



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0045997

(51)⁷ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2019-01802

(22) 20/06/2017

(86) PCT/US2017/038377 20/06/2017

(87) WO 2018/052503 22/03/2018

(30) 62/394,360 14/09/2016 US; 62/491,908 28/04/2017 US

(45) 26/05/2025 446

(43) 25/11/2019 380A

(73) TENEOBIO, INC. (US)

1490 O' Brien Drive, Suite D, Menlo Park, California 94025, United States of America

(72) TRINKLEIN, Nathan (US); VAN SCHOOTEN, Wim (NL); ALDRED, Shelley Force (US); HARRIS, Katherine (US); PHAM, Duy (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐA ĐẶC HIỆU GẮN KẾT CD3, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY, POLNUCLEOTIT MÃ HÓA KHÁNG THỂ, VECTƠ BAO GỒM POLYNUCLEOTIT VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2019-01802

(57) Sáng chế đề cập tới polypeptit gắn kết kháng nguyên CD3 của người mới và phương pháp tạo ra chúng và việc sử dụng để điều trị và/hoặc chẩn đoán các bệnh khác nhau, và cũng đề cập đến phân tử kháng thể đặc hiệu kép có khả năng hoạt hóa tế bào hiệu ứng miễn dịch và việc sử dụng chúng để chẩn đoán và/hoặc điều trị các bệnh khác nhau.

FIG. 1A

ID nội bộ		CDR1	CDR2	CDR3
312557	SEQ ID NO:1	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308261	SEQ ID NO:2	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308159	SEQ ID NO:3	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
308160	SEQ ID NO:4	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
308256	SEQ ID NO:5	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312585	SEQ ID NO:6	GFTFANYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312614	SEQ ID NO:7	GFTFNYYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312583	SEQ ID NO:8	GFTFADYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312586	SEQ ID NO:9	GFTFDNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312624	SEQ ID NO:10	GFTFDNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312578	SEQ ID NO:11	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312620	SEQ ID NO:12	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGSYSRGGAY
312634	SEQ ID NO:13	GFTFHNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312579	SEQ ID NO:14	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSRGGAY
312630	SEQ ID NO:15	GFTFDNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312570	SEQ ID NO:16	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312567	SEQ ID NO:17	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312558	SEQ ID NO:18	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY

FIG. 1B

312325	SEQ ID NO:19	QSVSSN	GAS	QQYNNWPWT
308902- hóa trị hai	SEQ ID NO:20	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPFDH
308902	SSEQ ID NO:21	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPFDH

FIG. 1C

304703	SEQ ID NO. 22	GGSISSGGHY	IHYSGST	ARWRHDIFAAYPYYYGMDV
--------	---------------	------------	---------	---------------------

Tài liệu tham khảo chéo

Sáng chế yêu cầu hưởng quyền ưu tiên của Đơn Patent Mỹ tạm thời số 62/394,360, nộp ngày 14, tháng 9, năm 2016 và Đơn Patent Mỹ tạm thời số 62/491,908, nộp ngày 28, tháng 4, năm 2017, các đơn này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hệ miễn dịch của cơ thể sử dụng làm hàng rào bảo vệ chống lại bệnh viêm, tổn thương và bệnh ung thư. Hai hệ thống riêng biệt nhưng liên quan đến nhau, hệ miễn dịch tế bào và thể dịch, cùng hoạt động để bảo vệ cơ thể. Hệ miễn dịch thể dịch có trung gian là yếu tố tan được, gọi là kháng thể, các kháng thể này trung hòa các sản phẩm được nhận dạng là các chất ngoại lai bởi cơ thể. Ngược lại, hệ miễn dịch tế bào bao gồm tế bào, như tế bào T và đại thực bào, chúng sẽ loại bỏ và trung hòa các chất xâm nhập ngoại lai.

Sự hoạt hóa tế bào T là quan trọng để kích thích đáp ứng miễn dịch. Các tế bào T biểu hiện sự đặc hiệu miễn dịch và điều khiển hầu hết đáp ứng miễn dịch tế bào. Mặc dù tế bào T không tiết ra kháng thể, cần phải có chúng để tiết kháng thể bởi lympho bào B. Sự hoạt hóa tế bào T đòi hỏi sự tham gia của một số phân tử bề mặt tế bào, như phức hợp thụ thể tế bào T, và phân tử CD4 hoặc CD8. Thụ thể tế bào T (TcR - T cell receptor) đặc hiệu kháng nguyên gồm có heterodime liên kết bởi disulfua, glycoprotein màng với các chuỗi, alpha và beta (α và β), hoặc gamma và delta (γ và δ). TcR được gắn kết không-cộng hóa trị với phức của các protein không biến thể, ký hiệu là CD3.

Tế bào T được biết là gây ra các tác động chống khối u tiềm năng trong nhiều mô hình thí nghiệm. Các kháng thể có khả năng tập hợp hiệu quả tế bào T chống lại tế bào u đã có ở dạng kháng thể đặc hiệu kép, ví dụ kháng kháng nguyên liên quan đến khối u (TAA - kháng nguyên liên kết khối u) và chủ vận protein màng tế bào T, như phức TCR/CD3 và CD28. Các kháng thể đặc hiệu kép này có khả năng hoạt hóa tế bào T, bất kể tính đặc hiệu TCR của chúng, gây ra sự ly giải đặc hiệu các tế bào mang TAA tương ứng.

Tuy nhiên, trong khi kháng thể đặc hiệu kép kháng-CD3 có thể chuyển hướng sự ly giải do tế bào T đến các tế bào ác tính, các thử nghiệm lâm sàng với các bsAb dựa trên CD3 đã thể hiện độc tính cao ở các bệnh nhân. Sự hoạt hóa tế bào T không đặc hiệu từ bsAb có thể xảy ra theo cách độc lập với kháng nguyên do tương tác thụ thể Fc/Fc (FcR),

hoặc theo cách phụ thuộc kháng nguyên khi kháng nguyên được biểu hiện trên cả tế bào bình thường và tế bào u. Cả hai cơ chế có thể có vai trò đối với độc tính quan sát được trong các nghiên cứu lâm sàng trước đây. (Xem ví dụ, Link và đồng tác giả (1998) *Int. J. Cancer* 77(2):251-6; Durben và đồng tác giả *Molecular Therapy* (2015); 23 4, 648–655). Do hội chứng giải phóng xytokin thu được, đã có nhiều trở ngại đáng kể với việc phát triển các kháng thể này với mục đích điều trị bệnh.

Tương tác của thụ thể tế bào T (TCR - T cell receptor) với phối tử peptit-MHC của nó xác định hoạt tính của tế bào T. Đặc điểm gắn kết của tương tác này đã được nghiên cứu rất chi tiết và thể hiện là kiểm soát chức năng tế bào T. Độ mạnh và bản chất của tương tác TCR-peptit/MHC xác định liệu tế bào T gây ra chức năng hiệu ứng hoặc bị bất hoạt và loại bỏ. Các kháng thể kháng CD3 hoạt hóa tế bào T bằng cách thay đổi cấu hình của chuỗi CD3ε và phụ thuộc vào epitop có thể có hoặc tác động chủ vận hoặc đối kháng lên tế bào T (Yoon và đồng tác giả, 1994 *Immunity* 1:563-569). Về mặt tác dụng phụ đáng kể của nhiều chất chủ vận tế bào T, có thể ưu tiên duy trì tác động chống u tiềm năng trong khi vẫn làm giảm sự giải phóng các xytokin tiền viêm. Tuy nhiên, kháng thể kháng-CD3 chủ vận một phần có thể thay đổi chuỗi CD3ε cận lâm sàng khiến cho con đường truyền tín hiệu không hiệu quả, và hầu hết các kháng thể kháng-CD3 là chất chủ vận hoàn toàn đối với cả hai con đường. Chưa rõ ràng là liệu các chức năng hiệu ứng này có thể tách riêng không. Nhiều kháng thể kháng-CD3 đã biết (ví dụ SP-34, UCHT1, OKT3) có ái lực KD nằm trong khoảng từ 1-50nM, tuy nhiên có thể không tối ưu cho sử dụng điều trị.

