bề mặt của tế bào khối u, đặc biệt là các tế bào khối u thuộc dòng tế bào B, như các tế bào đa u tủy xương.

Các miền liên kết phối tử minh họa bao gồm các protein liên kết kháng nguyên, như các đoạn nối kháng nguyên của kháng thể, như scFv, scTCR, miền ngoại bào của các thụ thể, phối tử của các phân tử/thụ thể bề mặt tế bào, hoặc thụ thể miền liên kết

của chúng, và protein liên kết khối u. Theo các phương án xác định, các miền liên kết kháng nguyên được bao gồm trong CAR theo sáng chế có thể là vùng biến đổi (Fv), CDR, Fab, scFv, VH, VL, biến thể kháng thể miền (dAb), kháng thể họ lạc đà (VHH), biến thể miền fibronectin 3, biến thể lặp lại ankyrin và miền liên kết đặc hiệu kháng nguyên khác thu được từ các khung protein khác.

Theo một phương án, miền liên kết của CAR là kháng thể mạch đơn kháng BCMA (scFv), và có thể là scFv của chuột, người hoặc được làm giống như của người. Các kháng thể mạch đơn có thể được tách dòng từ các gen vùng V của khối tế bào lai đặc hiệu với đích mong muốn. Một kỹ thuật mà có thể được sử dụng để tách dòng vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) đã được mô tả, ví dụ, trong tài liệu của Orlandi *et al.*, *PNAS*, 1989; 86: 3833-3837. Do vậy, theo các phương án xác định, miền liên kết bao gồm miền liên kết có nguồn gốc từ kháng thể nhưng có thể là miền liên kết không có nguồn gốc từ kháng thể. Miền liên kết có nguồn gốc từ kháng thể có thể là đoạn của kháng thể hoặc sản phẩm biến đổi gen của một hoặc nhiều đoạn của kháng thể, đoạn này có liên quan đến việc liên kết với kháng nguyên.

Theo các phương án xác định, CAR theo sáng chế có thể bao gồm đoạn nối giữa các miền khác nhau, được bổ sung cho việc giãn cách và cấu hình thích hợp của phân tử. Ví dụ, theo một phương án, có thể có đoạn nối giữa miền liên kết VH hoặc VL mà đoạn này có độ dài khoảng từ 1 đến 10 axit amin. Theo các phương án khác, đoạn nối giữa miền bất kỳ trong số các miền của thụ thể kháng nguyên khảm có thể có độ dài khoảng từ 1 đến 20 hoặc 20 axit amin. Theo khía cạnh này, đoạn nối có thể có độ dài 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 axit amin. Theo các phương án khác, đoạn nối có thể có độ dài 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 hoặc 30 axit amin. Các khoảng bao gồm số lượng nhiều hơn được mô tả trong bản mô tả này cũng được bao gồm, ví dụ, đoạn nối có độ dài 10-30 axit amin.

Theo các phương án xác định, các đoạn nối thích hợp để sử dụng trong CAR mô tả trong bản mô tả này là các đoạn nối linh hoạt. Các đoạn nối thích hợp có thể được chọn dễ dàng và có thể có độ dài thích hợp bất kỳ trong số các độ dài khác nhau, như từ 1 axit amin (ví dụ, Gly) đến 20 axit amin, từ 2 axit amin đến 15 axit amin, từ 3 axit amin đến 12 axit amin, bao gồm từ 4 axit amin đến 10 axit amin, từ 5 axit amin đến 9 axit amin, từ 6 axit amin đến 8 axit amin, hoặc từ 7 axit amin đến 8 axit amin, và có thể là 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7 axit amin.

Các đoạn nối linh hoạt minh họa bao gồm các polyme glyxin (G)_n, các polyme glyxin-serin, trong đó n là số nguyên ít nhất bằng một, các polyme glyxin-alanin, các polyme alanin-serin, và các đoạn nối linh hoạt khác đã biết trong lĩnh vực. Các polyme glyxin và glyxin-serin là không được cấu trúc tương đối, và do đó, có thể có khả năng dùng làm dây nối trung tính giữa các miền của protein dung hợp như CAR mô tả trong bản mô tả này. Glyxin tiếp cận không gian phi-psi đáng kể hơn ngay cả alanin, và bị giới hạn ít hơn nhiều so với các gốc có các chuỗi bên dài hơn (xem trong Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng, việc thiết kế CAR có thể bao gồm các đoạn nối mà hoàn toàn hoặc một phần linh hoạt, sao cho đoạn nối có thể bao gồm đoạn nối linh hoạt cũng như một hoặc nhiều phần mà truyền cấu trúc ít linh hoạt để tạo ra cấu trúc CAR mong muốn. Các đoạn nối đặc trưng bao gồm các đoạn nối (G4S)_n, trong đó n=1-3, như được thể hiện trong các trình tự SEQ ID NO: 95-97, cũng như đoạn nối được thể hiện trong SEQ ID NO: 96.

Miền liên kết của CAR có thể được tiếp theo bởi “miền đệm” hoặc “miền bản lề” mà để chỉ vùng làm dịch chuyển miền liên kết kháng nguyên ra xa khỏi bề mặt tế bào tác động để cho phép tế bào/tiếp xúc tế bào, liên kết kháng nguyên và sự kích hoạt tế bào thích hợp (Patel *et al.*, *Gene Therapy*, 1999; 6: 412-419). Miền bản lề trong CAR điển hình nằm giữa miền xuyên màng (TM) và miền liên kết. Theo các phương án xác định, miền bản lề là vùng bản lề globulin miễn dịch và có thể là vùng bản lề globulin miễn dịch kiểu đại hoặc vùng bản lề globulin miễn dịch kiểu đại biến đổi. Các vùng bản lề minh họa khác sử dụng trong các CAR mô tả trong bản mô tả này bao gồm vùng bản lề thu được từ các vùng ngoại bào của các protein màng type 1 như CD8alpha, CD4, CD28 và CD7, đây là các vùng bản lề kiểu đại từ các phân tử này hoặc có thể được thay đổi. Theo một phương án, vùng bản lề bao gồm vùng bản lề CD8alpha (SEQ ID NO: 97).

Vùng hoặc miền “xuyên màng” là phần của CAR mà neo giữ phần liên kết ngoại bào với màng sinh chất của tế bào gây miễn dịch, và tạo thuận lợi cho sự liên kết của miền liên kết với kháng nguyên đích. Miền xuyên màng có thể là miền xuyên màng CD3zeta, tuy nhiên các miền xuyên màng khác mà có thể được sử dụng bao gồm các miền xuyên màng thu được từ CD8alpha, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, và CD154. Theo một phương án, miền

xuyên màng là miền xuyên màng của CD137. Theo một số phương án, miền xuyên màng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 98. Theo các phương án xác định, miền xuyên màng là tổng hợp mà sẽ chủ yếu bao gồm các gốc kỵ nước trong trường hợp này như leuxin và valin.

“Miền tín hiệu nội bào” hoặc “miền tín hiệu” đề cập đến phần của protein thụ thể kháng nguyên khảm mà tham gia vào việc truyền thông tin của sự liên kết CAR hiệu quả với kháng nguyên đích vào bên trong của tế bào gây miễn dịch để gây ra chức năng tế bào tác động, ví dụ, kích hoạt, sản xuất xytokin, đáp ứng tăng sinh và hoạt tính gây độc tế bào, bao gồm cả việc giải phóng các yếu tố gây độc tế bào vào tế bào đích gắn kết CAR, hoặc các đáp ứng tế bào khác gây ra bởi sự liên kết kháng nguyên với miền CAR ngoại bào. Thuật ngữ “chức năng tác động” đề cập đến chức năng chuyên biệt của tế bào. Chức năng tác động của tế bào T, ví dụ, có thể là hoạt tính hủy tế bào hoặc hoạt tính hỗ trợ hoặc hoạt tính bao gồm cả sự tiết xytokin. Do đó, thuật ngữ “miền tín hiệu nội bào” hoặc “miền tín hiệu,” ở đây có thể được sử dụng thay đổi lẫn nhau, để chỉ phần của protein mà nó truyền tín hiệu chức năng tác động và nó hướng tế bào vào thực hiện chức năng chuyên biệt. Trong khi thông thường thì miền tín hiệu nội bào đầy đủ có thể được sử dụng, trong nhiều trường hợp, không nhất thiết cần sử dụng miền đầy đủ. Trong chừng mực mà phần cắt cụt của miền tín hiệu nội bào được sử dụng, phần cắt cụt như vậy có thể được sử dụng thay cho miền đầy đủ miễn là nó truyền tín hiệu chức năng tác động. Thuật ngữ miền tín hiệu nội bào dự định bao gồm phần cắt cụt bất kỳ của miền tín hiệu nội bào đủ để truyền tín hiệu chức năng tác động. Miền tín hiệu nội bào còn được biết là “miền truyền tín hiệu” và điển hình thu được từ các phần của các mạch CD3 hoặc FcRγ của người.

Đã biết rằng, các tín hiệu được sinh ra thông qua duy nhất thụ thể tế bào T không đủ cho sự kích hoạt đầy đủ của tế bào T và tín hiệu thứ cấp hoặc tín hiệu đồng kích thích cũng cần thiết. Do vậy, sự kích hoạt tế bào T có thể được cho là được trung gian bởi hai loại trình tự truyền tín hiệu tế bào chất riêng biệt: một loại khởi phát sự kích hoạt sơ cấp phụ thuộc kháng nguyên thông qua thụ thể tế bào T (các trình tự truyền tín hiệu tế bào chất sơ cấp) và một loại tác động theo cách không phụ thuộc kháng nguyên để tạo ra tín hiệu thứ cấp hoặc tín hiệu đồng kích thích (các trình tự truyền tín hiệu tế bào chất thứ cấp). Các trình tự truyền tín hiệu tế bào chất mà tác động theo cách đồng kích thích có thể chứa các motip truyền tín hiệu đã biết là motip kích hoạt dựa vào

tyrosin thụ thể miễn dịch hoặc ITAM.

Ví dụ về ITAM chứa các trình tự truyền tín hiệu tế bào chất sơ cấp mà nó được sử dụng đặc biệt trong sáng chế bao gồm các loại thu được từ TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b và CD66d. Theo một phương án cụ thể, miền tín hiệu nội bào của các CAR kháng BCMA mô tả trong bản mô tả này thu được từ CD3zeta. Theo một số phương án, miền tín hiệu bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 100.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “miền tín hiệu đồng kích thích” hoặc “miền đồng kích thích” để chỉ phần của CAR bao gồm miền nội bào của phân tử đồng kích thích. Các phân tử đồng kích thích là các phân tử bề mặt tế bào khác với các thụ thể kháng nguyên hoặc các thụ thể Fc mà tạo ra tín hiệu thứ cấp cần thiết cho sự kích hoạt hiệu quả và chức năng của các lymphô bào T khi liên kết với kháng nguyên. Ví dụ về các phân tử đồng kích thích như vậy bao gồm CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, B7-H2 và phối tử mà nó liên kết đặc hiệu CD83. Do đó, trong khi sáng chế cung cấp các miền đồng kích thích minh họa thu được từ CD3zeta và 4-1BB, các miền đồng kích thích khác được dự định để sử dụng với các CAR mô tả trong bản mô tả này. Việc bao gồm một hoặc nhiều miền tín hiệu đồng kích thích có thể tăng cường hiệu quả và sự nhân rộng tế bào T biểu hiện các thụ thể CAR. Các miền tín hiệu nội bào và miền tín hiệu đồng kích thích có thể được liên kết theo thứ tự song song bất kỳ với đầu tận cùng carboxyl của miền xuyên màng. Theo một số phương án, miền đồng kích thích bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 99.

Mặc dù các CAR dựa vào scFv được thiết kế chứa miền tín hiệu từ CD3 hoặc FcRgamma đã được chứng minh là phân phối tín hiệu mạnh của chức năng kích hoạt và tác động tế bào T, nhưng chúng vẫn không đủ để gây ra các tín hiệu tăng cường sự sống sót và mở rộng tế bào T khi không có mặt của tín hiệu đồng kích thích kèm theo. Các CAR khác chứa miền liên kết, miền bản lề, miền xuyên màng và miền tín hiệu có nguồn gốc từ CD3zeta hoặc FcRgamma cùng với một hoặc nhiều miền tín hiệu đồng kích thích (ví dụ, miền đồng kích thích nội bào có nguồn gốc từ CD28, CD137, CD134 và CD278) có thể điều hướng hiệu quả hơn vào hoạt tính chống khối u cũng như tăng tiết cytokin, hoạt tính phân hủy, sự sống sót và đáp ứng tăng sinh trong các tế bào T biểu hiện CAR *in vitro*, và trong các mẫu động vật và bệnh nhân ung thư

(Milone *et al.*, *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong *et al.*, *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito *et al.*, *PNAS*, 2009; 106:3360-3365).

Theo các phương án khác nhau, CAR BCMA theo sáng chế bao gồm (a) scFv kháng BCMA làm miền liên kết (ví dụ, scFv có các vùng liên kết (ví dụ, các CDR hoặc các miền biến đổi) từ bất kỳ một hoặc nhiều kháng thể BCMA xác định trong bảng 1) (b) miền bản lề có nguồn gốc từ CD8alpha người, (c) miền xuyên màng CD8alpha người, và (d) miền tín hiệu nội bào mạch CD3 zeta (CD3) thụ thể tế bào T người, và tùy ý một hoặc nhiều miền tín hiệu đồng kích thích, ví dụ, 4-1BB. Theo một phương án, các miền protein khác nhau được sắp xếp từ đầu tận cùng amin đến đầu tận cùng carboxyl theo thứ tự sau: miền liên kết, miền bản lề và miền xuyên màng. Miền tín hiệu nội bào và các miền tín hiệu đồng kích thích tùy ý được liên kết với đầu tận cùng carboxy xuyên màng theo thứ tự song song bất kỳ để tạo ra polypeptit khảm mạch đơn. Theo một phương án, cấu trúc axit nucleic mã hóa cho CAR BCMA là phân tử axit nucleic khảm bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm các trình tự mã hóa khác nhau, ví dụ, (5' đến 3'), các trình tự mã hóa của scFv kháng BCMA người, miền bản lề - CD8alpha người, miền xuyên màng CD8alpha người và miền tín hiệu nội bào CD3zeta. Theo phương án khác, cấu trúc axit nucleic mã hóa cho CAR BCMA là phân tử axit nucleic khảm bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm các trình tự mã hóa khác nhau, ví dụ, (5' đến 3'), các trình tự mã hóa của scFv kháng BCMA người, miền bản lề - CD8alpha người, miền xuyên màng CD8alpha người, miền đồng kích thích 4-1BB, và miền đồng kích thích CD3zeta.

Theo các phương án xác định, polynucleotit mã hóa cho CAR mô tả trong bản mô tả này được đưa vào trong vector. Vector là thể mang mà polynucleotit mã hóa cho protein có thể được đưa vào trong đó theo kiểu đồng hóa trị sao cho dẫn đến sự biểu hiện của protein đó và/hoặc sự tách dòng của polynucleotit. Các vector như vậy có thể được gọi là “vector biểu hiện”. Polynucleotit phân lập có thể được đưa vào trong vector sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, nhưng không giới hạn, vector có thể được phân cắt sử dụng các enzym giới hạn thích hợp và sau đó, có thể được thất bằng polynucleotit phân lập có các đầu giới hạn tương hợp. Vector biểu hiện có khả năng sắp hợp và biểu hiện các trình tự axit nucleic khác loại hoặc cải biến mã hóa cho ít nhất phần sản phẩm gen có khả năng được phiên mã trong tế bào. Trong hầu hết các trường hợp, các phân tử ARN sau đó được dịch mã thành protein. Vector

biểu hiện có thể chứa nhiều trình tự điều khiển, các trình tự này để chỉ các trình tự axit nucleic cần thiết cho sự phiên mã và sự dịch mã có thể của trình tự mã hóa liên kết theo kiểu hoạt động được trong sinh vật chủ cụ thể. Ngoài các trình tự điều khiển quản lý sự phiên mã và dịch mã, các vector và vector biểu hiện có thể cũng chứa các trình tự axit nucleic đóng vai trò các chức năng khác và được thảo luận dưới đây. Vector biểu hiện có thể bao gồm các yếu tố bổ sung, ví dụ, vector biểu hiện có thể có hai hệ sao chép, do vậy cho phép nó được duy trì ở hai sinh vật, ví dụ ở tế bào người để biểu hiện và ở vật chủ không có nhân điển hình để tách dòng và khuếch đại.

Vector biểu hiện có thể có các yếu tố điều hòa đầu 5' thượng dòng và đầu 3' hạ dòng cần thiết như các trình tự khởi đầu phiên mã như CMV, PGK và EF1alpha, các trình tự khởi đầu phiên mã, nhận biết ribosome và hộp liên kết TATA, và trình tự kết thúc phiên mã 3' UTR AAUAAA để phiên mã và dịch mã gen hiệu quả trong các tế bào chủ tương ứng của nó. Các trình tự khởi đầu phiên mã thích hợp khác bao gồm trình tự khởi đầu phiên mã cơ định của trình tự khởi đầu phiên mã sớm virus khi 40 (SV40), virus gây khối u tuyến vú ở chuột (MMTV), trình tự khởi đầu phiên mã HIV LTR, trình tự khởi đầu phiên mã MoMuLV, trình tự khởi đầu phiên mã virus gây bệnh bạch cầu gia cầm, trình tự khởi đầu phiên mã sớm EBV, và trình tự khởi đầu phiên mã virus sarcoma rous. Các trình tự khởi đầu phiên mã gen người cũng có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở trình tự khởi đầu phiên mã actin, trình tự khởi đầu phiên mã myosin, trình tự khởi đầu phiên mã hemoglobin, và trình tự khởi đầu phiên mã creatin kinaza. Theo các phương án xác định, các trình tự khởi đầu phiên mã cảm ứng cũng được dự định như một phần của các vector biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm. Điều này cung cấp yếu tố chuyển đổi phân tử có khả năng bật mở sự biểu hiện của trình tự polynucleotit mong muốn hoặc khóa tắt sự biểu hiện. Ví dụ về các trình tự khởi đầu phiên mã cảm ứng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, trình tự khởi đầu phiên mã metallothionine, trình tự khởi đầu phiên mã glucocorticoid, trình tự khởi đầu phiên mã progesteron, hoặc trình tự khởi đầu phiên mã tetracyclin.

Vector biểu hiện có thể có trình tự bổ sung như các thẻ 6x-histidin, c-Myc, và FLAG mà các thẻ này được sáp nhập vào trong các CAR được biểu hiện. Do vậy, vector biểu hiện có thể được thiết kế để chứa các trình tự điều hòa không được dịch mã đầu 5' và 3' mà đôi khi có thể có chức năng như là các trình tự tăng cường, các vùng trình tự khởi đầu phiên mã và/hoặc trình tự kết thúc mà có thể tạo thuận lợi hoặc tăng cường

sự phiên mã hiệu quả của (các) axit nucleic mong muốn được mang trên vector biểu hiện. Vector biểu hiện có thể cũng được thiết kế để có chức năng sao chép và/hoặc biểu hiện (ví dụ, phiên mã và dịch mã) trong một loại tế bào, vị trí tế bào hoặc một kiểu mô cụ thể. Vector biểu hiện có thể bao gồm trình tự có thể lựa chọn để duy trì vector trong tế bào chủ hoặc tế bào tiếp nhận.

Theo các phương án khác nhau, vector là plasmid, trình tự sao chép tự động, và yếu tố chuyển vị. Các vector minh họa bổ sung bao gồm, không giới hạn, plasmid, phagemid, cosmid, các nhiễm sắc thể nhân tạo như nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC), nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn (BAC), hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo có nguồn gốc từ P1 (PAC), các thực khuẩn thể như thực khuẩn thể lambda hoặc thực khuẩn thể M13, và các virus động vật. Ví dụ về các loại virus động vật hữu dùng làm vector bao gồm, không giới hạn, retrovirus (bao gồm lentivirus), adenovirus, virus kết hợp adeno, herpesvirus (ví dụ, virus gây bệnh herpes), poxvirus, baculovirus, papillomavirus, và papovavirus (ví dụ, SV40). Ví dụ về các vector biểu hiện là các vector hệ biểu hiện Lenti-XTM Bicistronic (Neo) (Clontech), vector pCneo (Promega) để biểu hiện trong các tế bào động vật có vú; pLenti4/V5-DEST.TM., pLenti6/V5-DEST.TM., và pLenti6.2N5-GW/lacZ (Invitrogen) để chuyển gen qua trung gian lentivirus và để biểu hiện trong các tế bào động vật có vú. Các trình tự mã hóa của CAR được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được gắn vào trong các vector biểu hiện như vậy để biểu hiện protein khảm trong các tế bào động vật có vú.