Kháng thể đặc hiệu CD3, và kháng thể đặc hiệu kép có nguồn gốc từ đó được đề xuất bởi sáng chế.

Công bố

Các kháng thể CD3 được bộc lộ, ví dụ, trong các Patent Mỹ số 5,585,097; 5,929,212; 5,968,509; 6,706,265; 6,750,325; 7,381,803; 7,728,114. Kháng thể đặc hiệu kép có tính đặc hiệu gắn kết CD3 được bộc lộ, ví dụ, trong các Patent Mỹ số 7,262,276; 7,635,472; 7,862,813; và 8,236,308, mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Chế phẩm và phương pháp sử dụng nó được đề xuất với họ kháng thể họ gần mà gắn kết với và hoạt hóa sự truyền tín hiệu qua CD3, ví dụ hoạt hóa tế bào CD3⁺ T. Họ kháng thể bao gồm tập hợp trình tự CDR như xác định trong đây. Họ kháng thể này mang

lại một số lợi ích góp phần để ứng dụng làm (các) chất điều trị lâm sàng. Các kháng thể trong họ này bao gồm các kháng thể có khoảng ái lực gắn kết, cho phép lựa chọn trình tự đặc hiệu với ái lực mong muốn. Khả năng để tinh chỉnh ái lực là có tầm quan trọng đặc biệt để điều khiển mức hoạt hóa CD3 ở một cá thể được điều trị, và bằng cách đó làm giảm độc tính.

Theo một số phương án, kháng thể kháng-CD3 có ái lực (KD) đối với CD3 nằm trong khoảng từ 10^{-6} đến khoảng 10^{-11} . Kháng thể kháng-CD3 có ái lực (KD) là 50nM hoặc hơn, 100nM hoặc hơn, 500nM hoặc hơn, hoặc 1 μ M hoặc hơn có thể được mong muốn để bắt chước giống hơn tương tác TCR/MHC và tối thiểu hóa sự giải phóng xytokin độc tính trong khi vẫn duy trì sự ly giải tế bào u hiệu quả. Theo một số phương án, kháng thể kháng-CD3 có đặc trưng là hoặc được lựa chọn vì xu hướng giảm sự giải phóng xytokin, khi gắn kết với tế bào T có hiệu lực, ví dụ để giải phóng IL-2 và IFN γ . Các kháng thể có thể được chọn để sử dụng điều trị mà tối ưu hóa sự diệt tế bào u và giảm sự giải phóng xytokin, ví dụ kháng thể mà, trong họ trình tự kháng thể mô tả trong đây, gây giải phóng xytokin ít hơn một nửa so với mức quan sát được của kháng thể trong họ trong thử nghiệm so sánh, và có thể ít hơn, ví dụ ít hơn và bằng khoảng 25% mức tối đa quan sát được của kháng thể trong họ trong thử nghiệm so sánh. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu được đề xuất, chúng bao gồm ít nhất vùng biến đổi chuỗi nặng từ họ kháng thể và có thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đề xuất trong đây. Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đặc hiệu với protein không phải là CD3, và có thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Theo một số phương án như vậy, kháng thể thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên liên kết khối u, kháng nguyên đích, ví dụ integrin, v.v., kháng nguyên gây bệnh, protein điểm kiểm soát, và tương tự. Các định dạng khác nhau của kháng thể đặc hiệu kép nằm trong phạm vi của sáng chế, bao gồm mà không hạn chế ở polypeptit chuỗi đơn, polypeptit hai chuỗi, polypeptit ba chuỗi, polypeptit bốn chuỗi, và nhiều chuỗi.

Mỗi kháng thể đặc hiệu CD3 bao gồm vùng chức năng VH, bao gồm trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 trong vùng khung VH của người. Các trình tự CDR trong họ 2 có thể được đặt, ví dụ, trong vùng quanh các góc axit amin 26-33; 51-58; và 97-112 của CDR1, CDR2 và CDR3, lần lượt, của trình tự vùng biến đổi được nêu ví dụ nêu trong SEQ ID NO:1-18. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng trình tự CDR có thể ở vị trí khác nhau nếu trình tự vùng khung khác nhau được chọn, mặc dù thông thường trật tự của

các trình tự sẽ được giữ nguyên.

Trình tự CDR của kháng thể họ 2 có thể có công thức trình tự sau. X chỉ axit amin biến đổi, có thể là các axit amin cụ thể được chỉ ra sau đây.

CDR1

G₁ F₂ T₃ F₄ X₅ X₆ Y₇ A₈

trong đó:

X₅ có thể là axit amin bất kỳ; theo một số phương án X₅ là D, A hoặc H; theo một số phương án X₅ là D.

X₆ có thể là axit amin bất kỳ; theo một số phương án X₆ là D hoặc N; theo một số phương án D₆ là D.

Theo một số phương án, trình tự CDR1 của kháng thể kháng-CD3 họ 2 bao gồm trình tự được nêu trong bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-18, gốc 26-33.

CDR2

I₁' S₂' W₃' N₄' S₅' G₆' S₇' I₈'

Theo một số phương án, trình tự CDR2 của kháng thể kháng-CD3 họ 2 bao gồm trình tự được nêu trong bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-18, các gốc 51-58.

CDR3

A₁" K₂" D₃" S₄" R₅" G₆" Y₇" G₈" X₉" Y₁₀" X₁₁" X₁₂" G₁₃" G₁₂" A₁₅" Y₁₆"

trong đó:

X₉" có thể là axit amin bất kỳ, theo một số phương án X₉" là D hoặc S; theo một số phương án X₉" là D;

X₁₁" có thể là axit amin bất kỳ, theo một số phương án X₁₁" là R hoặc S;

X₁₂" có thể là axit amin bất kỳ, theo một số phương án X₁₂" là L hoặc R.

Theo một số phương án, trình tự CD3 của kháng thể kháng-CD3 họ 2 có công thức A K D S R G Y G D Y X₁₁" X₁₂" G G A Y trong đó X₁₁" và X₁₂" như được xác định ở trên. Theo một số phương án, trình tự CDR3 của kháng thể kháng-CD3 họ 2 bao gồm trình tự được nêu trong bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-18, các gốc 97-112. Theo một số phương án,

vùng chức năng VH gắn kết CD3 của kháng thể họ 2 được cặp với vùng chức năng vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Theo một số phương án như vậy, chuỗi nhẹ là chuỗi nhẹ cố định.

Theo một số phương án, chuỗi nhẹ bao gồm vùng chức năng VL có trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 trong vùng khung VL của người. Trình tự CDR có thể là trình tự của SEQ ID NO:19. Theo một số phương án, trình tự CDR1 bao gồm các gốc axit amin 27-32; 50-52; 89-97 lần lượt của CDR1, CDR2, CDR3.

Theo một số phương án, trình tự CDR của kháng thể theo sáng chế là trình tự có độ tương đồng ít nhất là 85%, độ tương đồng ít nhất là 90%, độ tương đồng ít nhất là 95%, độ tương đồng ít nhất là 99% so với trình tự CDR hoặc tập hợp trình tự CDR trong SEQ ID NO:1-18. Theo một số phương án, trình tự CDR theo sáng chế bao gồm một, hai, ba hoặc nhiều axit amin thế so với trình tự CDR hoặc tập hợp trình tự CDR trong trình tự bất kỳ trong SEQ ID NO:1-18. Theo một số phương án, (các) axit amin thế là một hoặc nhiều vị trí 5 hoặc 10 của CDR1, vị trí 2, 6 hoặc 7 của CDR2, vị trí 1, 8, 9 hoặc 10 của CDR3, so với công thức họ 2 được nêu trên.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi gắn kết CD3 mô tả trong đây, cặp đôi với chuỗi nhẹ. Theo một số phương án, chuỗi nhẹ bao gồm trình tự vùng biến đổi nêu trong SEQ ID NO:19, hoặc vùng biến đổi bao gồm tập hợp trình tự CDR trong SEQ ID NO:19 và trình tự vùng khung. Các trình tự Fc khác nhau hữu dụng, bao gồm nhưng không giới hạn ở IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 của người, v.v. Theo một số phương án, nhánh thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng biến đổi mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên liên kết khối u. Theo một số phương án, nhánh thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép bao gồm vùng biến đổi mà gắn kết đặc hiệu với BCMA. Theo một số phương án, nhánh kháng-BCMA là vùng biến đổi chuỗi đơn, ví dụ như trình bày trong Fig.2B. Theo một số phương án, nhánh kháng-BCMA bao gồm trình tự vùng biến đổi nêu trong SEQ ID NO:20; hoặc trình tự vùng biến đổi tiếp đôi nêu trong SEQ ID NO:21. Trình tự Fc của nhánh kháng-BCMA có thể là, mà không hạn chế, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 của người, v.v. Trình tự CDR có thể là trình tự nằm trong SEQ ID NO:20. Theo một số phương án, trình tự CDR bao gồm các gốc axit amin 26-33; 51-58; 97-108 lần lượt của CDR1, CDR2, CDR3.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất được phẩm, bao gồm ít nhất vùng chức năng VH gắn kết CD3 theo sáng chế, ví dụ kháng thể đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép, v.v. hoặc

protein giống kháng thể bao gồm ít nhất vùng chức năng VH gắn kết CD3 theo sáng chế; và tá được được dụng. Dược phẩm này có thể được làm đông khô, treo trong dung dịch, v.v. và có thể được đề xuất là chế phẩm liều đơn vị.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư, phương pháp này bao gồm sử dụng cho cá thể cần được điều trị liệu có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép, v.v theo sáng chế. Khi kháng thể là đặc hiệu kép, vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai có thể gắn kết đặc hiệu kháng nguyên khối u, protein điểm kiểm soát, v.v. Theo các phương án khác nhau, bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có ung thư buồng trứng, ung thư vú, dạ dày - ruột non, ung thư não, ung thư đầu và cổ, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư kết tràng, ung thư phổi, bệnh bạch cầu, u lympho, ung thư mô kết, ung thư biểu mô, u tế bào thần kinh, ung thư biểu mô tế bào vảy, u tế bào mầm, bệnh di căn, u không biệt hóa, u tinh seminom, u melanin, u tủy, u nguyên bào thần kinh, u tế bào hỗn hợp, và bệnh tạo u do các chất gây viêm.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh viêm, phương pháp này bao gồm sử dụng cho cá thể cần được điều trị liệu có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép, v.v. theo sáng chế. Khi kháng thể là đặc hiệu kép, vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai có thể gắn kết đặc hiệu kháng nguyên gây bệnh, ví dụ vi khuẩn, virus hoặc ký sinh trùng.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp để sản xuất kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế bao gồm bước biểu hiện trình tự kháng thể, ví dụ một hoặc nhiều chuỗi nhẹ mã hóa trình tự, một hoặc nhiều chuỗi nặng mã hóa trình tự, trong tế bào chủ đơn. Theo các phương án khác nhau, tế bào chủ có thể là tế bào nhân không điển hình hoặc nhân điển hình, như tế bào động vật có vú.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế được hiểu rõ nhất từ phần mô tả chi tiết sau đây được xem xét cùng với hình vẽ kèm theo. Patent hoặc đơn chứa ít nhất một hình vẽ màu. Các bản sao của patent hoặc công bố đơn patent này với các hình vẽ màu sẽ được cung cấp bởi Cơ quan khi được yêu cầu và cần phải trả phí. Nhấn mạnh rằng, theo thực hành thông thường, các nét khác nhau của hình vẽ là không phóng đại. Ngược lại, các kích thước của các nét khác nhau tùy ý được phóng to hoặc thu nhỏ cho rõ. Trong mục hình vẽ là các hình vẽ sau.

FIG.1A-1C. FIG.1A thể hiện sắp xếp của vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của kháng

thể trong họ kháng thể 2 của SEQ ID NO:1-18, mà gắn kết đặc hiệu với CD3 người, tương ứng với các gốc 26-33; 51-58; và 97-112. **FIG.1B** thể hiện vùng CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ cố định (SEQ ID NO:19); và trình tự kháng-BCMA ví dụ (SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:21). **FIG.1C** cung cấp trình tự CDR của kháng thể kháng-CD3 đối chứng (SEQ ID NO:22), ID 304704.

FIG.2A-2E. Mô hình giản lược của kháng thể đặc hiệu kép của người. **FIG.2A** kháng thể đặc hiệu kép kháng-CD3:kháng-kháng nguyên-khối u với chuỗi nhẹ chung (tổng cộng 3 chuỗi duy nhất). **FIG.2B** kháng thể đặc hiệu kép kháng-CD3:kháng-kháng nguyên-khối u với 2 chuỗi nhẹ duy nhất (tổng 4 chuỗi duy nhất). **FIG.2C** kháng thể đặc hiệu kép kháng-CD3:kháng-kháng nguyên-khối u với chuỗi vùng chức năng gắn kết kháng nguyên khối u chỉ có chuỗi nặng (3 chuỗi duy nhất). **FIG.2D** kháng thể đặc hiệu kép kháng-CD3:kháng-kháng nguyên-khối u với vùng chức năng gắn kết kháng nguyên khối u scFv (tổng 3 chuỗi duy nhất). **FIG.2E** kháng thể đặc hiệu kép kháng-CD3:kháng-kháng nguyên-khối u với vùng chức năng gắn kết kháng-CD3 scFv (tổng 3 chuỗi duy nhất)

FIG.3. Bảng số liệu kháng-CD3 họ 2 tổng kết tính chất của kháng thể kháng-CD3 trong định dạng đặc hiệu đơn và đặc hiệu kép. Cột 1 thể hiện số ID trình tự của trình tự VH kháng-CD3. Cột 2 thể hiện giá trị MFI của sự gắn kết tế bào Jurkat của kháng-CD3 đặc hiệu đơn gốc. Cột 3 thể hiện giá trị MFI của sự gắn kết tế bào T cyno của kháng-CD3 đặc hiệu đơn gốc. Cột 4 thể hiện tên của kháng thể đặc hiệu kép aCD3:aBCMA. Cột 5 thể hiện mức picogram của IL-2 được giải phóng bởi tế bào T pan được kích thích bởi kháng thể đặc hiệu kép gắn kết protein BCMA được bao lên nhựa ở liều được chỉ ra. Cột 6 thể hiện mức picogram của IL-6 được giải phóng bởi tế bào T pan được kích thích bởi kháng thể đặc hiệu kép gắn kết protein BCMA được bao lên nhựa ở liều được chỉ ra. Cột 7 thể hiện mức picogram của IL-10 được giải phóng bởi tế bào T pan được kích thích bởi kháng thể đặc hiệu kép gắn kết protein BCMA được bao lên nhựa ở liều được chỉ ra. Cột 8 thể hiện mức picogram của IFN- γ được giải phóng bởi tế bào T pan được kích thích bởi kháng thể đặc hiệu kép gắn kết protein BCMA được bao lên nhựa ở liều được chỉ ra. Cột 9 thể hiện mức picogram của TNF α được giải phóng bởi tế bào T pan được kích thích bởi kháng thể đặc hiệu kép gắn kết protein BCMA được bao lên nhựa ở liều được chỉ ra. Cột 10 thể hiện giá trị EC₅₀ của sự phân giải tế bào u U266 do kháng thể đặc hiệu kép trong sự có mặt của tế bào T pan của người. Cột 11 thể hiện phần trăm ly giải tế bào u U266 trong sự có mặt của kháng thể đặc hiệu kép và tế bào T pan của người ở liều 333ng/mL kháng thể đặc hiệu kép.