Theo các phương án xác định, các axit nucleic mã hóa cho CAR theo sáng chế được cung cấp trong vector virus. Vector virus có thể là vector có nguồn gốc từ retrovirus, lentivirus, hoặc virus tạo bọt. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector virus,” đề cập đến cấu trúc vector axit nucleic bao gồm ít nhất một phần tử có nguồn gốc virus và có khả năng được bao gói vào trong hạt vector virus. Vector virus có thể chứa trình tự mã hóa của các protein khảm khác nhau được mô tả trong bản mô tả này thay cho các gen virus không thiết yếu. Vector và/hoặc hạt có thể được sử dụng cho mục đích truyền ADN, ARN hoặc các axit nucleic khác vào trong tế bào *in vitro* hoặc *in vivo*. Nhiều dạng vector virus đã biết trong lĩnh vực.

Theo các phương án xác định, vector virus chứa trình tự mã hóa cho CAR mô tả trong bản mô tả này là vector retrovirus hoặc vector lentivirus. Thuật ngữ “vector retrovirus” đề cập đến vector chứa các phần tử gen cấu trúc và chức năng mà chủ yếu

có nguồn gốc từ retrovirut. Thuật ngữ “vector lentivirut” đề cập đến vector chứa các phần tử gen cấu trúc và chức năng ngoài các LTR mà chủ yếu có nguồn gốc từ lentivirut.

Các vector retrovirut để sử dụng ở đây có thể có nguồn gốc từ retrovirut đã biết bất kỳ (ví dụ, retrovirut type c, như virus gây sarcom ở chuột Moloney (MoMSV), virus gây sarcom ở chuột Harvey (HaMuSV), virus gây u vú ở chuột (MuMTV), virus gây bệnh bạch cầu virus ở vượn (GaLV), virus gây bệnh bạch cầu ở mèo (FLV), spumavirut, Friend, virus tế bào gốc ở chuột (MSCV) và virus gây sarcom Rous (RSV)). Retrovirut” theo sáng chế cũng bao gồm các virus gây bệnh bạch cầu tế bào T ở người, HTLV-1 và HTLV-2, và họ lentivirut của retrovirut, như virus gây suy giảm miễn dịch ở người, HIV-1, HIV-2, virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (SIV), virus gây suy giảm miễn dịch ở mèo (FIV), virus gây suy giảm miễn dịch ở ngựa (EIV), và các loại retrovirut khác.

Vector lentivirut để sử dụng ở đây đề cập đến vector có nguồn gốc từ lentivirut, nhóm (hoặc chi) các retrovirut làm phát sinh bệnh phát triển chậm. Các virus bao gồm trong nhóm này bao gồm HIV (virus gây suy giảm miễn dịch ở người; bao gồm HIV type 1, và HIV type 2); visna-maedi; virus gây viêm khớp - viêm não ở dê; virus gây bệnh thiếu máu nhiễm trùng ở ngựa; virus gây suy giảm miễn dịch ở mèo (FIV); virus gây suy giảm miễn dịch ở bò (BIV); và virus gây suy giảm miễn dịch ở khỉ (SIV). Việc bào chế lentivirut tái tổ hợp có thể đạt được sử dụng các phương pháp theo tác giả Dull *et al.* and Zufferey *et al.* (Dull *et al.*, *J. Virol.*, 1998; 72: 8463-8471 và Zufferey *et al.*, *J. Virol.* 1998; 72:9873-9880).

Các vector retrovirut (tức là, cả lentivirut và không phải lentivirut) để sử dụng trong sáng chế có thể được tạo ra sử dụng các kỹ thuật tách dòng chuẩn bằng cách kết hợp các trình tự ADN mong muốn theo thứ tự và hướng được mô tả trong bản mô tả này (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 và các sổ tay phòng thí nghiệm chuẩn khác; Eglitis, *et al.* (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464; Wilson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury *et al.* (1991) *Science*

254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) J. Immunol 150:4104-4115; patent Mỹ số 4,868,116; patent Mỹ số 4,980,286; công bố đơn PCT số WO 89/07136; công bố đơn PCT số WO 89/02468; công bố đơn PCT số WO 89/05345; và công bố đơn PCT số WO 92/07573).

Các nguồn thích hợp để thu được các trình tự retrovirus (tức là, cả lentivirus và không phải lentivirus) để sử dụng trong việc tạo ra các vector bao gồm, ví dụ, các ARN và cADN hệ gen có sẵn từ các nguồn có bán trên thị trường, bao gồm từ Bảo tàng giống chuẩn (Type Culture Collection - ATCC), Rockville, Md. Các trình tự cũng có thể được tổng hợp theo phương thức hóa học.

Để biểu hiện CAR BCMA, vector có thể được đưa vào bên trong tế bào chủ để cho phép biểu hiện polypeptit bên trong tế bào chủ. Vector biểu hiện có thể chứa nhiều yếu tố để điều chỉnh sự biểu hiện, bao gồm không giới hạn, trình tự khởi đầu phiên mã, trình tự khởi phát sự phiên mã, trình tự tăng cường, trình tự đánh dấu có thể lựa chọn, và các trình tự tín hiệu. Các yếu tố này có thể được chọn khi thích hợp bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực, như đã mô tả ở trên. Ví dụ, trình tự khởi đầu phiên mã có thể được chọn để thúc đẩy sự phiên mã của polynucleotit trong vector. Trình tự khởi đầu phiên mã thích hợp bao gồm, không giới hạn, trình tự khởi đầu phiên mã T7, trình tự khởi đầu phiên mã T3, trình tự khởi đầu phiên mã SP6, trình tự khởi đầu phiên mã beta-actin, trình tự khởi đầu phiên mã EF1a, trình tự khởi đầu phiên mã CMV, và trình tự khởi đầu phiên mã SV40. Trình tự tăng cường có thể được chọn để tăng cường sự phiên mã của polynucleotit. Các trình tự đánh dấu có thể lựa chọn có thể được chọn để cho phép sự lựa chọn các tế bào chủ được đưa vào bằng vector từ các loại không có, ví dụ, các trình tự có thể lựa chọn có thể là các gen mà nó truyền tính chịu kháng sinh. Các trình tự tín hiệu có thể được chọn để cho phép polypeptit đã biểu hiện được vận chuyển ra bên ngoài tế bào chủ.

Để tách dòng polynucleotit, vector có thể được đưa vào bên trong tế bào chủ (tế bào chủ phân lập) để cho phép việc sao chép chính bản thân vector và bằng cách đó khuếch đại các bản sao của polynucleotit được chứa trong đó. Các vector tách dòng có thể chứa các thành phần trình tự thường bao gồm, không giới hạn, nguồn gốc sao chép, trình tự khởi đầu phiên mã, trình tự khởi phát sự phiên mã, trình tự tăng cường, và

trình tự có thể lựa chọn. Các yếu tố này có thể được chọn khi thích hợp bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, nguồn gốc sao chép có thể được chọn để thúc đẩy sự sao chép tự động của vector trong tế bào chủ.

Theo các phương án xác định, sáng chế đề cập đến các tế bào chủ phân lập chứa các vector được đề cập ở đây. Tế bào chủ chứa vector có thể hữu dụng trong biểu hiện hoặc tách dòng polynucleotit được chứa trong vector. Tế bào chủ thích hợp có thể bao gồm, không giới hạn, tế bào chưa có nhân điển hình, tế bào nấm, tế bào nấm men, hoặc các tế bào có nhân điển hình bậc cao hơn như các tế bào động vật có vú. Tế bào chưa có nhân điển hình thích hợp cho mục đích này bao gồm, không giới hạn, vi khuẩn thật, như sinh vật Gram âm hoặc Gram dương, ví dụ, Enterobacterales như *Escherichia*, ví dụ, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, ví dụ, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, ví dụ, *Serratia marcescens*, và *Shigella*, cũng như *Bacilli* như *B. subtilis* và *B. licheniformis*, *Pseudomonas* như *P. aeruginosa*, và *Streptomyces*.

CAR theo sáng chế được đưa vào trong tế bào chủ sử dụng các kỹ thuật chuyển nhiễm và/hoặc tải nạp đã biết trong lĩnh vực. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ, “chuyển nhiễm,” và “tải nạp,” để chỉ các quy trình mà nhờ đó, trình tự axit nucleic ngoại sinh được đưa vào trong tế bào chủ. Axit nucleic có thể được hợp nhất vào trong ADN tế bào chủ hoặc có thể được duy trì ở ngoài nhiễm sắc thể. Axit nucleic có thể được duy trì tạm thời hoặc có thể đưa vào ổn định. Việc chuyển nhiễm có thể được hoàn thành bằng nhiều phương tiện đã biết trong lĩnh vực bao gồm nhưng không bị giới hạn ở phương pháp đồng kết tủa canxi phosphat-ADN, chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-dextran, chuyển nhiễm qua trung gian polybrene, điện di, vi tiêm, dung hợp liposome, lipofection, dung hợp tế bào trần, nhiễm trùng do retrovirus, và bắn gen. Việc tải nạp đề cập đến sự phân phối (các) gen sử dụng vector virus hoặc vector retrovirus thông qua sự gây nhiễm bằng virus hơn là bằng chuyển nhiễm. Theo các phương án xác định, vector retrovirus được tải nạp bằng cách sắp xếp các vector vào trong các virion trước khi tiếp xúc với tế bào. Ví dụ, axit nucleic mã hóa CAR BCMA được mang bởi vector retrovirus có thể được biến nạp vào trong tế bào thông qua sự gây nhiễm và sự hợp nhất tiền virus.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thiết kế gen” hoặc “biến đổi gen” đề cập đến việc bổ sung vật liệu ngoại gen ở dạng ADN hoặc ARN vào trong vật liệu gen

toàn bộ trong tế bào. Thuật ngữ, “tế bào biến đổi gen,” “tế bào biến đổi,” và “tế bào chuyển hướng,” được sử dụng thay đổi lẫn nhau được.

Cụ thể, CAR theo sáng chế được đưa vào và biểu hiện trong tế bào gây miễn dịch nhằm để chuyển hướng tính đặc hiệu của chúng sang kháng nguyên đích mong muốn, ví dụ, tương bào ác tính, ví dụ bệnh đa u tủy xương.

Sáng chế đề cập đến các phương pháp tạo ra tế bào gây miễn dịch biểu hiện CAR như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án, phương pháp bao gồm việc chuyển nhiễm hoặc tải nạp các tế bào gây miễn dịch được phân lập từ đối tượng, như đối tượng có tế bào khối u biểu hiện BCMA, sao cho các tế bào gây miễn dịch biểu hiện một hoặc nhiều CAR như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án xác định, tế bào gây miễn dịch được phân lập từ đối tượng và được làm biến đổi gen không cần thao tác thêm *in vitro*. Các tế bào như vậy sau đó có thể được đưa lại trực tiếp vào trong đối tượng. Theo các phương án khác, tế bào gây miễn dịch trước tiên được kích hoạt và kích thích để tăng sinh *in vitro* trước khi được làm biến đổi gen để biểu hiện CAR. Theo khía cạnh này, tế bào gây miễn dịch có thể được nuôi cấy trước hoặc sau khi được làm biến đổi gen (tức là, được tải nạp hoặc chuyển nhiễm để biểu hiện CAR như được mô tả trong bản mô tả này).

Trước khi thao tác hoặc làm biến đổi gen *in vitro* tế bào gây miễn dịch mô tả trong bản mô tả này, nguồn tế bào có thể thu được từ đối tượng. Cụ thể, tế bào gây miễn dịch để sử dụng với CAR như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm các tế bào T. Các tế bào T có thể thu được từ nhiều nguồn, bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi, tủy xương, mô hạch bạch huyết, máu cuống rốn, mô tuyến ức, mô từ vị trí nhiễm trùng, dịch cổ trướng, dịch màng phổi, mô lách, và các khối u. Theo các phương án xác định, tế bào T có thể thu được từ đơn vị thu thập máu từ đối tượng sử dụng các kỹ thuật bất kỳ đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực, như kỹ thuật tách FICOLL. Theo một phương án, các tế bào từ máu tuần hoàn của đối tượng thu được bằng kỹ thuật phân tách máu. Sản phẩm phân tách máu điển hình chứa lymphô bào, bao gồm tế bào T, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt, tế bào B, các tế bào bạch cầu có nhân khác, tế bào hồng cầu, và tiểu cầu. Theo một phương án, các tế bào được thu thập bằng kỹ thuật phân tách máu có thể được rửa để loại bỏ phần huyết tương và đưa tế bào vào trong dung dịch đệm hoặc môi trường thích hợp để xử lý sau đó. Theo một phương án theo sáng chế, các tế bào được rửa bằng PBS. Theo phương

án khác, dung dịch rửa thiếu canxi, và có thể thiếu magie hoặc có thể thiếu nhiều, nếu không phải tất cả, các cation hóa trị hai. Như sẽ được hiểu bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực, bước rửa có thể được hoàn thành bằng các phương pháp đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực, như bằng cách sử dụng máy ly tâm kiểu dòng chảy bán tự động. Sau khi rửa, các tế bào có thể tái tạo huyền phù trong nhiều dung dịch đệm tương thích sinh học hoặc dung dịch nước muối khác có hoặc không có dung dịch đệm. Theo các phương án xác định, các thành phần không mong muốn của mẫu phân tách máu có thể được loại bỏ trong môi trường nuôi cấy tái tạo huyền phù tế bào trực tiếp.

Theo các phương án xác định, tế bào T được phân lập từ các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (PBMCs) bằng cách phân giải tế bào hồng cầu và lấy hết bạch cầu đơn nhân, ví dụ, bằng cách ly tâm theo gradient PERCOLL™. Một quần thể phụ riêng của các tế bào T, như CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, và các tế bào CD45RO+ T, có thể được phân lập thêm bằng các kỹ thuật chọn lọc dương hoặc âm. Ví dụ, việc làm giàu quần thể tế bào T bằng kỹ thuật chọn lọc âm có thể được hoàn thành bằng tổ hợp của các kháng thể hướng vào các dấu ấn bề mặt chỉ liên quan đến các tế bào chọn lọc âm. Một phương pháp để sử dụng ở đây là sàng lọc và/hoặc chọn lọc tế bào thông qua phương pháp kết dính miễn dịch dạng từ tính âm hoặc phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy mà các phương pháp này sử dụng dung dịch hỗn hợp của các kháng thể đơn dòng hướng vào các dấu ấn bề mặt tế bào có mặt trên các tế bào chọn lọc âm. Ví dụ, để làm giàu cho các tế bào CD4+ bằng chọn lọc âm, dung dịch hỗn hợp kháng thể đơn dòng điển hình bao gồm các kháng thể với CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, và CD8. Phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy và sàng lọc tế bào cũng có thể được sử dụng để phân lập các quần thể tế bào mong muốn để sử dụng trong sáng chế.

PBMC có thể được sử dụng trực tiếp cho thao tác biến đổi gen với các CAR sử dụng các phương pháp như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án xác định, sau khi phân lập PBMC, các lymphô bào T được phân lập thêm và theo các phương án xác định, cả hai loại lymphô bào T gây độc tế bào và hỗ trợ có thể được phân loại thành các quần thể phụ tế bào T nguyên sơ, ký ức, và tế bào T tác động trước hoặc sau thao tác biến đổi và/hoặc mở rộng gen. Các tế bào CD8+ có thể thu được bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn. Theo một số phương án, các tế bào CD8+ được phân loại thêm thành các tế bào nguyên sơ, nhớ trung ương, và các tế bào tác

động bằng cách xác định các kháng nguyên bề mặt tế bào liên quan với mỗi một trong số các kiểu tế bào CD8+ này. Theo các phương án, tế bào T nhớ có mặt trong cả hai tập hợp phụ CD62L+ và CD62L- của các lymphô bào máu ngoại vi CD8+. PBMC được phân loại thành các phần CD62L-CD8+ và CD62L+CD8+ sau khi nhuộm bằng các kháng thể kháng CD8 và kháng CD62L. Theo một số phương án, sự biểu hiện của các dấu ấn kiểu hình của TCM nhớ trung ương bao gồm CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, và CD127 và âm tính đối với granzyme B. Theo một số phương án, tế bào T nhớ trung ương là các tế bào T CD45RO+, CD62L+, CD8+. Theo một số phương án, tế bào T tác động âm tính đối với CD62L, CCR7, CD28, và CD127, và dương tính đối với granzyme B và perforin. Theo một số phương án, các lymphô bào T CD8+ nguyên sơ được đặc trưng bởi sự biểu hiện các dấu ấn kiểu hình của tế bào T nguyên sơ bao gồm CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD 127, và CD45RA.

Theo các phương án xác định, tế bào T CD4+ được phân loại thêm thành các quần thể phụ. Ví dụ, các tế bào hỗ trợ T CD4+ có thể được phân loại thành tế bào nguyên sơ, tế bào nhớ trung ương, và tế bào tác động bằng cách xác định các quần thể tế bào mà có các kháng nguyên bề mặt tế bào. Các lymphô bào CD4+ có thể thu được bằng các phương pháp chuẩn. Theo một số phương án, các lymphô bào T CD4+ nguyên sơ là tế bào T CD45RO-, CD45RA+, CD62L+CD4+. Theo một số phương án, các tế bào CD4+ nhớ trung ương là dương tính CD62L và dương tính CD45RO. Theo một số phương án, các tế bào CD4+ tác động là âm tính CD62L và CD45RO.

Tế bào gây miễn dịch, như tế bào T, có thể được biến đổi gen sau khi phân lập sử dụng các phương pháp đã biết, hoặc tế bào gây miễn dịch có thể được kích hoạt và nhân rộng (hoặc được biệt hóa trong trường hợp tế bào tiền thân) *in vitro* trước khi được làm biến đổi gen. Theo phương án khác, tế bào gây miễn dịch, như tế bào T, được biến đổi gen bằng các thụ thể kháng nguyên khảm mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, được tải nạp bằng vectơ virus bao gồm axit nucleic mã hóa cho CAR) và sau đó được kích hoạt và nhân rộng *in vitro*. Các phương pháp kích hoạt và nhân rộng tế bào T là đã biết trong lĩnh vực và được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 6,905,874; patent Mỹ số 6,867,041; patent Mỹ số 6,797,514; WO2012079000. Nói chung, các phương pháp như vậy bao gồm bước cho PBMC hoặc tế bào T phân lập tiếp xúc với tác nhân kích thích và đồng tác nhân kích thích, như các kháng thể kháng CD3 và kháng CD28, thường được gắn lên hạt hoặc bề mặt khác, trong môi trường nuôi cấy với các xytokin

thích hợp, như IL-2. Các kháng thể kháng CD3 và kháng CD28 được gắn lên cùng hạt dùng làm tế bào trình diện kháng nguyên (APC) “thay thế”. Theo các phương án khác, các tế bào T có thể được kích hoạt và kích thích để tăng sinh bằng các tế bào nguồn và các kháng thể và xytokin thích hợp sử dụng các phương pháp như phương pháp được mô tả trong patent Mỹ số 6,040,177; patent Mỹ số 5,827,642; và WO2012129514.

Sáng chế đề cập đến quần thể tế bào gây miễn dịch cải biến để điều trị cho bệnh nhân bị tình trạng ác tính gây ra bởi khối u biểu hiện BCMA, ví dụ, bệnh đa u tủy xương, tế bào gây miễn dịch cải biến bao gồm CAR BCMA như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Tế bào gây miễn dịch biểu hiện CAR bào chế như được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong các phương pháp và chế phẩm trong miễn dịch trị liệu tự thân theo các kỹ thuật đã biết hoặc các biến thể của nó mà sẽ trở nên rõ ràng đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực dựa vào bản mô tả này. Ví dụ, xem trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0170238 của tác giả Gruenberg et al; cũng xem trong patent Mỹ số 4,690,915 của tác giả Rosenberg.

Theo một số phương án, các tế bào được phối chế bằng cách trước tiên, thu hoạch tế bào từ môi trường nuôi cấy của chúng, và sau đó rửa và cô đặc tế bào trong môi trường và hệ thống chứa thích hợp để dùng (chất mang “dùng dụng”) với lượng có hiệu quả điều trị. Môi trường tiêm truyền thích hợp có thể là môi trường đẳng trương bất kỳ, tốt hơn là nước muối thường, Normosol R (Abbott) hoặc Plasma-Lyte A (Baxter), nhưng môi trường dextroza 5% trong nước hoặc lactat Ringer cũng có thể được sử dụng. Môi trường tiêm truyền có thể được bổ sung albumin huyết thanh người.

Lượng có hiệu quả điều trị của tế bào trong chế phẩm ít nhất là 2 tế bào (ví dụ, ít nhất 1 tế bào T CD8+ nhớ trung ương và ít nhất 1 tập hợp tế bào T hỗ trợ CD4+) hoặc tốt hơn nữa nhiều hơn 10^2 tế bào, và tới 10^6 và bao gồm 10^8 hoặc 10^9 tế bào và có thể nhiều hơn 10^{10} tế bào. Số lượng tế bào sẽ phụ thuộc vào việc sử dụng cuối cùng mà chế phẩm được dự định sẽ là kiểu tế bào được bao gồm trong đó.