Cột 12 thể hiện ái lực gắn kết protein của nhánh kháng-CD3 của kháng thể đặc hiệu kép đo được bởi Octet. Cột 13 thể hiện giá trị MFI của sự gắn kết tế bào Jurkat của kháng thể đặc hiệu kép.

FIG.4. Sự ly giải tế bào u do kháng thể đặc hiệu kép. Bảy kháng thể đặc hiệu kép α CD3_fam2:aBCMA, mỗi kháng thể với nhánh kháng-CD3 duy nhất và nhánh kháng-BCMA chung, được thử nghiệm về khả năng diệt tế bào u U266 BCMA+ thông qua việc đổi hướng tế bào phôi T hoạt hóa. Trong thử nghiệm này, tế bào U266 biểu hiện BCMA được phối hợp với tế bào T pan hoạt hóa với tỷ lệ E:T 10:1 cùng với việc bổ sung kháng thể đặc hiệu kép. Trục-x thể hiện nồng độ của kháng thể sử dụng và trục-y thể hiện mức % phân giải của tế bào u 6 giờ sau khi bổ sung kháng thể.

FIG.5. Hoạt tính diệt U266 đặc hiệu kép tỷ lệ với mức giải phóng IL-2. Sự so sánh hoạt tính ly giải tế bào u do kháng thể đặc hiệu kép với mức giải phóng IL-2 xytokin được trình bày trong biểu đồ từng điểm. Mỗi tương quan giữa mức tạo ra IL-2 và sự ly giải tế bào u U266 là $R^2 = 0,37$.

FIG.6. Hoạt tính diệt U266 đặc hiệu kép tỷ lệ với mức giải phóng IFN- γ . Sự so sánh hoạt tính ly giải tế bào u do kháng thể đặc hiệu kép với mức giải phóng IFN- γ xytokin được trình bày trong biểu đồ từng điểm. Mỗi tương quan giữa mức giải phóng IFN-g và sự ly giải tế bào u U266 là $R^2 = 0,53$.

FIG.7. Hoạt tính diệt U266 đặc hiệu kép tỷ lệ với ái lực gắn kết kháng-CD3. Sự so sánh hoạt tính ly giải tế bào u U266 do kháng thể đặc hiệu kép với ái lực gắn kết kháng-CD3 được trình bày trong biểu đồ từng điểm. Mỗi tương quan giữa giá trị EC50 của sự diệt U266 và ái lực gắn kết protein là $R^2 = 0,93$.

FIG.8A-8D. Sự ly giải tế bào u do kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể đặc hiệu kép α CD3_F1F:aBCMA được thử nghiệm về khả năng diệt ba tế bào u BCMA+ khác nhau và một dòng tế bào BCMA-âm tính thông qua việc đổi hướng tế bào phôi T hoạt hóa. Trong thử nghiệm này, tế bào u được trộn với tế bào T pan hoạt hóa với tỷ lệ E:T 10:1 cùng với việc bổ sung kháng thể đặc hiệu kép. **FIG.8A** thể hiện sự diệt tế bào RPMI-8226, **FIG.8B** thể hiện sự diệt tế bào NCI-H929, **FIG.8C** thể hiện sự diệt tế bào U-266, và **FIG.8D** thể hiện sự diệt tế bào K562, một đối chứng âm. Trục-x chỉ nồng độ kháng thể sử dụng và trục-y chỉ mức % ly giải của tế bào u 6 giờ sau khi bổ sung kháng thể.

FIG.9A-9D. Sự giải phóng IL-2 do kháng thể đặc hiệu kép. Mức giải phóng xytokin

IL-2 được đo sau khi để nghỉ tế bào T của người được nuôi cấy với các dòng tế bào u khác nhau và liều tăng dần của kháng thể đặc hiệu kép α CD3_F1F:aBCMA. **FIG.9A** thể hiện sự giải phóng IL-2 được kích thích bởi tế bào RPMI-8226, **FIG.9B** thể hiện sự giải phóng IL-2 được kích thích bởi tế bào NCI-H929, **FIG.9C** thể hiện sự giải phóng IL-2 được kích thích bởi tế bào U-266, và **FIG.9D** thể hiện sự giải phóng IL-2 được kích thích bởi tế bào K562, một đối chứng âm.

FIG.10A-10D. Sự giải phóng IFN- γ do kháng thể đặc hiệu kép. Mức giải phóng xytokin IFN- γ được đo sau khi để nghỉ tế bào T của người được nuôi cấy với các dòng tế bào u khác nhau và liều tăng dần của kháng thể đặc hiệu kép α CD3_F1F:aBCMA. **FIG.10A** thể hiện sự giải phóng IFN- γ được kích thích bởi tế bào RPMI-8226, **FIG.10B** thể hiện sự giải phóng IFN- γ được kích thích bởi tế bào NCI-H929, **FIG.10C** thể hiện sự giải phóng IFN- γ được kích thích bởi tế bào U-266, và **FIG.10D** thể hiện sự giải phóng IFN- γ được kích thích bởi tế bào K562, một đối chứng âm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để giúp hiểu sáng chế, một số thuật ngữ được định nghĩa sau đây.

Trước khi mô tả chất hoạt động và phương pháp, cần hiểu rằng sáng chế không bị hạn chế ở phương pháp, sản phẩm, thiết bị và yếu tố cụ thể được mô tả, do các phương pháp, thiết bị và chế phẩm đương nhiên có thể, thay đổi. Cũng cần hiểu rằng thuật ngữ sử dụng trong đây là chỉ với mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế mà phạm vi này được giới hạn chỉ bởi bộ yêu cầu bảo hộ đính kèm.

Phải lưu ý rằng như sử dụng trong đây và trong yêu cầu bảo hộ đính kèm, dạng số ít "một", và "này" bao gồm số nhiều trừ khi được quy định khác. Do đó, ví dụ, nhắc đến "một được chất được xem xét" là để chỉ một hoặc hỗn hợp các hợp chất, và nhắc đến "phương pháp này" bao gồm nhắc đến các bước và phương pháp tương đương đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và tương tự.

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học sử dụng trong đây có ý nghĩa giống như được hiểu chung bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế. Tất cả các công bố được đề cập trong đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn với mục đích mô tả và bộc lộ các thiết bị, chế phẩm và phương pháp được mô tả trong công bố và có thể được sử dụng kết hợp với sáng chế đang được mô tả.

Khi đề cập đến một khoảng giá trị, hiểu rằng mỗi giá trị xen kẽ, đến một phần mười của đơn vị của giới hạn dưới trừ khi được quy định khác, nằm giữa giới hạn trên và giới hạn dưới của khoảng và giá trị được nêu khác bất kỳ hoặc giá trị xen giữa trong khoảng được nêu là nằm trong sáng chế. Giá trị trên và giá trị dưới của các khoảng nhỏ hơn này độc lập có thể nằm trong các khoảng nhỏ hơn cũng thuộc phạm vi sáng chế, đối tượng to giới hạn loại trừ cụ thể bất kỳ trong khoảng được nêu. Trong đó, khoảng được nêu bao gồm một hoặc cả hai giới hạn, các khoảng không bao gồm cả hai giới hạn trên và dưới cũng nằm trong phạm vi sáng chế.