Các tế bào có thể là tự thân hoặc khác loại với bệnh nhân đang trải qua điều trị. Nếu muốn, việc điều trị có thể cũng bao gồm việc dùng các tác nhân gây phân bào (ví dụ, PHA) hoặc lymphokin, xytokin, và/hoặc chemokin (ví dụ, IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α , IL-18, và TNF- β , GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 α , v.v..) như

được mô tả trong bản mô tả này để tăng cường cảm ứng đáp ứng miễn dịch.

Quần thể tế bào gây miễn dịch biểu hiện CAR theo sáng chế có thể được dùng riêng, hoặc ở dạng được phẩm kết hợp với chất pha loãng và/hoặc với các thành phần khác như IL-2 hoặc các xytokin hoặc quần thể tế bào khác. Một cách vắn tắt, được phẩm theo sáng chế có thể chứa quần thể tế bào gây miễn dịch biểu hiện CAR, như tế bào T, như được mô tả trong bản mô tả này, kết hợp với một hoặc nhiều chất mang được dụng hoặc chấp nhận được về mặt sinh lý, chất pha loãng hoặc tá được. Các chế phẩm như vậy có thể chứa các dung dịch đệm như nước muối đệm trung tính, nước muối đệm phosphat và tương tự; cacbon hydrat như glucoza, mannoza, sucroza hoặc dextran, mannitol; protein; polypeptit hoặc axit amin như glyxin; chất chống oxy hóa; tác nhân chelat hóa như EDTA hoặc glutathione; chất phụ gia (ví dụ, nhôm hydroxit); và chất bảo quản. Chế phẩm theo sáng chế tốt hơn được phối chế để dùng theo đường tĩnh mạch.

Đáp ứng miễn dịch chống khối u được cảm ứng ở đối tượng bằng cách dùng tế bào T biểu hiện CAR mô tả trong bản mô tả này sử dụng các phương pháp mô tả trong bản mô tả này, hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực, có thể bao gồm đáp ứng miễn dịch tế bào được trung gian bởi tế bào T gây độc tế bào có khả năng tiêu diệt các tế bào bị nhiễm, tế bào T điều hòa, và đáp ứng tế bào T hỗ trợ. Đáp ứng miễn dịch dịch thể, chủ yếu được trung gian bởi tế bào T hỗ trợ có khả năng kích hoạt các tế bào B, do vậy dẫn đến việc tạo ra kháng thể, có thể cũng được cảm ứng. Nhiều kỹ thuật có thể được sử dụng để phân tích kiểu đáp ứng miễn dịch được cảm ứng bởi các chế phẩm theo sáng chế, các kỹ thuật này đã được mô tả trong tài liệu chuyên ngành trong lĩnh vực; ví dụ, *Current Protocols in Immunology*, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

Do vậy, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng được chẩn đoán bị hoặc nghi ngờ bị hoặc có nguy cơ phát triển ung thư ác tính hệ tạo máu một phần được đặc trưng bởi sự tích lũy bất thường của các tương bào tạo ra globulin miễn dịch trong tủy xương, như trong bệnh đa u tủy xương, bao gồm bước dùng cho đối tượng một lượng có hiệu quả điều trị của tế bào gây miễn dịch biểu hiện CAR như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng

được chẩn đoán bị ung thư biểu hiện BCMA bao gồm bước lấy các tế bào gây miễn dịch từ đối tượng được chẩn đoán bị ung thư biểu hiện BCMA, làm biến đổi gen các tế bào gây miễn dịch nêu trên bằng vector bao gồm axit nucleic mã hóa cho thụ thể kháng nguyên khảm theo sáng chế, bằng cách đó tạo ra quần thể tế bào gây miễn dịch cải biến, và đưa quần thể tế bào gây miễn dịch cải biến này vào cùng đối tượng nêu trên. Theo một phương án, tế bào gây miễn dịch bao gồm các tế bào T.

Phương pháp để đưa chế phẩm tế bào mô tả trong bản mô tả này bao gồm phương pháp bất kỳ có hiệu quả dẫn đến việc đưa lại tế bào gây miễn dịch biến đổi gen *ex vivo* mà trực tiếp biểu hiện CAR theo sáng chế vào trong đối tượng hoặc khi đưa lại tế bào tiền thân biến đổi gen của tế bào gây miễn dịch mà khi đưa vào đối tượng sẽ biệt hóa thành tế bào gây miễn dịch trưởng thành biểu hiện CAR. Một phương pháp bao gồm bước tải nạp tế bào T máu ngoại vi *ex vivo* có cấu trúc axit nucleic theo sáng chế và đưa các tế bào đã tải nạp trở lại đối tượng.

Đặc tính liên kết của các thụ thể kháng nguyên khảm và kháng thể tương ứng

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “liên kết” trong ngữ cảnh của sự liên kết của thụ thể kháng nguyên khảm hoặc kháng thể tương ứng với, ví dụ, kháng nguyên xác định trước, như protein bề mặt tế bào hoặc đoạn của nó, điển hình đề cập đến sự tương tác hoặc sự kết hợp giữa tối thiểu hai thực thể hoặc cấu trúc phân tử, như sự tương tác miễn liên kết kháng nguyên:kháng nguyên.

Ví dụ, ái lực liên kết điển hình tương ứng với giá trị K_D vào khoảng 10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, như khoảng 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, như khoảng 10^{-9} M hoặc nhỏ hơn khi được xác định bởi, ví dụ, công nghệ cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) trong thiết bị BIAcore 3000 sử dụng kháng nguyên làm phối tử và kháng thể hoặc thụ thể kháng nguyên khảm làm chất phân tích (hoặc kháng phối tử). Các chiến lược liên kết dựa vào tế bào, như các thử nghiệm liên kết sàng lọc tế bào kích hoạt bởi huỳnh quang (FACS), cũng được sử dụng thường quy, và dữ liệu FACS tương quan thích hợp với các phương pháp khác như liên kết cạnh tranh phối tử phóng xạ và SPR (Benedict, CA, *J Immunol Methods*. 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, et al. *J Immunol Methods*. 2005, 302(1-2):68-77).

Do đó, thụ thể kháng nguyên khảm hoặc kháng thể tương ứng theo sáng chế liên kết với kháng nguyên xác định trước hoặc phân tử trên bề mặt tế bào (thụ thể) có ái lực

tương ứng với giá trị K_D mà giá trị này ít nhất thấp hơn mười lần so với ái lực của nó để liên kết với kháng nguyên không đặc hiệu (ví dụ, BSA, casein). Theo sáng chế, ái lực của thụ thể kháng nguyên khảm hoặc kháng thể tương ứng với giá trị K_D mà bằng hoặc nhỏ hơn mười lần thấp hơn so với kháng nguyên không đặc hiệu có thể được xem là liên kết không thể phát hiện được.

Thuật ngữ " K_D " (M) để chỉ hằng số cân bằng phân ly của một tương tác miễn liên kết kháng nguyên:kháng nguyên cụ thể hoặc hằng số cân bằng phân ly của kháng thể tương ứng với kháng nguyên. Có mối quan hệ nghịch đảo giữa K_D và ái lực liên kết, do đó giá trị K_D càng nhỏ, thì ái lực càng cao, tức là mạnh hơn. Do vậy, thuật ngữ "ái lực cao hơn" hoặc "ái lực mạnh hơn" để chỉ khả năng tạo ra tương tác cao hơn và do đó, giá trị K_D nhỏ hơn và ngược lại, thuật ngữ "ái lực thấp hơn" hoặc "ái lực yếu hơn" để chỉ khả năng tạo ra tương tác thấp hơn và do đó, giá trị K_D lớn hơn. Trong một số tình huống, ái lực liên kết cao hơn (hoặc K_D) của một phân tử cụ thể (ví dụ, thụ thể kháng nguyên khảm hoặc kháng thể tương ứng) với phân tử đối tác tương tác của nó (ví dụ, kháng nguyên X) so với ái lực liên kết của phân tử (ví dụ, thụ thể kháng nguyên khảm hoặc kháng thể tương ứng) với phân tử đối tác tương tác khác (ví dụ, kháng nguyên Y) có thể được biểu diễn ở dạng tỷ lệ liên kết được xác định bằng cách chia giá trị K_D lớn hơn (thấp hơn hoặc yếu hơn, ái lực) cho giá trị K_D nhỏ hơn (cao hơn hoặc mạnh hơn, ái lực), ví dụ được biểu diễn ở dạng ái lực liên kết lớn hơn gấp 5 lần hoặc lớn hơn gấp 10 lần, tùy từng trường hợp.

Thuật ngữ " k_d " (sec⁻¹ hoặc 1/s) đề cập đến hằng số tốc độ phân ly của một tương tác miễn liên kết kháng nguyên:kháng nguyên cụ thể hoặc hằng số tốc độ phân ly của thụ thể kháng nguyên khảm hoặc kháng thể tương ứng. Giá trị này cũng được gọi là giá trị k_{off} .

Thuật ngữ " k_a " (M⁻¹ x sec⁻¹ hoặc 1/M) để chỉ hằng số tốc độ kết hợp của một tương tác miễn liên kết kháng nguyên:kháng nguyên cụ thể, hoặc hằng số tốc độ kết hợp của thụ thể kháng nguyên khảm hoặc kháng thể tương ứng.

Thuật ngữ " K_A " (M⁻¹ hoặc 1/M) đề cập đến hằng số cân bằng kết hợp của một tương tác miễn liên kết kháng nguyên:kháng nguyên cụ thể, hoặc hằng số cân bằng kết hợp của thụ thể kháng nguyên khảm hoặc kháng thể tương ứng. Hằng số cân bằng kết hợp thu được bằng cách chia k_a cho k_d .

Thuật ngữ “EC50” hoặc “EC₅₀” để chỉ nồng độ hiệu quả tối đa một nửa, nồng độ này bao gồm nồng độ của thụ thể kháng nguyên khảm mà gây ra đáp ứng nửa chừng giữa mức cơ sở và cực đại sau một thời gian tiếp xúc xác định. Giá trị EC₅₀ về bản chất là nồng độ của thụ thể kháng nguyên khảm trong đó 50% tác dụng tối đa của nó được quan sát thấy. Theo các phương án xác định, giá trị EC₅₀ tương đương nồng độ của thụ thể kháng nguyên khảm hoặc kháng thể tương ứng theo sáng chế mà tạo ra liên kết cực đại một nửa với các tế bào biểu hiện an kháng nguyên (ví dụ, kháng nguyên kết hợp khối u, như BCMA), khi được xác định bằng, ví dụ thử nghiệm liên kết FACS. Do vậy, sự liên kết giảm hoặc yếu hơn được quan sát thấy với giá trị EC₅₀ tăng, hoặc giá trị nồng độ hiệu quả tối đa một nửa.

Theo một phương án, liên kết giảm có thể được xác định khi nồng độ thụ thể kháng nguyên khảm hoặc kháng thể tương ứng EC₅₀ cao cho phép sự liên kết với lượng tối đa một nửa của các tế bào đích.

Biến thể trình tự của các thụ thể kháng nguyên khảm

Các thụ thể kháng nguyên khảm hoặc sáng chế có thể đề cập đến một hoặc nhiều sự thay thế, thêm vào và/hoặc xóa axit amin ở các vùng khung và/hoặc vùng CDR của các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với các trình tự dòng mầm tương ứng mà các miền liên kết kháng nguyên riêng biệt của các kháng thể tương ứng có nguồn gốc từ đó. Các đột biến như vậy có thể được xác định dễ dàng bằng cách so sánh các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này với các trình tự dòng mầm có sẵn từ, ví dụ, các cơ sở dữ liệu công khai về trình tự kháng thể. Các thụ thể kháng nguyên khảm theo sáng chế có thể bao gồm miền liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ bất kỳ trong số các trình tự axit amin vùng CDR hoặc vùng biến đổi minh họa được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR được đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà kháng thể tương ứng có nguồn gốc từ đó, hoặc thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm người khác, hoặc sự thay thế axit amin bảo toàn của (các) gốc dòng mầm tương ứng (những thay đổi trình tự như vậy được gọi chung ở đây là “đột biến dòng mầm”). Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực, khởi đầu bằng các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể dễ dàng tạo ra nhiều kháng thể mà bao gồm một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng biệt

hoặc tổ hợp của chúng. Theo các phương án xác định, tất cả các gốc khung và/hoặc CDR trong các miền V_H và/hoặc V_L được gây đột biến ngược trở lại các gốc được tìm thấy ở trình tự dòng mầm ban đầu mà miền liên kết kháng nguyên nguyên ủy có nguồn gốc từ đó. Theo các phương án khác, chỉ các gốc xác định được đột biến ngược trở lại trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ, chỉ các gốc đột biến tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1 hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ các gốc đột biến tìm thấy trong CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều trong số các gốc khung và/hoặc gốc CDR được đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác (tức là, trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm mà miền liên kết kháng nguyên ban đầu có nguồn gốc từ đó). Ngoài ra, các miền liên kết kháng nguyên có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều đột biến dòng mầm trong các vùng khung và/hoặc vùng CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng biệt xác định được đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm cụ thể trong khi các gốc xác định khác mà khác với trình tự dòng mầm ban đầu được duy trì hoặc được đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác.

Các đặc tính sinh học của thụ thể kháng nguyên khả năng và kháng thể tương ứng

Sáng chế đề cập đến thụ thể kháng nguyên khả năng với các miền liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ các kháng thể mà liên kết với BCMA người với ái lực cao (ví dụ, các giá trị K_D nanomol hoặc dưới nanomol).

Theo các phương án xác định, sáng chế đề cập đến các thụ thể kháng nguyên khả năng với các miền liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ các kháng thể tương ứng mà chúng liên kết với BCMA người (ví dụ, ở nhiệt độ 25°C) với K_D nhỏ hơn khoảng 5 nM khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt. Theo các phương án xác định, các kháng thể tương ứng gắn kết BCMA với K_D nhỏ hơn khoảng 20 nM, nhỏ hơn khoảng 10 nM, nhỏ hơn khoảng 8 nM, nhỏ hơn khoảng 7 nM, nhỏ hơn khoảng 6 nM, nhỏ hơn khoảng 5 nM, nhỏ hơn khoảng 4 nM, nhỏ hơn khoảng 3 nM, nhỏ hơn khoảng 2 nM, nhỏ hơn khoảng 1 nM, nhỏ hơn khoảng 800 pM, nhỏ hơn khoảng 700 pM, nhỏ hơn khoảng 500 pM, nhỏ hơn khoảng 400 pM, nhỏ hơn khoảng 300 pM, nhỏ hơn khoảng 200 pM, nhỏ hơn khoảng 100 pM, nhỏ hơn khoảng 50 pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 25 pM khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt.

Sáng chế cũng đề cập đến các thụ thể kháng nguyên khảm với các miền liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ các kháng thể tương ứng mà chúng gắn kết BCMA với thời gian bán phân ly ($t_{1/2}$) dài hơn khoảng 10 phút hoặc dài hơn khoảng 125 phút khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C. Theo các phương án xác định, các kháng thể tương ứng gắn kết BCMA với $t_{1/2}$ dài hơn khoảng 3 phút, dài hơn khoảng 4 phút, dài hơn khoảng 10 phút, dài hơn khoảng 20 phút, dài hơn khoảng 30 phút, dài hơn khoảng 40 phút, dài hơn khoảng 50 phút, dài hơn khoảng 60 phút, dài hơn khoảng 70 phút, dài hơn khoảng 80 phút, dài hơn khoảng 90 phút, dài hơn khoảng 100 phút, dài hơn khoảng 110 phút, hoặc dài hơn khoảng 120 phút, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C.

Sáng chế cũng đề cập đến các thụ thể kháng nguyên khảm với các miền liên kết kháng nguyên có nguồn gốc từ các kháng thể tương ứng mà liên kết đặc hiệu với các dòng tế bào của người mà chúng biểu hiện BCMA nội sinh (ví dụ, NCI-H929, MOLP-8 hoặc OMP-2), khi được xác định bằng thử nghiệm liên kết FACS.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào thiết kế biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm đặc hiệu BCMA mà (i) được kích hoạt bởi tế bào biểu hiện BCMA, và/hoặc (ii) thể hiện sự ức chế phát triển khối u ở chuột bị suy giảm miễn dịch mang mô ghép ngoại lai đa u tủy xương ở người.

Tạo ra các miền liên kết kháng nguyên

Các miền liên kết kháng nguyên của thụ thể kháng nguyên khảm theo sáng chế, các miền này đặc hiệu với các kháng nguyên cụ thể (ví dụ, BCMA), có thể được tạo ra bằng công nghệ tạo ra kháng thể bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Theo các phương án xác định, một hoặc nhiều trong số các thành phần riêng biệt (ví dụ, các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ) của các kháng thể tương ứng theo sáng chế có nguồn gốc từ các kháng thể khảm, được làm giống như của người hoặc các kháng thể người đầy đủ. Các phương pháp tạo ra các kháng thể như vậy là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, một hoặc nhiều trong số các chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có thể được tạo ra sử dụng công nghệ VELOCIMMUNE™. Sử dụng công nghệ VELOCIMMUNE™ (hoặc công nghệ tạo ra kháng thể người bất kỳ khác), các kháng thể khảm ái lực cao với một kháng nguyên cụ thể (ví dụ, BCMA) đầu tiên được phân lập có vùng biến đổi của người và vùng ổn định của chuột. Các kháng thể được định rõ đặc điểm và được chọn về các đặc tính mong

muốn, bao gồm ái lực, tính chọn lọc, epitope, v.v.. Như đã thảo luận trong bản mô tả này, các vùng biến đổi của người này (hoặc CDR) sau đó có thể được sáp nhập vào trong các miền liên kết kháng nguyên của các thụ thể kháng nguyên khảm.

Polynucleotit và vector

Sáng chế cũng đề cập đến các polynucleotit và vector mã hóa các thụ thể kháng nguyên khảm được thảo luận trong bản mô tả này.

Theo các phương án khác nhau, polynucleotit có thể bao gồm caset biểu hiện hoặc vector biểu hiện (ví dụ, plasmid để đưa vào trong tế bào chủ vi khuẩn, hoặc vector virus như vector baculovirus cho sự chuyển nhiễm của tế bào chủ côn trùng hoặc plasmid hoặc vector virus như lentivirus cho sự chuyển nhiễm của tế bào chủ động vật có vú).

Theo các phương án khác nhau, các polynucleotit và/hoặc vector bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87 hoặc SEQ ID NO: 89. Theo các phương án khác nhau, các polynucleotit và/hoặc vector bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, hoặc SEQ ID NO: 90. Theo các phương án khác nhau, các polynucleotit và/hoặc vector bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99 hoặc SEQ ID NO: 100.

Phương pháp thiết kế các tế bào miễn dịch biểu hiện các thụ thể kháng nguyên khảm

Sáng chế đề cập đến các phương pháp tạo ra tế bào miễn dịch dùng cho liệu pháp điều trị miễn dịch bao gồm bước đưa, *ex vivo*, vào trong các tế bào miễn dịch này, các polynucleotit hoặc vector mã hóa một trong số các thụ thể kháng nguyên khảm đặc hiệu BCMA mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề cập đến các tế bào miễn dịch chứa polynucleotit hoặc vector lentivirus mã hóa cho một trong số các thụ thể kháng nguyên khảm đặc hiệu BCMA thảo luận trong bản mô tả này. Theo một số phương án, các tế bào miễn dịch này được sử dụng cho liệu pháp điều trị miễn dịch (ví dụ, điều trị ung thư).

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp làm biến đổi gen các tế bào miễn dịch để khiến cho các tế bào này thích hợp hơn trong phương pháp ghép. Theo khía

cạnh thứ nhất, tế bào miễn dịch có thể được tạo ra chứa allen lặn, ví dụ, bằng cách làm bất hoạt ít nhất một gen biểu hiện một hoặc nhiều thành phần của tế bào T thụ thể (TCR) như được mô tả trong WO 2013/176915, chúng có thể được kết hợp với sự bất hoạt của gen mã hóa hoặc điều hòa sự biểu hiện HLA hoặc protein $\beta 2m$. Do đó, nguy cơ hội chứng mảnh ghép chống lại vật chủ và thải bỏ ghép được giảm thiểu đáng kể. Theo khía cạnh khác của sáng chế, tế bào miễn dịch có thể được thao tác thêm khiến cho các tế bào này hoạt động hơn hoặc hạn chế sự cạn kiệt, bằng cách bất hoạt các gen mã hóa cho các protein mà chúng tác động như là “điểm kiểm tra miễn dịch” mà chúng tác động ở dạng các tác nhân điều hòa sự kích hoạt tế bào T, như PD1 hoặc CTLA-4.