Trong phần mô tả sau đây, các giá trị cụ thể được nêu để khiến dễ hiểu hơn sáng chế. Tuy nhiên, rõ ràng là với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sáng chế có thể được thực hành mà không có một hoặc nhiều chi tiết cụ thể này. Trong các trường hợp khác, không mô tả các đặc điểm và quy trình đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để tránh khiến cho sáng chế khó hiểu.

Nói chung, các phương pháp thông thường để tổng hợp protein, nuôi cấy tế bào tái tổ hợp và phân tách protein, và các kỹ thuật tái tổ hợp ADN trong phạm vi của lĩnh vực sáng chế được sử dụng trong sáng chế. Các kỹ thuật như vậy được giải thích đầy đủ trong y văn, xem, *ví dụ*, Maniatis, Fritsch & Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Sambrook, Russell và Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2001); Harlow, Lane và Harlow, *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I*, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); và Harlow và Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

Định nghĩa

Thuật ngữ “bao gồm” có nghĩa là đòi hỏi có các thành phần được đề cập trong chế phẩm/phương pháp/kit, nhưng các thành phần khác cũng có thể có để tạo ra chế phẩm/phương pháp/kit v.v. trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ “về cơ bản chỉ có”, có nghĩa là giới hạn phạm vi của chế phẩm hoặc phương pháp được mô tả ở các nguyên liệu hoặc bước được nêu mà không ảnh hưởng về mặt vật chất đến (các) đặc điểm cơ bản và mới của sáng chế.

Thuật ngữ “chỉ có”, có nghĩa loại trừ khỏi chế phẩm, phương pháp, hoặc kit thành phần, bước hoặc yếu tố bất kỳ không được nêu trong yêu cầu bảo hộ.

Thuật ngữ "việc điều trị", "điều trị" và tương tự được sử dụng trong đây để chỉ chung việc thu được hiệu quả được lý và/hoặc sinh lý mong muốn. Hiệu quả này có thể là phòng bệnh hoàn toàn hoặc một phần phòng bệnh hoặc triệu chứng của nó và/hoặc có thể là chữa bệnh một phần hoặc hoàn toàn chữa trị bệnh và/hoặc tác dụng phụ của bệnh. "Việc điều trị" như được sử dụng trong đây bao hàm việc điều trị bất kỳ bệnh ở động vật có vú, và bao gồm: (a) phòng bệnh không xảy ra ở một đối tượng mà có thể dễ mắc bệnh này nhưng chưa được chẩn đoán là mắc bệnh; (b) ức chế bệnh, tức là, làm chậm lại sự phát triển của bệnh; hoặc (c) thuyên giảm bệnh, tức là, đẩy lùi bệnh. Tác nhân điều trị có thể được sử dụng trước, trong hoặc sau khi xuất hiện bệnh hoặc tổn thương. Việc điều trị bệnh đang diễn ra, trong đó việc điều trị này ổn định hoặc làm giảm các triệu chứng lâm sàng không mong muốn của bệnh nhân, là được quan tâm đặc biệt. Việc điều trị được mong muốn thực hiện trước khi hoàn toàn mất chức năng của các mô bị tấn công. Liệu pháp mục tiêu có thể được sử dụng trong giai đoạn triệu chứng của bệnh, và trong một số trường hợp là sau giai đoạn triệu chứng của bệnh.

"Lượng có hiệu quả điều trị" là để chỉ lượng tác nhân hoạt động cần để tạo ra lợi ích điều trị cho đối tượng. Ví dụ, "lượng có hiệu quả điều trị" là lượng mà tạo ra, cải thiện hoặc nói cách khác là gây ra sự cải thiện về triệu chứng bệnh học, quá trình tiến triển bệnh hoặc điều kiện sinh lý liên quan đến bệnh hoặc cải thiện khả năng chống lại bệnh.

Thuật ngữ "đối tượng," "cá thể," và "bệnh nhân" được sử dụng thay thế cho nhau trong đây để chỉ động vật có vú được đánh giá để điều trị và/hoặc đang được điều trị. Theo một phương án, động vật có vú là người. Thuật ngữ "đối tượng," "cá thể," và "bệnh nhân" bao gồm, không giới hạn ở, các cá thể mắc bệnh ung thư, cá thể có bệnh tự miễn, có bệnh nhiễm trùng gây bệnh, và tương tự. Đối tượng có thể là người, nhưng cũng bao gồm động vật có vú khác, cụ thể là động vật có vú hữu dụng làm mô hình thí nghiệm cho bệnh ở người, ví dụ chuột nhắt, chuột cống, v.v.

Thuật ngữ "bệnh ung thư," "bệnh tăng sinh," và "khối u" được sử dụng thay thế cho nhau trong đây để chỉ các tế bào biểu hiện sự phát triển không kiểm soát, tự phát, sao cho chúng biểu hiện sự phát triển kiểu hình bất thường có đặc trưng là sự mất kiểm soát đáng kể sự tăng sinh tế bào. Tế bào được quan tâm để phát hiện, phân tích, hoặc điều trị trong sáng chế bao gồm tế bào tiền ung thư (ví dụ, lành tính), ác tính, tiền di căn, di căn, và không-di căn. Đã biết bệnh ung thư của hầu hết các mô. Thuật ngữ "gánh nặng ung thư" để chỉ lượng tế bào ung thư hoặc thể tích ung thư ở một đối tượng. Việc làm giảm gánh

nặng ung thư do đó để chỉ việc làm giảm số lượng tế bào ung thư hoặc thể tích ung thư ở đối tượng. Thuật ngữ "tế bào ung thư" như được sử dụng trong đây để chỉ tế bào bất kỳ mà là tế bào ung thư hoặc có nguồn gốc từ tế bào ung thư ví dụ dòng tế bào ung thư. Nhiều kiểu bệnh ung thư đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm khối u rắn như ung thư biểu mô, ung thư mô kết, u nguyên bào đệm, u melanin, u lympho, u tủy, v.v., và bệnh ung thư hệ tuần hoàn như bệnh bạch cầu, bao gồm cụ thể bệnh bạch cầu tế bào B, bệnh bạch cầu tế bào T, v.v. Ví dụ về bệnh ung thư bao gồm nhưng không giới hạn ở, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư kết tràng, ung thư phổi, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tế bào gan, ung thư dạ dày, ung thư tụy, ung thư cổ, ung thư buồng trứng, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư đường niệu, ung thư tuyến giáp, ung thư thận, ung thư biểu mô, u melanin, ung thư đầu và cổ, và ung thư não.

"Độc tính tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể" và "ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)" để chỉ một phản ứng qua trung gian tế bào trong đó các tế bào gây độc tế bào không đặc hiệu biểu hiện thụ thể Fc, như tế bào diệt tự nhiên, bạch cầu trung tính, và đại thực bào, nhận dạng kháng thể gắn kết trên tế bào đích và gây ly giải tế bào đích. Hoạt tính ADCC có thể được đánh giá bởi các phương pháp, như phương pháp được mô tả trong Patent Mỹ số 5,821,337. ADCP để chỉ sự thực bào do tế bào phụ thuộc kháng thể.

"Tế bào hiệu ứng" là bạch cầu biểu hiện một hoặc nhiều thụ thể vùng cố định và thực hiện chức năng hiệu ứng.

"Xytokin" là protein được giải phóng bởi một tế bào để tác động lên tế bào khác là chất trung gian giữa các tế bào. Xytokin được quan tâm bao gồm, không giới hạn ở, xytokin được giải phóng từ các tế bào T hoạt hóa, ví dụ IL-2, IFN γ , v.v.

"Không sinh miễn dịch" để chỉ một vật liệu không bắt đầu, kích thích hoặc tăng đáp ứng miễn dịch trong đó đáp ứng miễn dịch này bao gồm đáp ứng miễn dịch thích ứng và/hoặc đáp ứng miễn dịch tự nhiên.