Các tế bào miễn dịch thiết kế

Các tế bào miễn dịch chứa thụ thể kháng nguyên khả thể theo sáng chế (hoặc các tế bào miễn dịch thiết kế) là đối tượng khác theo sáng chế. Trong một số trường hợp, tế bào miễn dịch là tế bào gây miễn dịch. Trong một số trường hợp, tế bào miễn dịch là tế bào T. Trong một số trường hợp, tế bào miễn dịch là lymphô bào T được chọn từ lymphô bào T gây viêm, lymphô bào T gây độc tế bào, lymphô bào T điều hòa, hoặc lymphô bào T hỗ trợ. Trong một số trường hợp, tế bào miễn dịch là lymphô bào T gây độc tế bào CD8+.

Theo một số phương án, tế bào miễn dịch thiết kế là tế bào T người chứa thụ thể kháng nguyên khả thể bao gồm, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: (a) miền liên kết phối tử ngoại bào bao gồm miền đoạn biến đổi chuỗi đơn kháng BCMA (scFv) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) và vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR); (b) miền bản lề; (c) miền xuyên màng; và (d) miền tế bào chất bao gồm miền đồng kích thích và miền tín hiệu.

Theo một số phương án, miền scFv của tế bào T người thiết kế bao gồm cặp trình tự axit amin LCVR/HCVR bao gồm các trình tự axit amin của các trình tự SEQ ID NO: 10/2, 26/18, 42/34, 58/50, hoặc 74/66. Trong một số trường hợp, miền bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 97. Trong một số trường hợp, miền xuyên màng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 98. Trong một số trường hợp, miền đồng kích thích là miền đồng kích thích 4-1BB. Trong một số trường hợp, miền đồng kích thích 4-1BB bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 99. Trong một số trường hợp, miền tín

hiệu là miền tín hiệu CD3zeta. Trong một số trường hợp, miền tín hiệu CD3zeta bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 100.

Theo các phương án khác nhau, tế bào T người thiết kế bao gồm thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, hoặc SEQ ID NO: 90.

Tương đương sinh học

Sáng chế đề cập đến các thụ thể kháng nguyên khảm và tế bào thiết kế biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm, các thụ thể này có các trình tự axit amin mà chúng thay đổi so với các trình tự axit amin của các phân tử minh họa được bộc lộ trong bản mô tả này nhưng vẫn giữ được khả năng liên kết BCMA, kích hoạt tế bào miễn dịch biểu hiện các thụ thể kháng nguyên khảm khi có mặt tế bào biểu hiện BCMA, hoặc kiểm soát sự phát triển hoặc đáp ứng tăng sinh của các tế bào khối u biểu hiện BCMA. Các phân tử biến thể như vậy có thể bao gồm một hoặc nhiều sự thêm, xóa hoặc thay thế các axit amin khi so sánh với trình tự gốc, nhưng thể hiện hoạt tính sinh học cơ bản tương đương với hoạt tính sinh học của các phân tử liên kết kháng nguyên nhị giá đã mô tả.

Theo một phương án, hai tế bào miễn dịch thiết kế biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm theo sáng chế là tương đương sinh học nếu như không có sự khác nhau có ý nghĩa trên lâm sàng về độ an toàn, độ tinh khiết và hiệu lực của chúng.

Theo một phương án, hai tế bào miễn dịch thiết kế là tương đương sinh học nếu như một bệnh nhân có thể chuyển đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm tham chiếu và sản phẩm sinh học mà không làm gia tăng nguy cơ về tác dụng bất lợi, bao gồm sự thay đổi có ý nghĩa trên lâm sàng về tính sinh miễn dịch, hoặc tính hiệu quả giảm, so với liệu pháp điều trị liên tục mà không có sự chuyển đổi này.

Theo một phương án, hai tế bào miễn dịch thiết kế là tương đương sinh học nếu như cả hai đều tác động theo cơ chế hoặc các cơ chế tác động chung trong điều kiện hoặc các điều kiện sử dụng, trong chừng mực các cơ chế này là đã biết.

Tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* và *in vitro*. Các phép đo về tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* trên người hoặc các động vật có vú khác, trong đó nồng độ của tế bào thiết kế được đo trong máu, huyết tương, huyết thanh hoặc dịch sinh học khác ở dạng hàm về thời gian;

(b) thử nghiệm *in vitro* mà đã được hiệu chỉnh bằng và được dự đoán một cách hợp lý từ dữ liệu khả dụng sinh học *in vivo* ở người; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác trong đó tác dụng được lý rõ ràng thích hợp của tế bào thiết kế (hoặc đích của nó) được đo ở dạng hàm về thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng có đối chứng mà chứng minh độ an toàn, tính hiệu quả hoặc khả dụng sinh học hoặc tương đương sinh học của một tế bào thiết kế.

Các biến thể tương đương sinh học của tế bào thiết kế minh họa được nêu ở đây có thể được cấu trúc bằng cách, ví dụ, tạo ra các thay thế các nhau đối với các gốc hoặc các trình tự hoặc xóa bỏ các gốc hoặc trình tự tận cùng hoặc bên trong không cần thiết cho hoạt tính sinh học.

Tính chọn lọc loài và khả năng phản ứng chéo của loài

Theo các phương án xác định theo sáng chế, các miền liên kết kháng nguyên được đề cập liên kết với BCMA người, nhưng không liên kết với BCMA từ các loài khác. Sáng chế cũng đề cập đến các miền liên kết kháng nguyên mà liên kết với BCMA người và với BCMA từ một hoặc nhiều loài không phải người.

Theo các phương án xác định theo sáng chế, các miền liên kết kháng nguyên được đề cập liên kết với BCMA người và có thể liên kết hoặc không liên kết, tùy từng trường hợp, với một hoặc nhiều BCMA của chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, chuột đồng, chuột nhảy, lợn, mèo, chó, thỏ, dê, cừu, bò, ngựa, lạc đà, khỉ đuôi dài, khỉ đuôi sóc, khỉ nâu hoặc tinh tinh.

Kích hoạt và nhân rộng các tế bào miễn dịch thiết kế

Trước hoặc sau khi làm biến đổi gen của tế bào thiết kế (ví dụ, tế bào T), ngay cả nếu các tế bào miễn dịch biến đổi gen theo sáng chế được kích hoạt và tăng sinh không phụ thuộc vào các cơ chế liên kết kháng nguyên, các tế bào miễn dịch, đặc biệt là tế bào T theo sáng chế có thể được kích hoạt và nhân rộng thêm thường sử dụng các phương pháp như được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ các số 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20060121005. Các tế bào T có thể được nhân rộng *in vitro* hoặc *in vivo*.

Thông thường, các tế bào T theo sáng chế được nhân rộng bằng cách tiếp xúc với tác nhân kích thích phức CD3 TCR và phân tử đồng kích thích trên bề mặt của các tế bào T để tạo ra tín hiệu kích hoạt đối với tế bào T. Ví dụ, các hóa chất như thể mang ion canxi A23187, phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA), hoặc các lectin phân bào như phytohemagglutinin (PHA) có thể được sử dụng để tạo ra tín hiệu kích hoạt đối với tế bào T.

Đối với các ví dụ không giới hạn, các quần thể tế bào T có thể được kích thích *in vitro* như bằng cách tiếp xúc với kháng thể kháng CD3, hoặc đoạn nối kháng nguyên của nó, hoặc kháng thể kháng CD2 được cố định trên bề mặt, hoặc bằng cách tiếp xúc với tác nhân kích hoạt protein kinaza C (ví dụ, bryostatin) cùng với thể mang ion canxi. Để đồng kích thích phân tử phụ trợ trên bề mặt của các tế bào T, phối tử mà liên kết phân tử phụ trợ được sử dụng. Ví dụ, quần thể tế bào T có thể được tiếp xúc với kháng thể kháng CD3 và kháng thể kháng CD28, trong các điều kiện thích hợp để kích thích đáp ứng tăng sinh của các tế bào T. Các điều kiện thích hợp trong nuôi cấy tế bào T bao gồm môi trường thích hợp (ví dụ, môi trường thiết yếu tối thiểu hoặc môi trường RPMI 1640 hoặc X-vivo 5, (Lonza)) có thể chứa các yếu tố cần thiết cho đáp ứng tăng sinh và khả năng sống sót, bao gồm cả huyết thanh (ví dụ, huyết thanh thai bò hoặc người), interleukin-2 (IL-2), insulin, IFN- γ , 1L-4, 1L-7, GM-CSF, IL-10, IL-2, 1L-15, TGF β , và TNF- α hoặc các chất phụ gia khác bất kỳ cho sự sinh trưởng tế bào đã biết đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực. Các chất phụ gia khác cho sự sinh trưởng tế bào bao gồm, không bị giới hạn ở, chất hoạt diện, plasmanate, và các tác nhân khử như N-acetyl-cysteine và 2-mercaptoethanol. Môi trường có thể chứa RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 1, và X-Vivo 20, Optimizer, có bổ sung các axit amin, natri pyruvat, và các vitamin, không được bổ sung huyết thanh hoặc có bổ sung lượng huyết thanh (hoặc huyết tương) hoặc lượng hormone xác định và/hoặc lượng (các) cytokin đủ cho sự sinh trưởng và nhân rộng tế bào T. Các kháng sinh, ví dụ, penicillin và streptomycin, chỉ được bao gồm trong các nuôi cấy thực nghiệm, không được bao gồm trong các nuôi cấy tế bào mà để truyền vào trong đối tượng. Các tế bào đích được duy trì trong các điều kiện cần thiết để hỗ trợ cho sự sinh trưởng, ví dụ, nhiệt độ thích hợp (ví dụ, 37°C) và môi trường khí quyển thích hợp (ví dụ, không khí cộng thêm 5% O₂). Các tế bào T mà đã được tiếp xúc với các thời gian kích thích thay đổi có thể thể hiện các đặc tính khác nhau.

Theo phương án cụ thể khác, các tế bào nêu trên có thể được nhân rộng bằng cách đồng nuôi cấy với mô hoặc tế bào. Các tế bào nêu trên có thể cũng được nhân rộng *in vivo*, ví dụ trong máu của đối tượng sau khi đưa tế bào nêu trên vào trong đối tượng.

Các ứng dụng trị liệu

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa tế bào thiết kế (ví dụ, tế bào T) biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm theo sáng chế và thể mang được dụng. Trong một số trường hợp, tế bào thiết kế tạo ra thuốc, đặc biệt trong liệu pháp điều trị miễn dịch. Trong một số trường hợp, tế bào thiết kế được sử dụng để điều trị ung thư (ví dụ, bệnh đa u tủy xương). Trong một số trường hợp, tế bào thiết kế được sử dụng trong sản xuất thuốc dùng cho liệu pháp điều trị miễn dịch và/hoặc điều trị ung thư (ví dụ, ung thư biểu hiện BCMA).

Sáng chế đề cập đến các phương pháp bao gồm bước dùng cho đối tượng cần thiết chế phẩm trị liệu chứa tế bào thiết kế (ví dụ, tế bào T) biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm như đã thảo luận trong bản mô tả này. Chế phẩm trị liệu có thể chứa tế bào biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm bất kỳ như được bộc lộ trong bản mô tả này và chất mang được dụng, chất pha loãng hoặc thể mang. Như được sử dụng ở đây, cách diễn đạt “đối tượng cần thiết” nghĩa là người hoặc động vật không phải người mà thể hiện một hoặc nhiều triệu chứng hoặc dấu hiệu về ung thư (ví dụ, đối tượng biểu hiện khối u hoặc đang bị loại ung thư bất kỳ trong số các ung thư được nêu trong bản mô tả này), hoặc theo cách khác, đối tượng mà sẽ hưởng lợi từ sự ức chế hoặc giảm hoạt tính BCMA hoặc loại bỏ các tế bào BCMA+ (ví dụ, các tế bào đa u tủy xương).

Tế bào thiết kế theo sáng chế là hữu dụng, không kể các mục đích khác, trong điều trị bệnh hoặc rối loạn bất kỳ trong đó sự kích thích, sự kích hoạt và/hoặc hướng đích đáp ứng miễn dịch sẽ có lợi. Cụ thể, tế bào thiết kế theo sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị, phòng ngừa và/hoặc cải thiện bệnh hoặc rối loạn bất kỳ có liên quan đến hoặc được trung gian bởi sự biểu hiện của BCMA hoặc hoạt tính hoặc sự tăng sinh của tế bào BCMA+. Tế bào biểu hiện BCMA mà có thể được ức chế hoặc tiêu diệt sử dụng tế bào thiết kế theo sáng chế bao gồm, ví dụ, tế bào đa u tủy xương.

Tế bào thiết kế theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan với sự biểu hiện của BCMA bao gồm, ví dụ, ung thư bao gồm bệnh đa u tủy

xương hoặc các ung thư tế bào B hoặc tương bào khác, như bệnh tăng globulin đại phân tử Waldenström, u lymphô Burkitt, và u lymphô tế bào B lớn lan tỏa. Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn biểu hiện BCMA là bệnh Castleman, u lymphô tương bào lymphô, u lymphô dạng nang, u lymphô tế bào vỏ, u lymphô vùng rìa, u lymphô Hodgkin, u lymphô không Hodgkin, hoặc bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính. Theo các phương án xác định theo sáng chế, tế bào thiết kế hữu dụng trong điều trị cho bệnh nhân bị bệnh đa u tủy xương. Theo các phương án liên quan khác theo sáng chế, các phương pháp được đề cập bao gồm bước dùng tế bào thiết kế như được bộc lộ trong bản mô tả này cho bệnh nhân là người bị bệnh đa u tủy xương. Các phương pháp phân tích/chẩn đoán đã biết trong lĩnh vực, như phương pháp quét khối u, v.v., có thể được sử dụng để xác định xem liệu bệnh nhân có bị bệnh đa u tủy xương hoặc ung thư dòng tế bào B khác hay không.

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp để điều trị bệnh ung thư còn lại ở đối tượng. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ung thư còn lại” nghĩa là sự tồn tại hoặc sự tồn lưu của một hoặc nhiều tế bào ung thư ở đối tượng sau khi điều trị bằng liệu pháp chống ung thư.

Theo các khía cạnh xác định, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự biểu hiện của BCMA (ví dụ, bệnh đa u tủy xương) bao gồm việc dùng một quần thể tế bào thiết kế được mô tả ở phần khác trong bản mô tả này cho đối tượng sau khi đối tượng đã được xác định là bị bệnh đa u tủy xương. Ví dụ, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh đa u tủy xương bao gồm bước dùng các tế bào miễn dịch thiết kế cho đối tượng bị bệnh 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần hoặc 4 tuần, 2 tháng, 4 tháng, 6 tháng, 8 tháng, 1 năm, hoặc lâu hơn sau khi đối tượng đã tiếp nhận liệu pháp điều trị miễn dịch hoặc hóa trị liệu khác.

Việc điều trị thảo luận trong bản mô tả này có thể là cải thiện, chữa khỏi hoặc dự phòng. Việc điều trị có thể là một phần của liệu pháp điều trị miễn dịch tự thân hoặc một phần của liệu pháp điều trị miễn dịch dị ghép. Thuật ngữ tự thân có nghĩa là, tế bào, dòng tế bào hoặc quần thể tế bào sử dụng trong điều trị cho đối tượng bị bệnh có nguồn gốc từ đối tượng bị bệnh hoặc từ đối tượng cho tương thích kháng nguyên bạch cầu người (Human Leucocyte Antigen - HLA). Thuật ngữ dị ghép có nghĩa là, tế bào,

dòng tế bào hoặc quần thể tế bào sử dụng trong điều trị cho đối tượng bị bệnh không có nguồn gốc từ đối tượng bị bệnh mà có nguồn gốc từ đối tượng cho.

Các tế bào mà có thể được sử dụng với các phương pháp đã nêu được mô tả trong bản mô tả này. Điều trị có thể được sử dụng để điều trị cho đối tượng được chẩn đoán bị tình trạng ung thư tiền ác tính hoặc ác tính được đặc trưng bởi các tế bào biểu hiện BCMA, nhất là bởi sự dư thừa các tế bào biểu hiện BCMA. Các tình trạng như vậy được tìm thấy trong các bệnh ung thư, như bệnh đa u tủy xương.

Các loại ung thư cần được điều trị bằng các tế bào thiết kế theo sáng chế bao gồm, không bị giới hạn ở, bệnh đa u tủy xương, bệnh tăng globulin đại phân tử Waldenström, u lymphô Burkitt, và u lymphô tế bào B lớn lan tỏa, cũng như các ung thư tế bào B hoặc ung thư tương bào khác. Theo một số phương án, tế bào thiết kế có thể được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn biểu hiện BCMA, như bệnh Castleman, u lymphô tương bào lymphô, u lymphô dạng nang, u lymphô tế bào vỏ, u lymphô vùng rìa, u lymphô Hodgkin, u lymphô không Hodgkin, hoặc bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính.

Chế phẩm và các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị cho đối tượng mà đã được xác định là có tế bào hoặc mô biểu hiện BCMA, hoặc bị nghi ngờ có tế bào hoặc mô biểu hiện BCMA. Ví dụ, các đối tượng hưởng lợi từ việc điều trị theo sáng chế bao gồm các đối tượng bị bệnh đa u tủy xương.

Việc dùng tế bào hoặc quần thể tế bào theo sáng chế có thể được thực hiện theo phương thức thích hợp bất kỳ, bao gồm theo đường khí dung, tiêm, tiêu hóa, truyền, cấy hoặc ghép. Chế phẩm mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng cho đối tượng bị bệnh theo đường dưới da, trong da, trong khối u, trong hạch, trong tủy, trong cơ, theo đường tiêm tĩnh mạch hoặc trong mạch bạch huyết, hoặc theo đường trong phúc mạc. Theo một phương án, chế phẩm tế bào theo sáng chế tốt hơn được dùng theo đường tiêm tĩnh mạch.

Việc dùng tế bào hoặc quần thể tế bào có thể bao gồm bước dùng từ 10^4 đến 10^9 tế bào trên kg thể trọng, tốt hơn từ 10^5 đến 10^6 tế bào/kg thể trọng bao gồm tất cả các giá trị số nguyên về số lượng tế bào bên trong các khoảng này. Tế bào hoặc quần thể tế bào có thể được dùng trong một hoặc nhiều liều. Theo một số phương án, lượng hiệu quả của tế bào được dùng ở dạng liều đơn. Theo một số phương án, lượng hiệu quả của tế bào được dùng ở dạng nhiều hơn một liều trong một giai đoạn thời gian. Việc

xác định thời gian dùng nằm trong sự đánh giá của thầy thuốc lâm sàng và tùy thuộc và tình trạng lâm sàng của đối tượng bị bệnh. Tế bào hoặc quần thể tế bào có thể thu được từ nguồn bất kỳ, như ngân hàng máu hoặc đối tượng cho. Trong khi nhu cầu riêng biệt có sự thay đổi, việc xác định các khoảng của lượng hiệu quả của một loại tế bào xác định đối với một bệnh hoặc tình trạng cụ thể nằm trong phạm vi hiểu biết của người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực. Lượng hiệu quả nghĩa là lượng mà tạo ra lợi ích trị liệu hoặc dự phòng. Liều lượng được dùng sẽ phụ thuộc vào tuổi, sức khỏe và thể trọng của đối tượng nhận, loại điều trị đồng thời nếu có, tần suất điều trị và bản chất của tác dụng mong muốn.

Theo một phương án, lượng hiệu quả của tế bào hoặc chế phẩm chứa các tế bào này được dùng theo đường ngoài tiêu hóa. Đường dùng này có thể là đường tĩnh mạch. Trong một số trường hợp, việc dùng có thể được thực hiện trực tiếp bằng cách tiêm vào bên trong khối u.

Theo các phương án xác định của sáng chế, tế bào được dùng cho đối tượng bị bệnh cùng với (ví dụ, trước khi, đồng thời hoặc tiếp sau) nhiều phương thức điều trị thích hợp bất kỳ, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở việc điều trị bằng các tác nhân như liệu pháp điều trị kháng virus, cidofovir và interleukin-2, Cytarabine (còn được biết là ARA-C) hoặc điều trị bằng natalizumab đối với các đối tượng bị MS hoặc điều trị bằng efalizumab cho các đối tượng bị bệnh vẩy nến hoặc các điều trị khác đối với các đối tượng bị PML. Theo các phương án khác, tế bào T theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với hóa trị liệu, xạ trị, các tác nhân ức chế miễn dịch, như cyclosporin, azathioprine, methotrexate, mycophenolate, và FK506, các kháng thể, hoặc các tác nhân triệt tiêu miễn dịch khác như CAMPATH, các kháng thể kháng CD3 hoặc các liệu pháp điều trị kháng thể khác, xytoxin, fludarabine, cyclosporin, FK506, rapamycin, axit mycoplienolic, steroid, FR901228, xytokin, và xạ trị.