Thuật ngữ "được phân tách" có nghĩa là vật liệu được lấy từ môi trường tự gốc của nó (ví dụ, môi trường tự nhiên nếu nó có trong tự nhiên). Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit có trong tự nhiên có trong một động vật sống là không được phân tách, nhưng cũng polynucleotit hoặc polypeptit này, được tách từ một số hoặc tất cả các vật liệu cùng tồn tại trong hệ tự nhiên, là được phân tách. Polynucleotit này có thể là một phần của vector

và/hoặc các polynucleotit hoặc polypeptit này có thể là một phần của chế phẩm, và vẫn là được phân tách trong đó các vectơ hoặc chế phẩm này không phải là một phần của môi trường tự nhiên của nó.

"Tá dược được dụng" có nghĩa là tá dược hữu dụng trong bào chế dược phẩm thường là an toàn, không độc, và được mong muốn, và bao gồm tá dược mà chấp nhận được để sử dụng trong thú y cũng như sử dụng làm thuốc cho người. Các tá dược như vậy có thể là rắn, lỏng, bán rắn, hoặc, trong trường hợp chế phẩm sol khí, là dạng khí.

"Muối và este được dụng" có nghĩa là muối và este mà được dụng và có đặc điểm dược lý mong muốn. Muối như vậy bao gồm muối có thể được tạo ra khi các proton axit có trong hợp chất có thể phản ứng với bazơ vô cơ hoặc hữu cơ. Muối vô cơ thích hợp bao gồm các muối được tạo ra với kim loại kiềm, *ví dụ* natri và kali, magie, canxi, và nhôm. Muối hữu cơ muối thích hợp bao gồm các muối được tạo ra với bazơ hữu cơ như bazơ amin, *ví dụ*, etanolamin, dietanolamin, trietanolamin, trometamin, N metylglucamin, và tương tự. Muối như vậy cũng bao gồm muối cộng axit tạo ra với axit vô cơ (*ví dụ*, axit clohydric và bromhydric) và axit hữu cơ (*ví dụ*, axit axetic, axit xitric, axit maleic, và axit alkan- và aren-sulfonic như axit metansulfonic và axit benzensulfonic). Este được dụng bao gồm este tạo ra từ nhóm carboxy, sulfonyloxy, và phosphonoxo có trong hợp chất, *ví dụ*, C₁₋₆ alkyl este. Khi có hai nhóm axit, muối hoặc este được dụng có thể là mono-axit-mono-muối hoặc este hoặc di-muối hoặc đi-este; và tương tự khi có nhiều hơn hai nhóm axit, một số hoặc tất cả các nhóm này có thể được muối hóa hoặc este hóa. Các hợp chất được kể tên trong sáng chế có thể có ở dạng không muối hóa hoặc không este hóa, hoặc ở dạng muối hóa và/hoặc este hóa, và việc kể tên các hợp chất này được dự tính là bao gồm cả hợp chất gốc (không muối hóa và không este hóa) và muối và este được dụng của nó. Cũng như vậy, một số hợp chất được kể tên trong sáng chế có thể có ở nhiều hơn một dạng đồng phân lập thể, và viết kể tên các hợp chất này được dự tính là bao gồm tất cả các đồng phân lập thể đơn và tất cả các hỗn hợp (hoặc là raxemic hoặc khác) của các đồng phân lập thể này.

Thuật ngữ "dược dụng", "dung nạp về sinh lý" và các cách diễn đạt về mặt ngữ pháp khác của chúng, khi đề cập đến chế phẩm, chất mang, chất pha loãng và chất phản ứng, được sử dụng thay thế cho nhau và thể hiện là các nguyên liệu có thể sử dụng cho hoặc trên người mà không tạo ra tác động sinh lý không mong muốn bất kỳ ở mức độ mà cấm sử dụng chế phẩm.

“Độ tương đồng” giữa hai trình tự được xác định bởi độ tương đồng trình tự. Nếu hai trình tự, được so sánh với nhau, khác nhau ở độ dài, độ tương đồng trình tự tốt hơn là liên quan đến phần trăm của các gốc nucleotit của trình tự ngắn hơn mà giống hệt với các gốc nucleotit của trình tự dài hơn. Độ tương đồng trình tự có thể được xác định thông thường bằng cách sử dụng các chương trình máy tính như chương trình Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Phiên bản 8 cho Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, Wis. 53711). Bestfit sử dụng thuật toán độ tương đồng cục bộ của Smith và Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, để tìm các đoạn có độ tương đồng trình tự cao nhất giữa hai trình tự. Khi sử dụng Bestfit hoặc các chương trình sắp xếp trình tự khác để xác định liệu một trình tự cụ thể ví dụ có độ tương đồng 95% với trình tự đối chứng của sáng chế hay không, các thông số được ưu tiên điều chỉnh sao cho phần trăm độ tương đồng được tính trên toàn bộ chiều dài của trình tự đối chứng và sao cho cho phép độ chênh lệch của độ tương đồng tối đa đến 5% tổng số nucleotit trong trình tự đối chứng. Khi sử dụng Bestfit, thông số được coi là tùy chọn tốt hơn là được đưa về giá trị được thiết lập sẵn (“mặc định”). Độ lệch xuất hiện trong phép so sánh giữa trình tự được nêu và trình tự được mô tả trên theo sáng chế ví dụ có thể là do sự thêm, xóa, thế, xen hoặc tái tổ hợp. Việc so sánh trình tự như vậy tốt hơn là có thể được thực hiện bởi chương trình “fasta20u66” (phiên bản 2.0u66, Tháng Chín 1998 của William R. Pearson và trường Đại học Virginia; cũng xem W. R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, ví dụ đính kèm và <http://workbench.sdsc.edu/>). Với mục đích này, có thể sử dụng thiết lập thông số “mặc định”.

"Biến thể" để chỉ các polypeptit có trình tự axit amin khác ở một mức độ so với trình tự polypeptit tự nhiên. Thông thường, các biến thể trình tự axit amin sẽ có ít nhất độ tương đồng trình tự khoảng 80%, tốt hơn là, ít nhất khoảng 90% tương đồng về trình tự. Biến thể trình tự axit amin có thể có axit amin thế, xóa, và/hoặc xen ở một số vị trí nhất định trong trình tự axit amin đối chứng.

Thuật ngữ “vector,” như được sử dụng trong đây, được dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác đến nơi mà nó đã gắn kết vào. Một kiểu vector là “plasmid”, để chỉ một nút thắt ADN vòng mạch đôi mà đoạn ADN bổ sung có thể được gắn vào đó. Kiểu vector khác là vector virus, trong đó các đoạn ADN bổ sung có thể được nối vào trong hệ gen virus. Một số vector nhất định có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào đó (ví dụ, vector vi khuẩn có nguồn gốc vi khuẩn được sao

chép và vector động vật có vú thể bổ sung). Các vector khác (ví dụ, vector động vật có vú không phải thể bổ sung) có thể được nhập vào trong hệ gen của tế bào chủ khi đưa vào tế bào chủ, và bằng cách đó được sao chép cùng với hệ gen của thể chủ. Hơn nữa, một số vector nhất định có khả năng điều khiển sự biểu hiện của gen mà chúng liên kết điều khiển vào đó. Các vector như vậy được gọi trong đây là “vector biểu hiện tái tổ hợp” (hoặc đơn giản là, “vector tái tổ hợp”). Nói chung, vector biểu hiện để ứng dụng trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmid. Theo sáng chế, “plasmid” và “vector” có thể được sử dụng thay thế cho nhau do plasmid là dạng được sử dụng thông dụng nhất của vector.

Thuật ngữ “tế bào chủ” (hoặc “tế bào chủ tái tổ hợp”), như được sử dụng trong đây, được dùng để chỉ tế bào đã được biến đổi gen, hoặc có thể được biến đổi gen bằng cách đưa polynucleotit ngoại sinh vào, như plasmid hoặc vector tái tổ hợp. Nên hiểu rằng thuật ngữ này được dùng để chỉ không chỉ tế bào quan tâm cụ thể mà còn đến thế hệ con của tế bào này. Do có thể xảy ra một số biến đổi nhất định trong các thế hệ tiếp theo hoặc do đột biến hoặc do tác động môi trường, thế hệ con như vậy có thể không, thực tế là, giống hệt với tế bào gốc, nhưng vẫn nằm trong phạm vi của thuật ngữ “tế bào chủ” như được sử dụng trong đây.

“Ái lực gắn kết” thường để chỉ độ mạnh của tổng các tương tác không cộng hóa trị giữa vị trí gắn kết đơn của một phân tử (ví dụ, một kháng thể hoặc phân tử gắn kết khác) và đối tác gắn kết của nó (ví dụ, kháng nguyên hoặc thụ thể). Ái lực của phân tử X với đối tác Y của nó thường có thể được thể hiện bởi hằng số phân ly (K_d). Ái lực này có thể đo được bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp mô tả trong đây. Kháng thể ái lực thấp gắn kết kháng thể (hoặc thụ thể) yếu và có xu hướng dễ phân ly, trong khi đó kháng thể ái lực cao gắn kết kháng nguyên (hoặc thụ thể) chặt hơn và giữ sự gắn kết lâu hơn.

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “thể liên hợp” như được mô tả và yêu cầu bảo hộ trong đây được định nghĩa là phân tử dị loại tạo thành bởi sự gắn cộng hóa trị một hoặc nhiều mảnh kháng thể với một hoặc nhiều phân tử polyme, trong đó phân tử dị loại là tan được trong nước, tức là tan được trong các dịch sinh lý như máu, và trong đó phân tử dị loại này không có thể kết tụ có cấu trúc bất kỳ. Thể liên hợp được quan tâm là PEG. Trong phần định nghĩa nêu trên, thuật ngữ “thể kết tụ có cấu trúc” để chỉ (1) thể kết tụ bất kỳ của các phân tử trong dung dịch nước có cấu trúc hình cầu hoặc cấu trúc vỏ hình cầu, sao cho phân tử dị loại là không có cấu trúc mixen hoặc nhũ tương bất kỳ, và không được gắn vào

lớp lipid kép, nang hoặc liposom; và (2) thể kết tủa bất kỳ của các phân tử ở dạng rắn hoặc không tan, như hệ nền hạt sắc ký, mà không giải phóng phân tử dị loại vào trong dung dịch khi tiếp xúc với pha nước. Do đó, thuật ngữ "thể liên hợp" như xác định trong đây bao gồm phân tử dị loại được đề cập trên trong chất kết tủa, chất lắng cặn, chất nền có thể ăn mòn sinh học hoặc chất rắn khác mà có khả năng giải phóng phân tử dị loại vào trong dung dịch lỏng khi hydrat hóa chất rắn này

Thuật ngữ "chất đánh dấu" khi được sử dụng trong đây để chỉ một hợp chất hoặc chế phẩm có thể phát hiện được mà được liên hợp trực tiếp hoặc gián tiếp với kháng thể. Chất đánh dấu bản thân nó có thể là phát hiện được bởi chính nó (ví dụ, chất đánh dấu đồng vị phóng xạ hoặc chất đánh dấu huỳnh quang) hoặc, trong trường hợp chất đánh dấu là enzym, có thể xúc tác sự biến đổi hóa học của hợp chất cơ chất hoặc chế phẩm mà có thể phát hiện.

Thuật ngữ "pha rắn" có nghĩa là chất nền không phải là nước mà kháng thể của sáng chế có thể bám dính vào đó. Ví dụ về pha rắn bao gồm trong đây bao gồm pha rắn cấu tạo một phần hoặc hoàn toàn từ thủy tinh (ví dụ, thủy tinh có lỗ được điều chỉnh), polysaccarit (ví dụ, agaroza), polyacrylamit, polystyren, rượu polyvinyl và silicon. Theo một số phương án nhất định, phụ thuộc vào nội dung, pha rắn có thể bao gồm lỗ của đĩa thử nghiệm; trong trường hợp khác nó là cột tinh chế (ví dụ, cột sắc ký ái lực). Thuật ngữ này cũng bao gồm pha rắn không liên tục chứa các hạt riêng biệt, như pha rắn được mô tả trong Patent Mỹ số 4,275,149.

Kháng thể, cũng gọi là globulin miễn dịch, thường bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ, trong đó vùng chức năng đầu amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là biến đổi về trình tự, do đó thường được gọi là vùng biến đổi vùng chức năng, hoặc vùng chức năng nặng biến đổi (VH) hoặc nhẹ biến đổi (VH). Hai vùng chức năng này thường liên kết để tạo ra vùng gắn kết đặc hiệu, mặc dù cũng được bàn luận kỹ trong đây, cũng có thể thu được sự gắn kết đặc hiệu với trình tự biến đổi chỉ có chuỗi nặng, và nhiều loại cấu hình không tự nhiên của kháng thể đã được biết và sử dụng trong lĩnh vực này.

Kháng thể hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên "chức năng" hoặc "có tác dụng sinh học" (bao gồm kháng thể chỉ gồm chuỗi nặng và phân tử giống kháng thể gồm ba chuỗi đặc hiệu kép (TCA) trong đây) là một kháng thể hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên gây ra một hoặc nhiều tác dụng tự nhiên của nó về cấu trúc, điều hòa, hóa sinh hoặc sinh lý. Ví

dụ, kháng thể chức năng hoặc phân tử gắn kết khác, ví dụ TCA, có thể có khả năng gắn kết đặc hiệu kháng nguyên và sự gắn kết lần lượt có thể gây ra hoặc biến đổi một hiện tượng tế bào hoặc phân tử như truyền tín hiệu tải nạp hoặc tác dụng enzym. Kháng thể chức năng hoặc phân tử gắn kết khác, ví dụ TCA, cũng có thể ức chế sự hoạt hóa phối tử của thụ thể hoặc tác dụng là chất chủ vận hoặc chất đối kháng. Khả năng của một kháng thể hoặc phân tử gắn kết khác, ví dụ TCA, để gây ra một hoặc nhiều tác dụng tự nhiên của nó phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm sự gấp nếp đúng và sự tổ hợp của các sợi polypeptit.

Thuật ngữ “kháng thể” trong đây được sử dụng với nghĩa rộng nhất và cụ thể bao hàm kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, monome, dime, đa phân tử, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), kháng thể chỉ gồm chuỗi nặng, kháng thể ba chuỗi, Fv sợi đơn, kháng thể nano, v.v., và cũng bao gồm mảnh kháng thể, miễn là chúng biểu hiện hoạt tính sinh học mong muốn (Miller và đồng tác giả (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Các kháng thể có thể là của chuột, của người, được biến đổi cho phù hợp với người, khảm, hoặc có nguồn gốc từ loài khác.

Thuật ngữ kháng thể có thể để chỉ chuỗi nặng chiều dài đầy đủ, chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ, phân tử globulin miễn dịch nguyên vẹn; hoặc phần hoạt động miễn dịch của polypeptit bất kỳ, tức là, polypeptit chứa vị trí gắn kết kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu miễn dịch kháng nguyên của đích quan tâm hoặc một phần của nó, các đích này bao gồm nhưng không giới hạn ở, tế bào ung thư hoặc các tế bào mà tạo ra các kháng thể tự miễn liên quan đến bệnh tự miễn. Globulin miễn dịch bộc lộ trong đây có thể là thuộc typ bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, và IgA), nhóm bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc phân nhóm phân tử globulin miễn dịch, bao gồm phân nhóm được thao tác di truyền có các phần Fc được biến đổi mà gây ra hoạt tính tế bào hiệu ứng tăng hoặc giảm. Globulin miễn dịch có thể có nguồn gốc từ loài bất kỳ. Theo một khía cạnh, globulin miễn dịch phần lớn có nguồn gốc người.