Theo một phương án khác, chế phẩm tế bào theo sáng chế được dùng cho đối tượng bị bệnh cùng với (ví dụ, trước khi, đồng thời hoặc tiếp sau) liệu pháp ghép tủy xương, liệu pháp triệt tiêu tế bào T sử dụng các tác nhân hóa trị liệu như, fludarabine, liệu pháp xạ trị chùm tia ngoài (external-beam radiation therapy - XRT), cyclophosphamide, hoặc các kháng thể như OKT3 hoặc CAMPATH. Theo phương án khác, chế phẩm tế bào theo sáng chế được dùng sau liệu pháp triệt tiêu tế bào B như các tác nhân mà chúng phản ứng với CD20, ví dụ, Rituxan. Ví dụ, theo một phương

án, các đối tượng trải qua phương pháp điều trị chuẩn bằng hóa trị liệu liều cao, tiếp theo bằng phương pháp ghép tế bào gốc trong máu ngoại vi. Theo các phương án xác định, sau khi ghép, các đối tượng tiếp nhận truyền tế bào miễn dịch được nhân rộng theo sáng chế. Theo một phương án bổ sung, các tế bào nhân rộng được dùng trước hoặc sau phẫu thuật. Theo các phương án xác định, các phương tiện bất kỳ (ví dụ, phẫu thuật, hóa trị liệu, hoặc liệu pháp xạ trị) có thể được sử dụng để giảm thiểu gánh nặng khối u trước khi dùng tế bào miễn dịch nhân rộng theo sáng chế. Theo một phương án, việc giảm thiểu gánh nặng khối u trước khi dùng tế bào thiết kế theo sáng chế có thể làm giảm tiềm ẩn về, hoặc dự phòng, hội chứng giải phóng xytokin hoặc cơn bão xytokin, tác dụng phụ mà có thể kết hợp với liệu pháp điều trị tế bào T CAR.

Liệu pháp điều trị phối hợp

Sáng chế đề cập đến các phương pháp bao gồm việc dùng tế bào thiết kế hoặc quần thể tế bào chứa các thụ thể kháng nguyên khả năng bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung. Các tác nhân trị liệu bổ sung minh họa mà có thể được kết hợp với hoặc được dùng kết hợp với tế bào hoặc quần thể tế bào theo sáng chế bao gồm, ví dụ, tác nhân chống khối u (ví dụ, tác nhân hóa trị liệu bao gồm melphalan, vincristine (Oncovin), cyclophosphamide (Cytosan), etoposide (VP-16), doxorubicin (Adriamycin), doxorubicin liposom (Doxil), obendamine (Treanda), hoặc các tác nhân khác bất kỳ được biết có hiệu quả trong việc điều trị khối u tương bào ở đối tượng.). Theo một số phương án, tác nhân trị liệu thứ hai bao gồm các steroid. Theo một số phương án, tác nhân trị liệu thứ hai bao gồm các liệu pháp trị liệu hướng đích bao gồm thalidomide, lenalidomide, và bortezomib, đây là các liệu pháp điều trị được phê chuẩn để điều trị các đối tượng bị bệnh mới được chẩn đoán. Lenalidomide, pomalidomide, bortezomib, carfilzomib, panobinostat, ixazomib, elotuzumab, và daratumumab là ví dụ về tác nhân trị liệu thứ hai hiệu quả trong điều trị bệnh u tủy tái phát. Theo các phương án xác định, tác nhân trị liệu thứ hai là phác đồ bao gồm liệu pháp xạ trị hoặc ghép tế bào gốc. Theo các phương án xác định, tác nhân trị liệu thứ hai có thể là tác nhân điều hòa miễn dịch. Theo các phương án xác định, tác nhân trị liệu thứ hai có thể là chất ức chế proteasome, bao gồm bortezomib (Velcade), carfilzomib (Kyprolis), ixazomib (Ninlaro). Theo các phương án xác định, tác nhân trị liệu thứ hai có thể là chất ức chế

histone deacetylase như panobinostat (Farydak). Theo các phương án xác định, tác nhân trị liệu thứ hai có thể là kháng thể đơn dòng, thể liên hợp thuốc - kháng thể, kháng thể đặc hiệu kép liên hợp với tác nhân chống khối u, chất ức chế điểm kiểm tra hoặc tổ hợp của chúng. Các tác nhân khác mà có thể được dùng thuận lợi kết hợp với các phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm các chất ức chế xytokin, bao gồm các chất ức chế xytokin phân tử nhỏ và các kháng thể mà chúng liên kết với xytokin như IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, hoặc với các thụ thể tương ứng của chúng. Dược phẩm theo sáng chế (ví dụ, dược phẩm chứa tế bào thiết kế hoặc quần thể tế bào như được bộc lộ trong bản mô tả này) có thể cũng được dùng như một phần của phác đồ trị liệu bao gồm một hoặc nhiều tổ hợp trị liệu được chọn từ kháng thể đơn dòng khác với các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này, chúng có thể tương tác với kháng nguyên khác trên bề mặt tương bào, kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể này có một nhánh liên kết với kháng nguyên trên bề mặt tế bào khối u và nhánh kia liên kết với kháng nguyên trên tế bào T, thể liên hợp thuốc - kháng thể, kháng thể đặc hiệu kép liên hợp với tác nhân chống khối u, chất ức chế điểm kiểm tra, ví dụ, điểm kiểm tra mà nó nhằm vào, PD-1 hoặc CTLA-4, hoặc tổ hợp của chúng. Theo các phương án xác định, chất ức chế điểm kiểm tra có thể được chọn từ các chất ức chế PD-1, như pembrolizumab (Keytruda), nivolumab (Opdivo), hoặc cemiplimab (REGN2810). Theo các phương án xác định, chất ức chế điểm kiểm tra có thể được chọn từ các chất ức chế PD-L1, như atezolizumab (Tecentriq), avelumab (Bavencio), hoặc Durvalumab (Imfinzi)). Theo các phương án xác định, chất ức chế điểm kiểm tra có thể được chọn từ các chất ức chế CTLA-4, như ipilimumab (Yervoy).

Sáng chế cũng đề cập đến các liệu pháp điều trị kết hợp bao gồm tế bào thiết kế bất kỳ hoặc quần thể tế bào được nêu trong bản mô tả này và chất ức chế của một hoặc nhiều trong số VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- α , PDGFR- β , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, uroplakin, hoặc xytokin bất kỳ trong số các xytokin nêu trên, trong đó chất ức chế là aptamer, phân tử đối nghĩa, ribozyme, siARN, kháng thể peptit, nanobody hoặc đoạn kháng thể (ví dụ, đoạn Fab; đoạn F(ab')₂; đoạn Fd; đoạn Fv; scFv; đoạn dAb; hoặc các phân tử thiết kế khác, như diabody, triabody, tetrabody, minibody và các đơn vị nhận biết tối thiểu). Theo một số phương án, tế bào thiết kế

hoặc quần thể tế bào theo sáng chế có thể cũng được dùng như một phần của phác đồ điều trị mà cũng bao gồm cả xạ trị và/hoặc hóa trị liệu thông thường.

(Các) thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung có thể được dùng ngay trước, đồng thời với hoặc ngay sau khi dùng tế bào thiết kế theo sáng chế; (đối với các mục đích của sáng chế này, các phác đồ dùng như vậy được xem là dùng tế bào thiết kế “kết hợp với” thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung).

Sáng chế đề cập đến được phẩm trong đó tế bào thiết kế hoặc quần thể tế bào theo sáng chế được đồng phối chế với một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung như được mô tả trong bản mô tả này ở phần khác bất kỳ.

Phác đồ sử dụng

Theo các phương án xác định theo sáng chế, nhiều liều tế bào thiết kế có thể được dùng cho đối tượng trong một tiến trình thời gian xác định. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm việc lần lượt dùng cho đối tượng nhiều liều tế bào. Như được sử dụng ở đây, “lần lượt dùng” nghĩa là, mỗi một liều được dùng cho đối tượng tại một thời điểm khác theo thời gian, ví dụ, vào ngày khác được tách biệt bởi một khoảng thời gian xác định trước (ví dụ, giờ, ngày, tuần hoặc tháng). Sáng chế đề cập đến các phương pháp bao gồm bước lần lượt dùng cho đối tượng bị bệnh một liều đơn đầu tiên, tiếp theo bằng một hoặc nhiều liều thứ hai, và tùy ý tiếp theo bằng một hoặc nhiều liều thứ ba.

Thuật ngữ “liều đầu tiên,” “liều thứ hai,” và “liều thứ ba,” để chỉ trình tự về thời gian dùng tế bào thiết kế theo sáng chế. Do vậy, “liều đầu tiên” là liều mà được dùng khi bắt đầu phác đồ điều trị (cũng được gọi là “liều cơ sở”); “liều thứ hai” là liều được dùng sau liều đầu tiên; và “liều thứ ba” là liều được dùng sau liều thứ hai. Các liều đầu tiên, thứ hai, và thứ ba tất cả có thể chứa cùng lượng tế bào thiết kế, nhưng thường có thể khác nhau về tần suất dùng. Tuy nhiên, theo các phương án xác định, lượng tế bào thiết kế được chứa trong các liều đầu tiên, thứ hai và/hoặc thứ ba là khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh tăng hoặc giảm khi thích hợp) trong tiến trình điều trị. Theo các phương án xác định, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5) liều được dùng khi bắt đầu phác đồ điều trị ở dạng “liều nạp” tiếp theo bằng các liều tiếp sau được dùng trên cơ sở tần suất giảm (ví dụ, “các liều duy trì”).

Theo một phương án minh họa của sáng chế, mỗi một liều thứ hai và/hoặc thứ ba được dùng từ 1 đến 26 (ví dụ, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, hoặc hơn) tuần sau liều ngay trước đó. Câu “liều ngay trước đó,” như được sử dụng ở đây, nghĩa là, trong trình tự nhiều lần dùng, liều mà được dùng cho đối tượng bị bệnh trước khi dùng liều ngay tiếp theo trong trình tự không có liều nào xen vào giữa.

Các phương pháp theo khía cạnh này theo sáng chế có thể bao gồm việc dùng cho đối tượng bị bệnh số lượng liều thứ hai và/hoặc thứ ba bất kỳ. Ví dụ, theo các phương án xác định, duy nhất một liều thứ hai được dùng cho đối tượng bị bệnh. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) liều thứ hai được dùng cho đối tượng bị bệnh. Tương tự, theo các phương án xác định, chỉ duy nhất một liều thứ ba được dùng cho đối tượng bị bệnh. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) liều thứ ba được dùng cho đối tượng bị bệnh.

Trong các phương án liên quan đến nhiều liều thứ hai, mỗi một liều thứ hai có thể được dùng với tuần suất tương tự như các liều thứ hai khác. Ví dụ, mỗi một liều thứ hai có thể được dùng cho đối tượng bị bệnh từ 1 đến 2 tuần sau liều ngay trước đó. Tương tự, trong các phương án liên quan đến các liều thứ ba, mỗi một liều thứ ba có thể được dùng với tuần suất tương tự như các liều thứ ba khác. Ví dụ, mỗi một liều thứ ba có thể được dùng cho đối tượng bị bệnh từ 2 đến 4 tuần sau liều ngay trước đó. Theo cách khác, tuần suất mà các liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba được dùng cho đối tượng bị bệnh với tuần suất này có thể thay đổi theo tiến trình của phác đồ điều trị. Tuần suất dùng có thể cũng được điều chỉnh trong tiến trình điều trị bởi thầy thuốc lâm sàng tùy thuộc vào nhu cầu của từng đối tượng bị bệnh sau thăm khám lâm sàng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được đưa ra để cung cấp cho người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực sự bộc lộ và mô tả đầy đủ về cách thực hiện và sử dụng các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế, và không dự định để giới hạn phạm vi mà các tác giả sáng chế nhằm tới. Các nỗ lực được đưa ra để đảm bảo độ tính chính về các con số được sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v..) nhưng một số sai số và độ lệch trong thực nghiệm

cần được tính đến. Trừ khi được chỉ rõ theo cách khác, các phần là phần theo trọng lượng, trọng lượng phân tử là trọng lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là độ bách phân, và áp suất là tại hoặc cấp áp suất khí quyển.

Ví dụ 1: Tạo ra các kháng thể kháng BCMA

Các kháng thể kháng BCMA thu được bằng cách gây miễn dịch chuột biến đổi gen bằng kháng nguyên BCMA người (ví dụ, hBCMA, SEQ ID NO: 101), hoặc bằng cách gây miễn dịch chuột biến đổi gen chứa ADN mã hóa các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kappa của globulin miễn dịch người bằng kháng nguyên BCMA người.

Sau khi gây miễn dịch, các tế bào lách được thu hoạch từ mỗi một chuột và (1) được dung hợp với các tế bào u tủy của chuột để bảo tồn khả năng sống sót của chúng và tạo ra các tế bào lai và được sàng lọc về tính đặc hiệu BCMA hoặc (2) được phân loại tế bào B (như được mô tả trong công bố đơn Mỹ số US 2007/0280945A1) sử dụng đoạn BCMA người làm tác nhân phản ứng phân loại mà nó liên kết và nhận dạng các kháng thể phản ứng (các tế bào B dương tính kháng nguyên).

Các kháng thể kháng với BCMA đầu tiên được phân lập có vùng biến đổi của người và vùng ổn định của chuột. Các kháng thể được định rõ đặc điểm và được lựa chọn về các đặc tính mong muốn, bao gồm ái lực, tính chọn lọc, v.v.. Nếu cần thiết, các vùng ổn định của chuột được thay thế bằng vùng ổn định mong muốn của người, ví dụ vùng ổn định kiểu hoang dại hoặc vùng ổn định IgG1 được làm biến đổi hoặc vùng ổn định IgG4, để tạo ra kháng thể kháng BCMA người đầy đủ. Trong khi vùng ổn định lựa chọn có thể thay đổi tùy theo việc sử dụng cụ thể, các đặc tính liên kết kháng nguyên ái lực cao và tính đặc hiệu hướng đích tập trung vào vùng biến đổi.

Các trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và trình tự axit nucleic của các kháng thể kháng BCMA: Bảng 1 đưa ra các bộ nhận dạng trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và CDR của các kháng thể kháng BCMA lựa chọn theo sáng chế. Các bộ nhận dạng trình tự axit nucleic tương ứng được đưa ra trong bảng 2.

Bảng 1: Các bộ nhận dạng trình tự axit amin

	Trình tự SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb16716	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb16732	34	36	38	40	42	44	46	48
mAb16747	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb21581	66	68	70	72	74	76	78	80

Bảng 2: Các bộ nhận dạng trình tự axit nucleic

	Trình tự SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb16711	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb16716	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb16732	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb16747	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb21581	65	67	69	71	73	75	77	79

Ví dụ 2: Tạo ra các thụ thể kháng nguyên khảm đặc hiệu BCMA

Sáu kháng thể kháng BCMA (mAb16711, mAb16716, mAb16732, mAb16747, và mAb21581) được định dạng lại thành các đoạn biến đổi chuỗi đơn VL-VH (ScFv) và được đưa vào trong cấu trúc thụ thể kháng nguyên khảm (CAR) mà cấu trúc này sử dụng miền bản lề và miền xuyên màng CD8 α , miền đồng kích thích 4-1BB, và miền kích thích CD3 ζ . Các CAR đặc hiệu BCMA được tách dòng vào trong vector biểu hiện lentivirus (hệ biểu hiện Lenti-X™ Bicistronic (Neo), Clontech Cat# 632181) và các hạt lentivirus được tạo ra thông qua hệ Lenti-X Packaging Single-Shot (VSV-G) (Clontech Cat # 631276) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào Jurkat được thiết kế để biểu hiện gen chỉ thị luciferaza NFAT (Jurkat/NFATLuc cl. 3C7) sau đó được tải nạp bằng các cấu trúc CAR khác sử dụng các đĩa được phủ trước RetroNectin® (Clontech, Cat# T110a) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi lựa chọn trong ít nhất 2 tuần trong 500 μ g/ml G418 (Gibco, Cat # 11811-098), các dòng tế bào CAR-T sau đây

được tạo ra; Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16716 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16711 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16732 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 16747 VL-VH CART, Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/BCMA 21581 VL-VH CART. Các trình tự nucleotit của các cấu trúc CAR sử dụng để tạo ra các dòng tế bào CAR-T, như được minh họa trên Fig. 1, được thể hiện trong các trình tự SEQ ID NO: 81 (mAb16711 VL/VH), 83 (mAb16716 VL/VH), 85 (mAb16732 VL/VH), 87 (mAb16747 VL/VH), và 89 (mAb21581 VL/VH). Sáu dòng tế bào CAR-T này được sử dụng để đánh giá sự biểu hiện trên bề mặt tế bào và sự kích hoạt các tế bào CAR BCMA-T, như được thảo luận trong ví dụ 3.

Các thụ thể kháng nguyên khả năng chứa kháng BCMA VL-VH scFv, miền xuyên màng huCD8, miền đồng kích thích 4-1BB, và miền tín hiệu CD3 ζ được cấu trúc sử dụng các trình tự nucleotit VL và VH của hai kháng thể kháng BCMA, mAb21581 và mAb16747 (lần lượt tương ứng với các trình tự SEQ ID NO: 89 và 87). Đối với đối chứng không liên kết, CAR tương tự được thiết kế sử dụng trình tự nucleotit của scFv không thích hợp (cấu trúc CAR của SEQ ID NO: 91). Các CAR này được tách dòng vào trong vector lentivirus pLVX bằng trình tự khởi đầu phiên mã EF1a và trình tự IRES:eGFP (để theo dõi các tế bào biến nạp CAR) và lentivirus kiểu giả VSV được tạo ra.

Các tế bào T CD3⁺ được phân lập từ các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi của người (PBMCs), được kích thích bằng các vi hạt CD3/CD28 cộng thêm 100 U/ml IL-2 người tái tổ hợp, và được chuyển đổi bằng lentivirus ở mức MOI=5. Các tế bào biến nạp được nhân rộng trong 3 tuần bằng các vi hạt CD3/CD28 cộng thêm 100 U/ml IL-2 người tái tổ hợp trước khi được bảo quản lạnh cho tới khi sử dụng trong thực nghiệm *in vivo*. Ba dòng tế bào CAR-T này được sử dụng để đánh giá hiệu quả trong việc làm giảm gánh nặng khối u *in vivo*, như được thảo luận trong các ví dụ 4 và 5.

Ví dụ 3: Sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của các cấu trúc CAR BCMA ở các tế bào Jurkat và sự kích hoạt của các tế bào CAR-T BCMA

Sự biểu hiện trên bề mặt tế bào liên quan của các cấu trúc CAR BCMA ở các tế bào Jurkat/NFATLuc được tiếp cận bằng đếm tế bào theo dòng chảy. Để nhuộm, các tế bào được cấy trong dung dịch đệm nhuộm (PBS, không chứa canxi và magie (Irving 9240) + 2% FBS (ATCC 30-2020) ở mật độ 200000 tế bào trên mỗi lỗ trong đĩa đáy

chữ V 96 lỗ và được nhuộm trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C bằng 10 ug/ml miễn ngoại bào BCMA được dung hợp với hIgG1-Fc (BCMA ecto-hFc) hoặc protein không liên quan được dung hợp với hIgG1-Fc (đối chứng Fc isotype). Sau khi ủ với đối chứng BCMA-hFc hoặc Fc isotype, các tế bào được rửa một lần trong dung dịch đệm nhuộm, và được nhuộm bằng kháng thể thứ phát được liên hợp Alexa-Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch, Cat # 109-606-170) ở nồng độ 10 µg/ml trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, các tế bào được rửa và cố định sử dụng dung dịch 50% chứa BD Cytotfix (BD, Cat # 554655) được pha loãng trong dung dịch đệm nhuộm. Các mẫu được cho chạy trên hệ thống đếm tế bào dòng chảy Intellicyt iQue và được phân tích bằng FlowJo 10.2 để tính toán cường độ huỳnh quang trung bình (MFI). Tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S:N) được xác định bằng cách lấy tỷ lệ giữa đối chứng BCMA-hFc hoặc Fc isotype MFI trên kháng thể thứ phát duy nhất MFI.

Hoạt tính của các dòng CAR-T được đánh giá trong thử nghiệm sinh học CAR-T/APC (tế bào trình diện kháng nguyên). Để tiến hành thử nghiệm sinh học, 50000 tế bào CAR-T được bổ sung vào các đĩa màu trắng 96 lỗ Thermo-Nunc (Thermo Scientific, Cat # 136101) trong 50 µl môi trường thử nghiệm (môi trường RPMI với 10% FBS và 1% P/S/G) tiếp theo bằng cách bổ sung loạt dung dịch pha loãng 3 lần của các tế bào trình diện kháng nguyên (500000 tế bào thành 685 tế bào) trong 50 µl môi trường thử nghiệm. Các tế bào trình diện kháng nguyên sau được sử dụng: RAJI, Daudi, RPMI8226 (biểu hiện BCMA theo kiểu nội sinh), và HEK293 (BCMA âm). Hỗn hợp tế bào được ủ trong 37°C, 5% CO₂, tủ ủ được làm ấm trong 5 giờ. Hoạt tính luciferaza NFAT được xác định sử dụng Promega One-Glo (Cat# E6130) và thiết bị đọc đĩa Perkin Elmer Envision. Các đơn vị luciferaza tương đối (RLU) được tạo ra và được vẽ đồ thị trong phần mềm GraphPad Prism sử dụng phương trình logistic 4 tham số theo đường cong đáp ứng 8 điểm. Điều kiện APC bằng 0 đối với mỗi một đường cong đáp ứng liều lượng cũng được bao gồm trong phân tích ở dạng nối tiếp của loạt dung dịch pha loãng gấp 3 lần và được trình bày ở dạng liều lượng thấp nhất. Hoạt tính CAR-T được xác định bằng cách lấy tỷ lệ của RLU cao nhất ở đường cong trên trị số thấp nhất và được trình bày ở dạng tín hiệu:nhiều (S:N) trong bảng 4.

Bảng 3 chứng minh rằng, các CAR-T 16747 và 21581 có sự biểu hiện bề mặt tương tự với tỷ lệ S:N nằm trong khoảng từ 209-273, CAR-T 16716 biểu hiện ở mức

gấp 44 lần cao hơn mức cơ sở, trong khi sự biểu hiện CAR 16732 và 16711 thấp hơn nhiều với S:N lần lượt là 13 và 4.

Bảng 4 chứng minh rằng, tất cả 6 dòng tế bào CAR BCMA-T được kích hoạt bởi các tế bào RAJI, Daudi và RPMI8226. Không có dòng tế bào CAR-T nào được kích hoạt bởi HEK293. CAR BCMA 16747 có sự kích hoạt mạnh nhất trong thử nghiệm sinh học CAR-T/APC trong khi CAR 16711 có hoạt tính yếu nhất bất luận tế bào trình diện kháng nguyên biểu hiện BCMA như thế nào. Sau cùng, sự tương quan giữa sự biểu hiện CAR (bảng 3) và hoạt tính CAR (bảng 4) được quan sát.

Bảng 3: Sự liên kết FC-BCMA hòa tan trên các dòng tế bào CAR BCMA-T

Dòng tế bào	S:N (BCMA-hFc)	S:N (Isotype-hFc)
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7	1,5	0,8
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/ 16716 VL-VH CART	44,0	1,1
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/ 16711 VL-VH CART	3,7	1,2
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/ 16732 VL-VH CART	13,1	1,0
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/ 16747 VL-VH CART	209,2	1,3
Jurkat/NFATLuc cl. 3C7/ 21581 VL-VH CART	224,5	1,2

Bảng 4: Sự kích hoạt của CAR BCMA-T trong thử nghiệm sinh học CAR-T/APC

Tế bào trình diện kháng nguyên	Hoạt tính CAR-T cực đại					
	Không có CAR	16716	16711	16732	16747	21581
RAJI	1,2	16,3	7,9	16,8	38,9	26,9
Daudi	1,0	6,4	2,6	4,9	14,0	8,0
RPMI8226	0,8	6,6	1,8	5,2	12,5	12,3
HEK293	0,9	0,8	0,9	0,8	0,9	0,9

Ví dụ 4: Các tế bào CAR-T hướng đích BCMA làm giảm sự phát triển của các khối u biểu hiện BCMA (OPM-2) *in vivo* ở mẫu khối u ghép khác loài

Để xác định hiệu quả *in vivo* của tế bào T thụ thể kháng nguyên khảm (CAR) hướng đích BCMA, nghiên cứu về khối u ghép khác loài được tiến hành ở chuột sử dụng tế bào đa u tủy xương người OPM-2, các tế bào này biểu hiện mức BCMA cao.

Cấy ghép và đo các khối u ghép khác loài: Vào ngày 0, chuột NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) suy giảm miễn dịch được dùng theo đường tĩnh mạch 2×10^6 tế bào khối u đa u tủy xương người BCMA⁺ OPM-2 mà chúng được thiết kế để

cũng biểu hiện luciferaza đom đóm (tế bào OPM-2-luciferaza). Vào ngày 21, chuột được tiêm theo đường tĩnh mạch bằng 2×10^6 tế bào T biểu hiện CAR đối chứng hoặc CAR kháng BCMA (được xác định bởi tần suất tế bào biểu hiện GFP, đây là chỉ dấu của các tế bào mà chúng đã được tải nạp bằng CAR). Chuột ($n=5$ mỗi nhóm) được dùng 2×10^6 scFc CAR T không liên quan (scFv CAR đối chứng), 2×10^6 CAR T kháng BCMA mã hóa 21581 scFv CAR, hoặc 2×10^6 CAR T kháng BCMA mã hóa 16747 scFv. Sự phát triển của khối u được đánh giá cho tới ngày 61 bằng cách xác định sự phát huỳnh quang sinh học khối u (BLI) ở động vật được gây mê. Để làm đối chứng dương, một nhóm chuột ($n=5$) chỉ được dùng tế bào OPM-2-luciferaza, nhưng không dùng các tế bào T. Để đo các mức BLI cơ sở, một nhóm chuột ($n=5$) không được điều trị và không tiếp nhận các khối u hoặc tế bào T.

Xác định sự phát triển của khối u ghép khác loài: Phép ghi hình ảnh BLI được sử dụng để xác định gánh nặng khối u. Chuột được tiêm theo đường trong phúc mạc bằng 150 mg/kg chất nền luciferaza D-luciferin được tạo huyền phù trong PBS. Năm phút sau lần tiêm này, việc ghi hình ảnh BLI của chuột được tiến hành trong điều kiện gây mê bằng isoflurane sử dụng hệ thống Xenogen IVIS. Việc thu hình ảnh được thực hiện bằng trường quan sát tại D, độ cao đối tượng 1,5 cm, và mức phân khoảng trung bình với thời gian lộ sáng tự động được xác định bằng phần mềm Living Image Software. Các tín hiệu BLI được trích xuất sử dụng phần mềm Living Image software: các vùng mong muốn được vẽ xung quanh mỗi một khối u và cường độ photon được ghi lại ở dạng p/s/cm²/sr.

Trong khi các khối u BCMA⁺ OPM-2-luciferaza phát triển tăng dần ở chuột tiếp nhận các tế bào scFv CAR T không liên quan, các tế bào CAR T mã hóa cho 21581 scFv CAR làm giảm gánh nặng khối u xuống mức cơ sở ở phần lớn động vật và tế bào CAR T mã hóa cho 16747 scFv CAR làm giảm gánh nặng khối u xuống mức cơ sở ở tất cả các động vật. Kết quả được thể hiện trong bảng 5a dưới đây.

Bảng 5a: Kích thước khối u trung bình (theo phát quang) tại các thời điểm khác nhau

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 5 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	6,22E+05 $\pm$ 2,77E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	5,62E+05 $\pm$ 2,75E+04

CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	$5,95E+05 \pm 2,40E+04$
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	$6,07E+05 \pm 3,97E+04$
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	$5,54E+05 \pm 2,80E+04$

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 11 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	$6,90E+05 \pm 3,64E+04$
Không có CAR T (đối chứng dương)	$6,22E+05 \pm 3,34E+04$
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	$6,80E+05 \pm 2,76E+04$
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	$7,13E+05 \pm 2,90E+04$
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	$6,30E+05 \pm 2,42E+04$

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 20 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	$7,59E+05 \pm 5,82E+04$
Không có CAR T (đối chứng dương)	$2,32E+06 \pm 2,94E+05$
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	$2,80E+06 \pm 5,26E+05$
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	$3,06E+06 \pm 4,42E+05$
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	$2,53E+06 \pm 2,22E+05$

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 26 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	$5,51E+05 \pm 2,51E+04$
Không có CAR T (đối chứng dương)	$5,96E+06 \pm 8,74E+05$
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	$8,03E+06 \pm 1,41E+06$
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	$6,76E+06 \pm 1,34E+06$
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	$6,96E+06 \pm 3,39E+05$

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 31 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	$6,62E+05 \pm 3,35E+04$
Không có CAR T (đối chứng dương)	$1,58E+07 \pm 4,84E+06$
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	$1,57E+07 \pm 3,05E+06$
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	$1,44E+07 \pm 2,12E+06$
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	$1,01E+07 \pm 5,46E+05$

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 34 ngày sau khi cấy ghép
---------------------	--

	(trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	4,57E+05 $\pm$ 1,04E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	3,36E+07 $\pm$ 1,27E+07
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	3,00E+07 $\pm$ 2,82E+06
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	2,05E+07 $\pm$ 3,56E+06
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	8,31E+06 $\pm$ 9,79E+05

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm²/sr] 38 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	6,60E+05 $\pm$ 3,13E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	3,91E+07 $\pm$ 6,87E+06
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	4,25E+07 $\pm$ 5,08E+06
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	2,19E+07 $\pm$ 7,88E+06
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	1,90E+06 $\pm$ 1,20E+06

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm²/sr] 40 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	5,39E+05 $\pm$ 9,67E+03
Không có CAR T (đối chứng dương)	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	1,13E+07 $\pm$ 4,84E+06
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	8,71E+05 $\pm$ 2,80E+05

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm²/sr] 47 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	7,73E+05 $\pm$ 1,91E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	3,17E+07 $\pm$ 3,11E+07
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	8,85E+05 $\pm$ 3,72E+04

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm²/sr] 54 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
----------------------------	--

Không có khối u (BLI cơ sở)	7,49E+05 ± 1,95E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2x10 ⁶ tế bào	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶ tế bào	4,34E+07 ± 4,29E+07
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶ tế bào	8,24E+05 ± 5,48E+04

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 61 ngày sau khi cấy ghép (trung bình ± SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	6,18E+05 ± 2,77E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2x10 ⁶ tế bào	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2x10 ⁶ tế bào	6,41E+05 ± 4,07E+04
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2x10 ⁶ tế bào	5,40E+05 ± 2,93E+04

Thực nghiệm khác được tiến hành như được thảo luận ở trên, ngoại trừ chuột được tiêm theo đường tĩnh mạch bằng 2x10⁶ tế bào T biểu hiện CAR đối chứng hoặc CAR kháng BCMA vào ngày 22 (thay vì ngày 21), và sự phát triển của khối u được đánh giá cho tới ngày 56 (thay vì ngày 61).

Trong khi các khối u BCMA⁺ OPM-2-luciferaza phát triển tăng dần ở chuột tiếp nhận các tế bào scFv CAR T không liên quan, tế bào CAR T mã hóa cho các scFv CAR 21581 và 16747 làm giảm gánh nặng khối u xuống mức cơ sở ở tất cả các động vật. Kết quả được thể hiện trong bảng 5b dưới đây.

Bảng 5b: Kích thước khối u trung bình (theo phát quang) tại các thời điểm khác nhau

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 14 ngày sau khi cấy ghép (trung bình ± SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	6,72E+05 ± 1,50E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	7,93E+05 ± 8,18E+04
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2x10 ⁶ tế bào	7,09E+05 ± 2,13E+04
CAR kháng BCMA (21581N scFv) 2x10 ⁶ tế bào	7,87E+05 ± 1,20E+05
CAR kháng BCMA (16747P scFv) 2x10 ⁶ tế bào	8,93E+05 ± 9,05E+04

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 20 ngày sau khi cấy ghép
---------------------	--

	(trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	5,32E+05 $\pm$ 3,64E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	3,07E+06 $\pm$ 3,01E+05
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	2,91E+06 $\pm$ 2,46E+05
CAR kháng BCMA (21581N scFv) 2×10^6 tế bào	2,57E+06 $\pm$ 8,27E+05
CAR kháng BCMA (16747P scFv) 2×10^6 tế bào	3,13E+06 $\pm$ 5,97E+05

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm²/sr] 23 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	5,56E+05 $\pm$ 4,29E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	1,01E+07 $\pm$ 1,28E+06
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	8,37E+06 $\pm$ 1,38E+06
CAR kháng BCMA (21581N scFv) 2×10^6 tế bào	1,00E+07 $\pm$ 3,92E+06
CAR kháng BCMA (16747P scFv) 2×10^6 tế bào	8,26E+06 $\pm$ 1,59E+06

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm²/sr] 27 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	5,18E+05 $\pm$ 2,87E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	1,67E+07 $\pm$ 1,54E+06
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	1,47E+07 $\pm$ 2,36E+06
CAR kháng BCMA (21581N scFv) 2×10^6 tế bào	1,59E+07 $\pm$ 6,36E+06
CAR kháng BCMA (16747P scFv) 2×10^6 tế bào	1,03E+07 $\pm$ 1,71E+06

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm²/sr] 30 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	5,18E+05 $\pm$ 1,29E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	1,93E+07 $\pm$ 3,10E+06
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	2,03E+07 $\pm$ 2,48E+06
CAR kháng BCMA (21581N scFv) 2×10^6 tế bào	7,21E+06 $\pm$ 1,97E+06
CAR kháng BCMA (16747P scFv) 2×10^6 tế bào	1,16E+07 $\pm$ 3,61E+06

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm²/sr] 34 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	5,66E+05 $\pm$ 3,76E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	3,69E+07 $\pm$ 6,27E+06
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	4,07E+07 $\pm$ 4,13E+06
CAR kháng BCMA (21581N scFv) 2×10^6 tế bào	5,74E+05 $\pm$ 1,24E+04

CAR kháng BCMA (16747P scFv) 2×10^6 tế bào	$1,66E+06 \pm 9,09E+05$
---	-------------------------

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 38 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	$5,43E+05 \pm 3,32E+04$
Không có CAR T (đối chứng dương)	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	$5,87E+07 \pm 5,72E+06$
CAR kháng BCMA (21581N scFv) 2×10^6 tế bào	$5,39E+05 \pm 1,58E+04$
CAR kháng BCMA (16747P scFv) 2×10^6 tế bào	$5,55E+05 \pm 5,02E+04$

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 44 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	$6,42E+05 \pm 3,33E+04$
Không có CAR T (đối chứng dương)	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR kháng BCMA (21581N scFv) 2×10^6 tế bào	$6,68E+05 \pm 3,09E+04$
CAR kháng BCMA (16747P scFv) 2×10^6 tế bào	$5,39E+05 \pm 2,25E+04$

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 56 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	$8,10E+05 \pm 5,92E+04$
Không có CAR T (đối chứng dương)	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR kháng BCMA (21581N scFv) 2×10^6 tế bào	$6,37E+05 \pm 2,71E+04$
CAR kháng BCMA (16747P scFv) 2×10^6 tế bào	$7,13E+05 \pm 4,17E+04$

Ví dụ 5: Các tế bào CAR-T hướng đích BCMA làm giảm sự phát triển của các khối u biểu hiện BCMA (MOLP-8) *in vivo* ở mẫu khối u ghép khác loài

Để xác định hiệu quả *in vivo* của tế bào T chứa thụ thể kháng nguyên khảm (CAR) hướng đích BCMA, nghiên cứu về khối u ghép khác loài được tiến hành ở chuột sử dụng các tế bào đa u tủy xương ở người MOLP-8, các tế bào này biểu hiện mức BCMA thấp.

Cấy ghép và đo các khối u ghép khác loài: Vào ngày 0, chuột NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) suy giảm miễn dịch được dùng theo đường tĩnh mạch

2×10^6 tế bào khối u đa u tủy xương người BCMA⁺ MOLP-8 được thiết kế để cũng biểu hiện luciferaza đom đóm (tế bào MOLP-8-luciferaza). Vào ngày 12, chuột được tiêm theo đường tĩnh mạch bằng 2×10^6 tế bào T biểu hiện CAR đối chứng hoặc CAR kháng BCMA (được xác định bởi tần suất của tế bào biểu hiện GFP, đây là chỉ dấu của các tế bào mà chúng đã được tải nạp bằng CAR). Chuột (n=5 mỗi nhóm) được dùng 2×10^6 scFv CAR T không liên quan (scFv CAR đối chứng), 2×10^6 CAR T kháng BCMA mã hóa cho 21581 scFv CAR, hoặc 2×10^6 CAR T kháng BCMA mã hóa cho 16747 scFv. Sự phát triển của khối u được đánh giá trong suốt thực nghiệm bằng cách đo sự phát huỳnh quang sinh học của khối u (BLI) ở động vật được gây mê. Để làm đối chứng dương, một nhóm chuột (n=5) chỉ được dùng tế bào MOLP-8-luciferaza, nhưng không dùng các tế bào T. Để đo các mức BLI cơ sở, một nhóm chuột (n=5) không được điều trị và không tiếp nhận khối u hoặc tế bào T.

Xác định sự phát triển của khối u ghép khác loài: Việc ghi hình ảnh BLI được sử dụng để xác định gánh nặng khối u. Chuột được tiêm theo đường trong phúc mạc bằng 150 mg/kg chất nền luciferaza D-luciferin được tạo huyền phù trong PBS. Năm phút sau lần tiêm này, việc ghi hình ảnh BLI của chuột được tiến hành trong điều kiện gây mê bằng isoflurane sử dụng hệ thống Xenogen IVIS. Việc thu hình ảnh được thực hiện bằng trường quan sát tại D, độ cao đối tượng 1,5 cm, và mức phân khoảng trung bình với thời gian lộ sáng tự động được xác định bằng phần mềm Living Image Software. Các tín hiệu BLI được trích xuất sử dụng phần mềm Living Image software: các vùng mong muốn được vẽ xung quanh mỗi một khối u và cường độ photon được ghi lại ở dạng p/s/cm²/sr.

Trong khi các khối u BCMA⁺ MOLP-8-luciferaza phát triển tăng dần ở chuột tiếp nhận các tế bào scFv CAR T không liên quan, tế bào CAR T mã hóa cho 21581 scFv CAR và 16747 scFv CAR làm giảm gánh nặng khối u xuống mức cơ sở ở tất cả các động vật. Kết quả được thể hiện trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6: Kích thước khối u trung bình (theo phát quang) tại các thời điểm khác nhau

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 12 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	6,81E+05 $\pm$ 3,46E+04
Không có CAR T (đối chứng dương)	1,51E+06 $\pm$ 7,81E+04

CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	$1,72\text{E}+06 \pm 1,33\text{E}+05$
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	$1,46\text{E}+06 \pm 1,01\text{E}+05$
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	$1,32\text{E}+06 \pm 5,86\text{E}+04$

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 18 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	$7,61\text{E}+05 \pm 2,73\text{E}+04$
Không có CAR T (đối chứng dương)	$2,01\text{E}+07 \pm 8,14\text{E}+05$
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	$2,11\text{E}+07 \pm 3,02\text{E}+06$
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	$5,37\text{E}+06 \pm 9,01\text{E}+05$
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	$6,98\text{E}+06 \pm 9,57\text{E}+05$

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 25 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	$7,20\text{E}+05 \pm 2,31\text{E}+04$
Không có CAR T (đối chứng dương)	$5,93\text{E}+07 \pm 7,71\text{E}+06$
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	$6,40\text{E}+07 \pm 1,71\text{E}+07$
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	$7,50\text{E}+05 \pm 4,63\text{E}+04$
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	$6,77\text{E}+05 \pm 7,41\text{E}+04$

Điều trị bằng CAR T	Phát quang [p/s/cm ² /sr] 32 ngày sau khi cấy ghép (trung bình $\pm$ SEM)
Không có khối u (BLI cơ sở)	$6,85\text{E}+05 \pm 3,99\text{E}+04$
Không có CAR T (đối chứng dương)	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR T đối chứng (scFv không liên quan) 2×10^6 tế bào	Động vật được gây chết nhẹ nhàng
CAR kháng BCMA (21581 scFv) 2×10^6 tế bào	$6,28\text{E}+05 \pm 3,75\text{E}+04$
CAR kháng BCMA (16747 scFv) 2×10^6 tế bào	$6,82\text{E}+05 \pm 2,35\text{E}+04$

Ví dụ 6: Các tế bào CAR-T đặc hiệu BCMA trung gian cho sự phân giải tế bào của các tế bào biểu hiện BCMA

Tế bào T CD3⁺ được phân lập từ các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi của người (PBMCs), được kích thích bằng các vi hạt CD3/CD28 cộng thêm 100 U/ml IL-2 người tái tổ hợp, và được chuyển đổi bằng lentivirus ở mức MOI=5, như được thảo luận ở trên trong ví dụ 2. Các tế bào biến nạp được nhân rộng trong 3 tuần bằng các vi

hạt CD3/CD28 cộng thêm 100 U/ml IL-2 người tái tổ hợp trước khi thiết lập thử nghiệm phân hủy tế bào.

Để xác định khả năng phân hủy tế bào của các tế bào T chứa thụ thể kháng nguyên khảm (CAR) hướng đích BCMA, thử nghiệm phân hủy tế bào được tiến hành sử dụng các tế bào CAR-T nhân rộng và các dòng tế bào khối u đích khác nhau mà thể hiện các mức BCMA thay đổi. Vào ngày 21 nhân rộng, các tế bào CAR-T nhân rộng được đồng nuôi cấy ba lần theo các tỷ lệ khác nhau với các dòng tế bào đích BCMA+ đánh dấu bằng calcein. Mỗi một dòng tế bào đích được thu hoạch và tái tạo huyền phù ở mật độ 2×10^6 /mL trước khi bổ sung thuốc nhuộm calcein-AM ở nồng độ 8 μ M trong 35 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đánh dấu bằng calcein, các tế bào đích được rửa hai lần để loại bỏ calcein dư. Sau đó, các tế bào T và tế bào đích được đồng nuôi cấy trên đĩa đáy tròn 96 lỗ theo các tỷ lệ khác nhau và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 2,5 giờ khi lớp nổi trên bề mặt nuôi cấy được thu hoạch. Để làm đối chứng âm, các tế bào đích được đồng nuôi cấy với tế bào T được sinh ra nhờ sử dụng CAR tương tự được thiết kế để chứa scFv không liên quan mà nó không nhận dạng BCMA. Đối với đối chứng âm CAR bổ sung, các tế bào T không được tải nạp và nhân rộng từ cùng đối tượng cho có sức khỏe bình thường được sử dụng. Đối với đối chứng để tiêu diệt qua trung gian tế bào CAR-T đặc hiệu kháng nguyên, các dòng tế bào đích bạch cầu dòng tủy mãn tính K562 được sử dụng làm dòng tế bào này là âm tính trong biểu hiện BCMA. Để xác định xem liệu calcein có được giải phóng tự nhiên hay không từ các dòng tế bào đích H-929 và MOLP-8, mỗi một dòng tế bào được nuôi cấy không có mặt các tế bào CAR-T. Để xác định sự giải phóng calcein tối đa có thể, các dòng tế bào đích được nuôi cấy và phân giải nhờ sử dụng môi trường tối ưu có bổ sung để chứa 1% chất tẩy TritonTM X-114. Trong lớp nổi trên bề mặt, các mức calcein tương đối được xác định nhờ sử dụng thiết bị đọc đĩa Viktor X4 và tỷ lệ % hoạt tính gây độc tế bào được tính toán ở dạng $((\text{mức tín hiệu calcein} - \text{mức giải phóng calcein tự nhiên}) / (\text{mức giải phóng calcein tối đa} - \text{mức giải phóng calcein tự nhiên})) \times 100$.

Như được thể hiện trong các bảng 7A đến 7C dưới đây, các môi trường nuôi cấy chứa tế bào CAR+ T nhằm đích BCMA được tạo ra nhờ sử dụng 21581 và 16747 scFv đã cảm ứng mạnh sự phân giải tế bào của các tế bào đích H-929 và tế bào đích MOLP-8. So với tế bào H-929, mức hoạt tính gây độc tế bào thấp hơn được quan sát thấy đối với các tế bào MOLP8. Kết quả này được giải thích bằng các mức biểu hiện H-929 cao

hơn của kháng nguyên BCMA so với các tế bào MOLP-8. Đối với mỗi một nuôi cấy tế bào CAR-T hướng đích BCMA, mức hoạt tính gây độc tế bào lớn nhất được quan sát thấy đối với các tế bào H-929, và các tế bào CAR-T hướng đích BCMA được thiết kế với 16747 scFv đã tạo ra mức hoạt tính gây độc tế bào lớn nhất đối với cả hai dòng tế bào đích. Cả hai tế bào T không được tải nạp và được nhân rộng (MOI 0), và các tế bào CAR-T không liên quan (17363), khi được đồng nuôi cấy với các tế bào đích ở tỷ lệ tối đa 50 tế bào T trên một tế bào đích, đã không gây ra bất kỳ sự phân giải tế bào nào của các tế bào đích MOLP-8 và H-929. Kết quả này chứng tỏ rằng, sự phân giải tế bào chỉ được quan sát thấy khi cấu trúc CAR chứa scFv nhận dạng BCMA (ví dụ, từ mAb21581 và mAb16747). Ngoài ra, các tế bào CAR-T hướng đích BCMA đã chứng tỏ hoạt tính gây độc tế bào không đáng kể đối với các tế bào K562 mà không có sự biểu hiện của BCMA cho thấy rằng, sự biểu hiện của BCMA cần thiết cho sự phân giải tế bào cần được quan sát.

Bảng 7A: Sự phân giải tế bào CAR-T định hướng BCMA

Tỷ lệ tế bào T thực hiện: tế bào đích	Tế bào CAR-T / tế bào đích							
	21581 / MOLP8		21581 / H929		16747 / MOLP8		16747 / H929	
	trung bình	độ lệch chuẩn	trung bình	độ lệch chuẩn	trung bình	độ lệch chuẩn	trung bình	độ lệch chuẩn
50	9,1	2,0	22,3	0,7	14,0	1,5	29,3	1,8
25	3,7	0,8	10,0	0,9	10,9	2,0	19,4	3,4
12,5	1,6	0,6	3,9	1,4	8,2	0,9	9,3	3,2
6,25	0,6	0,5	1,7	0,7	5,8	1,3	4,2	2,6
3,13	-1,5	0,3	0,0	1,1	2,2	0,9	2,9	2,4
1,56	0,3	0,5	-0,9	2,4	0,2	0,7	1,8	2,3
0,78	-1,3	2,2	-0,7	0,5	-2,9	0,5	0,9	1,7

SD: độ lệch chuẩn

Bảng 7B: Sự phân giải tế bào CAR-T định hướng BCMA

Tỷ lệ tế bào T thực hiện: tế bào đích	Tế bào CAR-T / tế bào đích							
	17363 HPV16 / MOLP8		17363 HPV16 / H929		21581 / K562		16747 / K562	
	trung bình	độ lệch chuẩn	trung bình	độ lệch chuẩn	trung bình	độ lệch chuẩn	trung bình	độ lệch chuẩn
50	-3,1	1,7	-0,8	1,2	2,0	1,1	3,5	1,4

SD: độ lệch chuẩn

Bảng 7C: Sự phân giải tế bào CAR-T định hướng BCMA

Tỷ lệ tế bào T thực hiện: tế bào đích	Tế bào CAR-T / tế bào đích			
	CAR Neg tế bào T / MOLP8		CAR Neg tế bào T / H929	
	trung bình	độ lệch chuẩn	trung bình	độ lệch chuẩn
50	-1,4	2,0	-0,5	1,5

SD: độ lệch chuẩn

Ví dụ 7: Hoạt tính gây độc tế bào Ex Vivo của các tế bào CAR-T hướng đích BCMA ở tủy xương có nguồn gốc từ bệnh nhân bị bệnh đa u tủy xương

Các tế bào T CD3⁺ được phân lập từ các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi của người (PBMCs), được kích thích bằng các vi hạt CD3/CD28 cộng thêm 100 U/ml IL-2 người tái tổ hợp, và được chuyển đổi bằng lentivirut ở mức MOI=5, như được thảo luận ở trên trong ví dụ 2. Các tế bào tải nạp được nhân rộng trong 3 tuần bằng các vi hạt CD3/CD28 cộng thêm 100 U/ml IL-2 người tái tổ hợp trước khi thiết lập thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào.

Khi thu hoạch, các tế bào CAR-T nhân rộng được rửa và tái tạo huyền phù trong môi trường đầy đủ (RPMI có bổ sung 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, và 292 µg/mL L-glutamin). Tủy xương từ các đối tượng bị bệnh đa u tủy xương được giã đông và tái tạo huyền phù trong môi trường đầy đủ. Các tế bào mô đệm HS-5 được cấy vào đĩa đáy bằng 96 lỗ ở mật độ 10000 tế bào trên mỗi lỗ và được ủ qua đêm. Các tế bào T và tủy xương nguồn gốc từ đối tượng bị bệnh được bổ sung vào các lỗ chứa mô đệm theo các tỷ lệ E:T khác nhau (chuẩn độ 2 lần bắt đầu ở tỷ lệ E:T=10:1) và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 12 giờ. Để làm đối chứng âm tính CAR, các tế bào T không tải nạp và được nhân rộng từ cùng đối tượng có sức khỏe bình thường được sử dụng.

Sau 12 giờ, sự sống sót của các nguyên bào đa u tủy xương được xác định sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy. Tế bào được nhuộm dung dịch hỗn hợp của các kháng thể liên hợp huỳnh quang (kháng CD4, kháng CD8, kháng CD16, kháng CD45, kháng CD90, kháng CD138, và kháng SlamF7) trong dung dịch đệm nhuộm BD Horizon Brilliant trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Tế bào được rửa một lần trong PBS và được nhuộm bằng thuốc nhuộm tế bào chết có thể cố định LIVE/DEAD trong

20-30 phút ở 4°C, tiếp theo bằng hai lần rửa trong PBS và được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm lạnh Miltenyi AutoMacs. Các hạt CountBright được bổ sung vào mẫu để xác định số lượng tế bào tuyệt đối ở mỗi lỗ. Các mẫu được phân tích trên hệ thống đếm tế bào dòng chảy BD FortessaX20. Các nguyên bào đa u tủy xương sống sót được giữ ở dạng CD4-/CD8-/SlamF7+/CD138+ đơn sống sót. Tỷ lệ % sống sót được tính toán ở dạng số lượng tuyệt đối các nguyên bào đa u tủy xương sống trong mẫu điều trị được chuẩn hóa theo các tế bào đa u tủy xương sống ở đối chứng không được điều trị.

Các nuôi cấy chứa các tế bào CAR+ T nhằm đích BCMA được tạo ra sử dụng mAb21581 VH/VL đã cảm ứng mạnh sự phân giải tế bào đặc hiệu đích của các nguyên bào đa u tủy xương từ 2 đối tượng bị bệnh mới được chẩn đoán và 1 đối tượng tái phát. Ở tỷ lệ E:T là 10:1, 87 đến 94% số nguyên bào đa u tủy xương được phân giải. Các tế bào T không tải nạp và nhân rộng (MOI 0) đã phân giải 34-0% số nguyên bào đa u tủy xương. Kết quả này chứng minh khả năng của các tế bào CAR+ T nhằm đích BCMA phân giải một cách hiệu quả các nguyên bào đa u tủy xương nguồn gốc từ đối tượng bị bệnh theo cách đặc hiệu đích. Kết quả được thể hiện trong bảng 8 dưới đây.

Bảng 8: Tỷ lệ % nguyên bào đa u tủy xương sống sót trong quá trình phân giải tế bào của tế bào CAR-T định hướng BCMA

Nhận dạng mẫu	MM453		MM511		MM455	
Tình trạng bệnh	mới được chẩn đoán		mới được chẩn đoán		tái phát	
% nguyên bào đa u tủy xương	25%		38%		90%	
BCMA ABC trên MM	12302		2631		46925	
Tỷ lệ tế bào T:tế bào đích	CAR BCMA-T	Tế bào T đối chứng	CAR BCMA-T	Tế bào T đối chứng	CAR BCMA-T	Tế bào T đối chứng
10	7	66	11	85	13	156
5	15	66	19	91	32	155
2,5	23	90	28	82	81	148
1,25	49	77	37	92	81	104
0,625	82	92	56	92	98	112
0,312	108	92	100	100	98	102

Sáng chế không bị giới hạn trong phạm vi của các phương án cụ thể được mô tả trong bản mô tả này. Thực vậy, những thay đổi theo sáng chế ngoài phần mô tả trong bản mô tả này sẽ trở nên rõ ràng đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực từ phần mô tả ở trên. Những thay đổi như vậy được dự định nằm trong phạm vi của phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thụ thể kháng nguyên khảm đặc hiệu kháng nguyên trưởng thành tế bào B (BCMA) bao gồm, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C:

- (a) miền liên kết phối tử ngoại bào bao gồm miền liên kết kháng nguyên kháng BCMA
- (b) miền bản lề từ CD8;
- (c) miền xuyên màng từ CD8; và
- (d) miền tế bào chất bao gồm miền đồng kích thích từ 4-1BB và miền tín hiệu từ CD3zeta;

trong đó miền liên kết phối tử ngoại bào là miền đoạn biến đổi chuỗi đơn (scFv) kháng BCMA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) và vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) được liên kết bởi đoạn nối,

trong đó LCVR bao gồm các miền LCDR1-LCDR2-LCDR3 lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 60-62-64 và HCVR bao gồm miền HCDR1-HCDR2-HCDR3 lần lượt được nêu trong SEQ ID NO: 52-54-56.

2. Thụ thể kháng nguyên khảm theo điểm 1, trong đó đoạn nối bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự SEQ ID NO: 93-96.

3. Thụ thể kháng nguyên khảm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó LCVR bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58 và HCVR bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50.

4. Thụ thể kháng nguyên khảm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó:

- (a) miền bản lề bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 97;
- (b) miền xuyên màng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 98;
- (c) miền đồng kích thích bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99; hoặc
- (d) miền tín hiệu bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100.

5. Thụ thể kháng nguyên khảm theo điểm 1, trong đó thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 88.
6. Phân tử axit nucleic được phân lập mã hoá thụ thể kháng nguyên khảm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
7. Phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 6, trong đó phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 87.
8. Vector bao gồm phân tử axit nucleic như được xác định trong điểm 6 hoặc 7.
9. Vector theo điểm 8, trong đó vector là vector ADN, vector ARN, plasmit, vector lentivirut, vector adenovirut hoặc vector retrovirut.
10. Tế bào bao gồm phân tử axit nucleic như được xác định trong điểm 6 hoặc 7 hoặc vector như được xác định trong điểm 8 hoặc 9.
11. Tế bào theo điểm 10, trong đó tế bào này là tế bào T của người.
12. Tế bào thiết kế bao gồm thụ thể kháng nguyên khảm như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
13. Tế bào thiết kế theo điểm 12, trong đó:
 - (a) tế bào thiết kế là tế bào miễn dịch;
 - (b) tế bào thiết kế là tế bào miễn dịch và tế bào miễn dịch là tế bào tác động miễn dịch;
 - (c) tế bào thiết kế là tế bào lympho T; hoặc
 - (d) tế bào thiết kế là tế bào lymphô T và tế bào lymphô T là tế bào lymphô T gây viêm, tế bào lymphô T gây độc tế bào, tế bào lymphô T điều hòa hoặc tế bào lymphô T hỗ trợ.
14. Tế bào thiết kế theo điểm 13, trong đó tế bào thiết kế này là tế bào lymphô T gây độc tế bào CD8+.
15. Quần thể tế bào thiết kế, trong đó quần thể này thu được bằng cách:
 - (a) cung cấp quần thể tế bào miễn dịch, mà đã thu được từ đối tượng;

(b) đưa phân tử axit nucleic mã hoá thụ thể kháng nguyên khả như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 vào tế bào miễn dịch;

(c) nuôi cấy tế bào miễn dịch trong các điều kiện để biểu hiện phân tử axit nucleic; và

(d) phân lập tế bào miễn dịch biểu hiện thụ thể kháng nguyên khả ở bề mặt tế bào.

16. Dược phẩm bao gồm một trong số:

(a) tế bào T của người được cải biến di truyền và chất mang được dụng, trong đó tế bào T của người được cải biến di truyền bao gồm thụ thể kháng nguyên khả như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5; hoặc

(b) tế bào thiết kế như được xác định trong điểm 12 và chất mang được dụng; hoặc

(c) tế bào thiết kế như được xác định trong điểm 13 và chất mang được dụng; hoặc

(d) tế bào thiết kế như được xác định trong điểm 14 và chất mang được dụng.

17. Phương pháp thiết kế quần thể tế bào để biểu hiện thụ thể kháng nguyên khả, bao gồm các bước:

(a) cung cấp quần thể tế bào miễn dịch;

(b) đưa phân tử axit nucleic mã hoá thụ thể kháng nguyên khả như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 vào tế bào miễn dịch;

(c) nuôi cấy tế bào miễn dịch trong các điều kiện để biểu hiện phân tử axit nucleic; và

(d) phân lập tế bào miễn dịch biểu hiện thụ thể kháng nguyên khả ở bề mặt tế bào.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu lấy quần thể tế bào miễn dịch từ đối tượng.

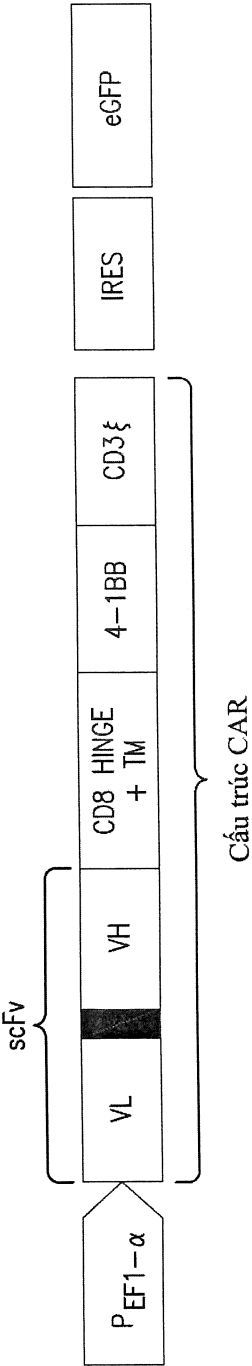


Fig. 1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Thụ thể kháng nguyên khảm đặc hiệu kháng nguyên trưởng thành tế bào B (BCMA) và dược phẩm chứa chúng

<130> 10455WO01

<160> 101

<170> FastSEQ dùng cho môi trường Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 366

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 1

```
caggtgcagc tgggtggagtc ggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctatggca ttcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattacatg atggaagtag taactactat 180
gcagagtcgc tgaagggccg attcatcatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agctgaggac acggctctat attactgtac gaaaagggtat 300
tcagaagcag ctggcccaaa ttggttcgac ccttggggcc aggggaaccct ggtcaccgctc 360
tcctca
```

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 2

```
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 Thr Tyr
20          25          30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Val Ile Leu His Asp Gly Ser Ser Asn Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Ile 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 Leu Tyr Tyr Cys
85          90          95
Thr Lys Arg Tyr Ser Glu Ala Ala Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro Trp
```

100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 3
 ggattcacct tcagtaccta tggc

24

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 4
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly
 1 5

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 5
 atattacatg atggaagtag taac

24

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 6
 Ile Leu His Asp Gly Ser Ser Asn
 1 5

<210> 7

<211> 45
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 7
 acgaaaaggt attcagaagc agctggccca aattgggttcg acccc 45

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 8
 Thr Lys Arg Tyr Ser Glu Ala Ala Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 9
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtcg gggaattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaagcca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatccatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg ctacttacta ttgtcaacag gctatcagtt tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

His	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70				75					80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	Ile	Ser	Phe	Pro	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 11
 cggggaatta gcagctgg

18

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 12
 Arg Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 13
 gctgcatcc

9

<210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 14

Ala Ala Ser
1

<210> 15
<211> 27
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 15
caacaggcta tcagtttccc attcact

27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 16
Gln Gln Ala Ile Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 17
<211> 360
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 17
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgtca tgagttgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gactggagtg ggtctcagct attattggta gtggtggttag cacatattac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagagcc 300
ggggataact ggaactgggt cgacccctgg ggccaggga ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 18
<211> 120
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 18

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	Tyr
			20					25					30		
Val	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35				40						45			
Ser	Ala	Ile	Ile	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50				55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Lys	Arg	Ala	Gly	Asp	Asn	Trp	Asn	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115				120									

<210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 19
 ggattcacct ttagcagcta tgtc

24

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 20
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val
 1 5

<210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 21
 attattggtgta gtggtggtag caca

24

<210> 22

<211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 22
 Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 23
 gcgaaaagag ccgggggataa ctggaactgg ttcgacccc

39

<210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 24
 Ala Lys Arg Ala Gly Asp Asn Trp Asn Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 25
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 25
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctttaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca ggggtattag agctgggttag cctgggtatca gcggaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tggggcggat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaaaagtg tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaaag tgatatcaa a 321

<210> 26
 <211> 107

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 26

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Leu Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Lys Ser Val Pro Phe
          85           90           95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
          100           105

```

<210> 27

<211> 18

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 27

caggggtatta gcagctgg

18

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 28

```

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1           5

```

<210> 29

<211> 9

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 29
gctgcatcc

9

<210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 30
Ala Ala Ser
1

<210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 31
caacaggcta aaagtgatccc attcact

27

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 32
Gln Gln Ala Lys Ser Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 33
<211> 351
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 33
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt atcagttgga atagtggtaa catgggatat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgttc 240

ctgcaaattgc acagttttgag agctgaggac acggcctttt attactgtgc aaaagtccgt 300
 ctaactgcct ttgacttttg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351

<210> 34
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Met Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Arg Leu Thr Ala Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 35
 ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 36
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 37
 atcagttgga atagtggtaa catg

24

<210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 38
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Met
 1 5

<210> 39
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 39
 gcaaaagtcc gtctaactgc ctttgacttt

30

<210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 40
 Ala Lys Val Arg Leu Thr Ala Phe Asp Phe
 1 5 10

<210> 41
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 41

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc ggacaagtca gagcattggc aactatttaa attggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct catctatact gcatccagtt tgcagaatgg agtcccatca 180
aggttcactg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaggattttg taatttacta ctgtcaacag agtttcagta ccccgataac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321
```

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 42

```
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 Thr Ser Gln Ser Ile Gly Asn Tyr
          20           25           30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr 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 Val Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Tyr
          85          90          95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105
```

<210> 43

<211> 18

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 43

cagagcattg gcaactat

18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 44
Gln Ser Ile Gly Asn Tyr
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 45
actgcatcc

9

<210> 46
<211> 3
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 46
Thr Ala Ser
1

<210> 47
<211> 27
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 47
caacagagtt tcagtacccc gtatact

27

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 48
Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 49

<211> 354
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 49
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtcaagc ctggaggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tcagctggat ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagttcta gtggtagttc cataaagtac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gagagagggg 300
 ggggaactacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 50
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 50
 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 Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ile Lys Tyr Ala Asp Ser 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 Glu Gly Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 51
 ggattcacct tcagtgacta ctac

24

<210> 52

<211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 52
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 53
 attagttcta gtggtagttc cata

24

<210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 54
 Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ile
 1 5

<210> 55
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 55
 gcgagagagg gaggaacta cggtatggac gtc

33

<210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 56

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 57

<211> 321

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 57

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgctc gggcgagtca ggggtattaac aactgggttag tctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcaaccagct tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtgggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctccacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 58

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
 20 25 30
 Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 59

<211> 18

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 59
cagggtatta acaactgg

18

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 60
Gln Gly Ile Asn Asn Trp
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 61
gctgcaacc

9

<210> 62
<211> 3
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 62
Ala Ala Thr
1

<210> 63
<211> 27
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 63
caacaggcta acagtttccc tcccact

27

<210> 64
<211> 9

<212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 64
 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
 1 5

<210> 65
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 65
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt aacttttggg tgacctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac atgaaccaag atggaagtga gaaatactat 180
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagag ctactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg 300
 gaatatgtga ttagtaccag ctgctatgat gactttgact actggggcca gggaaccctg 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 66
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<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 Ser Asn Phe
 20 25 30
 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser 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 Asp Arg Glu Tyr Cys Ile Ser Thr Ser Cys Tyr Asp Asp Phe
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 67
 ggattcacct ttagtaactt ttgg

24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 68
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Trp
 1 5

<210> 69
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 69
 atgaaccaag atggaagtga gaaa

24

<210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 70
 Met Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
 1 5

<210> 71
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 71

gcgagagatc gggaatattg tattagtacc agctgctatg atgactttga ctac 54

<210> 72

<211> 18

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 72

Ala	Arg	Asp	Arg	Glu	Tyr	Cys	Ile	Ser	Thr	Ser	Cys	Tyr	Asp	Asp	Phe
1				5				10					15		
Asp Tyr															

<210> 73

<211> 324

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 73

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcaagtca	gagcattagc	agctatttaa	attggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcatagtgg	gggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagattttg	caacttacta	ctgtcaacag	agttacagta	cccctccgat	caccttcggc	300
caagggacac	gactggagat	taaa				324

<210> 74

<211> 108

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 74

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
		20					25					30			
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35					40				45					
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	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	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Pro
				85					90					95	
Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 75
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 75
 cagagcatta gcagctat

18

<210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 76
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 77
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 77
 gctgcatcc

9

<210> 78
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 78
 Ala Ala Ser
 1

<210> 79
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 79
 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30

<210> 80
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 80
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 81
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> BCMA 16711 (VL-VH) ScFv CAR-T
 (16711_VK_v2(người).(G4S)3 đoạn nối.16711 VH.miền bản lề hCD8a
 /TM.hCD137 (4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 81
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtcg gggaattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaagcca 120
 gggaaagccc ctaagtcctt gatccatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg ctacttacta ttgtcaacag gctatcagtt tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa aggcggcggt ggatctggag gcggtggaag cgggtggcggg 360
 ggaagtcagg tgcagctggt ggagtcgggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg 420
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtacct atggcattca ctgggtccgc 480
 caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttatat tacatgatgg aagtagtaac 540
 tactatgcag agtccgtgaa gggccgattc atcatctcca gagacaattc caagaacaca 600
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagct gaggacacgg ctctatatta ctgtacgaaa 660
 aggtattcag aagcagctgg cccaaattgg ttcgaccctt ggggccaggg aaccctgggtc 720
 accgtctcct caactaccac tctgtctccc cgcccccaa cacctgctcc aactattgca 780
 tccaaccac tctccctcag acccgaagct tgtgcgcccc cgcccgagg tgctgttcac 840
 actagaggac tcgattttgc ttgcgacatt tatactctggg cccacttgcc aggtacttgc 900
 ggagtattgc tgctctcact tgttattact ctttattgca aacggggcag aaagaaactc 960

```

ctgtatatat tcaaacaacc atttatgaga ccagtacaaa ctactcaaga ggaagatggc 1020
tgtagctgcc gatttccaga agaagaagaa ggaggatgtg aactgagagt gaagttcagc 1080
aggagcgagc acgcccccg cgtacaagcag ggccagaacc agctctataa cgagctcaat 1140
ctaggacgaa gagaggagta cgatgttttg gacaagagac gtggccggga ccctgagatg 1200
gggggaaagc cgagaaggaa gaaccctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat 1260
aagatggcgg aggcctacag tgagattggg atgaaaggcg agcgccggag gggcaagggg 1320
cacgatggcc ttaccaggg tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac 1380
atgcaggccc tgccccctcg ctaa 1404

```

<210> 82

<211> 467

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> BCMA 16711 (VL-VH) ScFv CAR-T
 (16711_VK_v2(người).(G4S)3 đoạn nối.16711 VH. miền bản lề hCD8a
 /TM.hCD137 (4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 82

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp
20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35           40           45
His Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ile Ser Phe Pro Phe
85           90           95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Gly Gly Gly Ser
100          105          110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Glu
115          120          125
Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
130          135          140
Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly Ile His Trp Val Arg
145          150          155
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Leu His Asp
165          170          175
Gly Ser Ser Asn Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile
180          185          190
Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195          200          205
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr Lys Arg Tyr Ser Glu
210          215          220
Ala Ala Gly Pro Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
225          230          235
Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
245          250          255
Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg

```

```
<210> 83
<211> 1398
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> BCMA 16716 (VL-VH) ScFv CAR-T
(16716_VK(người)).(G4S)3
đoạn nối.16716_VH(người).miền bản lề hCD8a/TM.hCD137
(4-1BB).hCD3 zeta)

<400>	83					
gacatccaga	tgaccaggtc	tccatcttcc	gtgtctgcat	ctttaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgtc	gggcgagtca	gggtattagc	agctggtag	cctggtatca	gcggaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	ggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tggggcggat	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gaagattttg	caacttacta	ttgtcaacag	gctaaaagtg	tcccattcac	tttcggccct	300
gggaccaaag	tggatatcaa	aggcggcggg	ggatctggag	gcggtggaag	cgggtggcggg	360
ggaagtgagg	tgcagctggt	ggagctggg	ggaggcttg	tacagcctgg	ggggtccctg	420
agactctcct	gtgcagcctc	tggattcacc	tttagcagct	atgtcatgag	ttgggtccgc	480
caggctccag	ggaagggact	ggagtgggtc	tcagctatta	ttggtagtgg	tggtagcaca	540
tattacgcag	actcctgaa	gggccgggtc	accatctcca	gagacaattc	caagaacacg	600
ctgtatctgc	aatgaacag	cctgagagcc	gaggacacgg	ccgtatatta	ctgtgcgaaa	660
agagccgggg	ataactggaa	ctggttcgac	ccctggggcc	aggaaccct	ggtcaccgtc	720

```

tcttcaacta ccactcctgc tccccgcccc ccaacacctg ctccaactat tgcattccaa 780
ccactctccc tcagaccgga agcttgctgc cccgcccgcg gaggtgctgt tcacactaga 840
ggactcgatt ttgcttgcca catttatatc tgggccccac ttgcaggtac ttgcggagta 900
ttgctgctct cacttggtat tactctttat tgcaaacggg gcagaaagaa actcctgtat 960
atattcaaac aaccatttat gagaccagta caaactactc aagaggaaga tggctgtagc 1020
tgccgatttc cagaagaaga agaaggagga tgtgaactga gagtgaagtt cagcaggagc 1080
gcagacgccc ccgcgtacaa gcagggccag aaccagctct ataacgagct caatctagga 1140
cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga gatgggggga 1200
aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa agataagatg 1260
gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa ggggcacgat 1320
ggcctttacc aggtctcag tacagccacc aaggacacct acgacgcctt tcacatgcag 1380
gccctgcccc ctgcgctaa 1398

```

<210> 84

<211> 465

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> BCMA 16716 (VL-VH) ScFv CAR-T

(16716_VK(người). (G4S) 3

đoạn nối.16716_VH(người).miền bản lề hCD8a/TM.hCD137

(4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 84

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Leu Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60
Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Lys Ser Val Pro Phe
85           90           95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100          105          110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
115          120          125
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
130          135          140
Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val Met Ser Trp Val Arg
145          150          155          160
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ile Gly Ser
165          170          175
Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
180          185          190
Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195          200          205
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Arg Ala Gly Asp
210          215          220
Asn Trp Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

```

```
<210> 85
<211> 1389
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> BCMA 16732 (VL-VH) ScFv CAR-T
(16732_VK_v2(người).(G4S)3
đoạn nối.16732_VH(người).miền bản lề hCD8a/TM.hCD137
(4-1BB).hCD3 zeta)

<400>	85					
gacatccaga	tgaccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	ggacaagtca	gagcattggc	aactatttaa	attggtttca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaaactcct	catctatact	gcatccagtt	tgcagaatgg	agtcccatca	180
aggttcactg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaggattttg	taattttacta	ctgtcaacag	agtttcagta	ccccgtatac	ttttggccag	300
gggaccaagc	tggagatcaa	aggcggcggt	ggatctggag	gcggtggaag	cgggtggcggg	360
ggaagtgaag	tgcagctggt	ggagtctggg	ggaggcttgg	tacagcctgg	caggtccctg	420
agactctcct	gtgcagcctc	tggattcacc	tttgatgatt	atgccatgca	ctgggtccgg	480

```

caagctccag ggaagggcct ggagtgggtc tcaggtatca gttggaatag tggtaacatg 540
ggatatgcgg actctgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactcc 600
ctgttcctgc aaatgcacag tttgagagct gaggacacgg ctttttatta ctgtgcaaaa 660
gtccgtctaa ctgcctttga cttttggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctcctcaact 720
accactcctg ctccccgccc cccaacacct gctccaacta ttgcatccca accactctcc 780
ctcagacccg aagcttgctg ccccgccgcc ggaggtgctg ttcacactag aggactcgat 840
tttgcttgcg acattttatat ctgggccccca cttgcaggta cttgcggagt attgctgctc 900
tcacttgcta ttactcttta ttgcaaacgg ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa 960
caaccattta tgagaccagt acaaactact caagaggaag atggctgtag ctgccgattt 1020
ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc 1080
cccgctaca agcagggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag 1140
gagtacgatg ttttgacaaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga 1200
aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcgagggcc 1260
tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac 1320
cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc 1380
cctcgctaa 1389

```

<210> 86

<211> 462

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> BCMA 16732 (VL-VH) ScFv CAR-T

(16732_VK_v2 (người) . (G4S) 3

đoạn nối.16732_VH (người) .miền bản lề hCD8a/TM.hCD137

(4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 86

```

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 Thr Ser Gln Ser Ile Gly Asn Tyr
20     25     30
Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35     40     45
Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr 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 Val Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Tyr
85     90     95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100    105    110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
115    120    125
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys
130    135    140
Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg
145    150    155    160
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn
165    170    175
Ser Gly Asn Met Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
180    185    190

```

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe Leu Gln Met His Ser Leu
 195 200 205
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Arg Leu Thr
 210 215 220
 Ala Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr
 225 230 235 240
 Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
 245 250 255
 Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
 260 265 270
 Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
 275 280 285
 Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
 290 295 300
 Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 305 310 315 320
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 325 330 335
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 340 345 350
 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
 355 360 365
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 370 375 380
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
 385 390 395 400
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 405 410 415
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 420 425 430
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 435 440 445
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 450 455 460

<210> 87

<211> 1392

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> BCMA 16747 (VL-VH) ScFv CAR-T

(16747_VK(người).(G4S)3

đoạn nối.16747_VH(người).miền bản lề hCD8a/TM.hCD137

(4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 87

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgctc gggcgagtc ggggtattaac aactgggttag tctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcaaccagct tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtgggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctccac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa aggcggcggt ggatctggag gcggtggaag cgggtggcggg 360

```

ggaagtcagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tcaagcctgg aggggtccctg 420
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtgact actacatcag ctggatccgc 480
caggctccag ggaaggggct ggagtgggtt tcatacatta gttctagtgg tagttccata 540
aagtacgcag actctgtgaa gggccgattc accatctcca gggacaacgc caagaactca 600
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaga 660
gagggaggga actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 720
actaccactc ctgctccccg cccccaaca cctgctccaa ctattgcac ccaaccactc 780
tccctcagac ccgaagcttg tcgccccgcc gccggagggtg ctgttcacac tagaggactc 840
gattttgctt gcgacattta tatctgggcc ccacttgac gtacttgagg agtattgctg 900
ctctcacttg ttattactct ttattgcaaa cggggcgaga agaaactcct gtatatattc 960
aaacaacat ttatgagacc agtacaact actcaagagg aagatggctg tagctgccga 1020
tttccagaag aagaagaagg aggatgtgaa ctgagagtga agttcagcag gagcgcagac 1080
gccccgcgt acaagcaggg ccagaaccag ctctataacg agctcaatct aggacgaaga 1140
gaggagtacg atgttttgga caagagacgt ggccgggacc ctgagatggg gggaaagccg 1200
agaaggaaga accctcagga aggcctgtac aatgaactgc agaaagataa gatggcggag 1260
gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag cgccggaggg gcaaggggca cgatggcctt 1320
taccagggtc tcagtacagc caccaaggac acctacgacg cccttcacat gcaggccctg 1380
ccccctcgct aa 1392

```

<210> 88

<211> 463

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> BCMA 16747 (VL-VH) ScFv CAR-T

(16747_VK(người). (G4S) 3

đoạn nối.16747_VH(người).miền bản lề hCD8a/TM.hCD137

(4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 88

```

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

```

30

```

caagggacac gactggagat taaaggcggc ggtggatctg gaggcggtgg aagcgggtggc 360
gggggaagtg aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tgggtccagcc tgggggggtcc 420
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttttagta acttttggat gacctgggtc 480
cgccaggctc cagggaagg gctggagtgg gtggccaaca tgaaccaaga tggaagtgag 540
aaatactatg tggactctgt gaagggccga ttcacatct ccagagacaa cgccaagagc 600
tcactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca cggctgtgta ttactgtgcg 660
agagatcggg aatattgtat tagtaccagc tgctatgatg actttgacta ctggggccag 720
ggaaccctgg tcaccgtctc ctcaggaggc ggaggcagca ctaccactcc tgctccccgc 780
cccccaacac ctgctccaac tattgcatcc caaccactct ccctcagacc cgaagcttgt 840
cgccccgccg ccggaggtgc tggtcacact agaggactcg attttgcttg cgacatttat 900
atctggggcc cacttgcagg tacttgcgga gtattgctgc tctcacttgt tattactctt 960
tattgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg tatatatattca aacaaccatt tatgagacca 1020
gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt agctgccgat ttccagaaga agaagaagga 1080
ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta caagcagggc 1140
cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttggac 1200
aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa 1260
ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcggagg cctacagtga gattgggatg 1320
aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggtct cagtacagcc 1380
accaaggaca cctacgacgc cttcacatg caggccctgc cccctcgcta a 1431

```

<210> 90

<211> 476

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> BCMA 21581 (VL-VH) ScFv CAR-T
 (21581 VK(người).G4S)3 đoạn nối.21581
 VH(người).G4S đoạn nối_v2.miền bản lề hCD8a/TM.hCD137
 (4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 90

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20          25          30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35          40          45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85          90          95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
100         105         110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
115         120         125
Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
130         135         140
Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe Trp Met Thr Trp Val
145         150         155         160
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Met Asn Gln
165         170         175

```

```

Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
      180      185      190
Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
      195      200      205
Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Glu
      210      215      220
Tyr Cys Ile Ser Thr Ser Cys Tyr Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
      225      230      235      240
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Thr Thr Thr
      245      250      255
Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
      260      265      270
Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
      275      280      285
His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
      290      295      300
Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu
      305      310      315      320
Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
      325      330      335
Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys
      340      345      350
Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe
      355      360      365
Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu
      370      375      380
Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
      385      390      395      400
Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
      405      410      415
Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
      420      425      430
Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
      435      440      445
Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
      450      455      460
Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
      465      470      475

```

<210> 91

<211> 1437

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> HLA-A2/HPV16E7(11-19) 17363 ScFv (VL-VH) CAR-T
 (đối chứng không liên quan)
 (17363_ULC-VK(1)(người).G4Sx3_4.17363_VH(người).
 G4S_V2.miền bản lề hCD8a/TM.hCD137 (4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 91

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

```

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttta attggtatca acagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gtttccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
agggttcagt gcaagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaactc tctgcaacct 240
gaagattttg caacttactc ctgtcaacag acttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaaggtgga ggcggtagt ggcgagggcg aagtgggtga 360
ggaggctcag aggtgcagct gttggagtct gggggaggct tgggtacaacc tgggggggtcc 420
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttttagca gttatgccat gacctgggtc 480
cgccaggctc cagggatggg actggagtgg gtctcagtta ttagtggtag tggtagtgaa 540
acatactacg cagactccgt gaagggccgg ttcaccatct ccagagacaa ttccaaaaac 600
acactgtatc tgcaaagtga cagcctgaga gccgaagaca cggccgtata ttactgtgtg 660
aaagattcct cgtataggag ctctctcagg gcctactact actacggaat ggacgtctgg 720
ggcctaggga ccacggtcac cgtctcctca ggaggtggtg gaagtactac cactcctgct 780
ccccgcccc caacacctgc tccaactatt gcatcccaac cactctccct cagacccgaa 840
gcttgctgcc ccgcccggg aggtgctgtt cacactagag gactcgattt tgcttgcgac 900
atttatactt gggccccact tgcaggta ctgcggagtat tgctgctctc acttggttatt 960
actctttatt gcaaacgggg cagaaagaaa ctctgtata tattcaaaca accatttatg 1020
agaccagtac aaactactca agaggaagat ggctgtagct gccgatttcc agaagaagaa 1080
gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc agcaggagcg cagacgcccc cggtacaag 1140
cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt 1200
ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa agccgagaag gaagaaccct 1260
caggaaggcc tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgagatt 1320
gggatgaaag gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca ggggtctcagt 1380
acagccacca aggacacctc cgacgccctt cacatgcagg ccctgcccc tcgctaa 1437

```

<210> 92

<211> 478

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> HLA-A2/HPV16E7(11-19) 17363 ScFv (VL-VH) CAR-T

(đối chứng không liên quan)

(17363_ULC-VK(1) (người).G4Sx3_4.17363_VH(người)).

G4S_V2.miền bản lề hCD8a/TM.hCD137 (4-1BB).hCD3 zeta)

<400> 92

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1                5                10                15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20                25                30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35                40                45
Tyr Ala Val Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65                70                75                80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ser Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Pro
 85                90                95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
100                105                110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
115                120                125
Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser

```

130		135		140	
Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
145		150		155	
Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Met
		165		170	
Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Tyr
		180		185	
Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
		195		200	
Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr
		210		215	
Tyr	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg
225				230	
Gly	Leu	Gly	Thr	Thr	Val
				245	
Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg
		260		265	
Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg
		275		280	
Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly
		290		295	
Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr
305				310	
Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg
				325	
Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro
		340		345	
Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu
		355		360	
Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala
		370		375	
Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu
385				390	
Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly
				405	
Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu
		420		425	
Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser
		435		440	
Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly
		450		455	
Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu
465				470	
				475	

<210> 93

<211> 5

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn nối

<400> 93

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn nối

<400> 94
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn nối

<400> 95
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 96
<211> 18
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn nối

<400> 96
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly

<210> 97
<211> 45
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền bản lề

<400> 97

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 35 40 45

<210> 98
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> miền TM

<400> 98
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20

<210> 99
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 4-1BB

<400> 99
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

<210> 100
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cd3-Zeta

<400> 100
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

```

      35              40              45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
   50              55              60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65              70              75              80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
      85              90              95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
      100              105              110

```

<210> 101

<211> 184

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> BCMA người (TNFRSF17) Protein NP_001183.2

<400> 101

```

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

```