Thuật ngữ “biến đổi” để chỉ thực tế là một số phần nhất định của vùng chức năng biến đổi khác nhiều về mặt trình tự giữa các kháng thể và được sử dụng trong việc gắn kết và tính đặc hiệu của mỗi kháng thể cụ thể đối với kháng nguyên cụ thể của nó. Tuy nhiên, tính biến đổi không được phân bố đồng đều trong toàn bộ vùng chức năng biến đổi của kháng thể. Nó tập trung ở ba đoạn có tên là vùng siêu biến đổi cả trong vùng chức năng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Phần bảo tồn cao hơn của vùng chức năng biến đổi được gọi là vùng khung (FR). Vùng chức năng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tự

nhien mỗi vùng bao gồm bốn FR, chủ yếu có cấu hình phiến-beta, được nối với ba vùng siêu biến đổi, chúng tạo thành các nút thắt nối, và trong một số trường hợp tạo ra một phần của, cấu trúc phiến-beta. Vùng siêu biến đổi trong mỗi sợi được giữ với nhau trong khoảng cách gần bởi các FR và, với các vùng siêu biến đổi từ sợi khác, góp phần tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể (xem Kabat và đồng tác giả (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, xuất bản lần thứ 5 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.). Vùng chức năng cố định là không liên quan trực tiếp đến sự gắn kết kháng thể với kháng nguyên, nhưng lại biểu hiện các chức năng hiệu ứng khác nhau, như sự tham gia của kháng thể trong phản ứng gây độc tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC- antibody dependent cellular cytotoxicity).

Thuật ngữ “vùng siêu biến đổi” khi được sử dụng trong đây để chỉ các gốc axit amin của kháng thể mà có vai trò để gắn kết kháng nguyên. Vùng siêu biến đổi có thể bao gồm các gốc axit amin từ “vùng xác định bổ thể” hoặc “CDR” (complementarity determining region), và/hoặc gốc từ “nút thắt siêu biến đổi”. Các gốc “vùng khung” hoặc “FR” là các gốc vùng chức năng biến đổi không phải là các gốc vùng siêu biến đổi như xác định trong đây.

Vùng biến đổi được quan tâm bao gồm ít nhất một trình tự CDR từ vùng biến đổi họ 2 được đề xuất trong đây, thường ít nhất 2 trình tự CDR, và thông thường hơn là 3 trình tự CDR. Các ký hiệu CDR ví dụ được trình bày trong đây, tuy nhiên người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng một số định nghĩa của CDR thường được sử dụng, bao gồm định nghĩa Kabat (xem “Zhao và đồng tác giả A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions.” *Mol Immunol.* 2010;47:694–700), nó dựa trên sự biến đổi trình tự và thường được sử dụng nhất. Định nghĩa Chothia dựa trên vị trí của vùng nút thắt cấu trúc (Chothia và đồng tác giả “Conformations of immunoglobulin hypervariable regions.” *Nature.* 1989; 342:877–883). Các định nghĩa CDR khác được quan tâm bao gồm, không giới hạn ở, các định nghĩa được bộc lộ bởi Honegger, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool.” *J Mol Biol.* 2001;309:657–670; Ofran và đồng tác giả “Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes.” *J Immunol.* 2008;181:6230–6235; Almagro “Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of

antibody repertoires.” J Mol Recognit. 2004;17:132–143; và Padlan và đồng tác giả “Identification of specificity-determining residues in antibodies.” Faseb J. 1995;9:133–139., mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” như được sử dụng trong đây để chỉ kháng thể thu được từ nhóm kháng thể gần như đồng nhất, tức là, các kháng thể riêng biệt bao gồm nhóm này là giống nhau ngoại trừ các đột biến có thể xảy ra trong tự nhiên có thể có ở lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, kháng một vị trí kháng nguyên. Hơn nữa, trái với các chế phẩm kháng thể đa dòng, bao gồm các kháng thể khác nhau kháng các yếu tố quyết định (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng kháng một yếu tố quyết định trên kháng nguyên. Ngoài tính đặc hiệu của chúng, kháng thể đơn dòng có thuận lợi trong đó chúng có thể được tổng hợp mà không bị tạp nhiễm bởi các kháng thể khác. Từ chỉ rõ “đơn dòng” chỉ đặc điểm của kháng thể là thu được từ nhóm gần như đồng nhất các kháng thể, và không được hiểu là đòi hỏi việc tạo ra kháng thể này bởi phương pháp cụ thể bất kỳ.

Kháng thể trong đây cụ thể bao gồm kháng thể “khảm” trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong kháng thể có nguồn gốc từ một loài cụ thể hoặc thuộc nhóm hoặc phân nhóm kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi là giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trong kháng thể có nguồn gốc từ loài khác hoặc thuộc nhóm hoặc phân nhóm kháng thể khác, cũng như các mảnh của kháng thể này, miễn là chúng biểu hiện hoạt tính sinh học mong muốn (Patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison và đồng tác giả (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Kháng thể khảm được quan tâm trong đây bao gồm kháng thể “được biến đổi cho phù hợp với động vật linh trưởng” bao gồm các trình tự gắn kết kháng nguyên của vùng chức năng biến đổi có nguồn gốc từ động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ, khỉ mũi dài, khỉ không đuôi, v.v.) và trình tự vùng cố định của người.

“Chuỗi kháng thể nguyên vẹn” như được sử dụng trong đây là một chuỗi bao gồm vùng biến đổi chiều dài đầy đủ và vùng cố định chiều dài đầy đủ (Fc). Kháng thể nguyên vẹn “thông thường” bao gồm chuỗi nhẹ nguyên vẹn và chuỗi nặng nguyên vẹn, cũng như vùng chức năng cố định của chuỗi nhẹ (CL) và vùng chức năng cố định của chuỗi nặng, CH1, vùng bản lề, CH2 và CH3 của IgG được tiết ra. Các isotyp khác, như IgM hoặc IgA có thể có vùng chức năng CH khác. Vùng chức năng cố định có thể là vùng chức năng cố định của trình tự tự nhiên (ví dụ, vùng chức năng cố định của trình tự tự nhiên của người) hoặc trình tự axit amin biến thể của nó. Kháng thể nguyên vẹn có thể có một hoặc nhiều

“chức năng hiệu ứng” để chỉ các hoạt tính sinh học gán cho vùng cố định Fc (vùng Fc của trình tự tự nhiên hoặc vùng Fc biến thể của trình tự axit amin) của một kháng thể. Ví dụ về chức năng hiệu ứng của kháng thể bao gồm gắn kết C1q; độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể; gắn kết thụ thể Fc; độc tính tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC); sự thực bào; và điều hòa giảm thụ thể bề mặt tế bào. Vùng cố định biến thể bao gồm biến thể mà thay đổi profin hiệu ứng, gắn kết với thụ thể Fc, và tương tự.

Phụ thuộc vào trình tự axit amin của Fc (vùng chức năng cố định) của chuỗi nặng của chúng, kháng thể và protein gắn kết kháng nguyên khác nhau có thể được đề xuất là các nhóm khác nhau. Có 5 nhóm chính của vùng Fc chuỗi nặng: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và nhiều nhóm trong số đó có thể còn được chia thành “phân nhóm” (isotyp), ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, và IgA2. Vùng chức năng cố định Fc tương ứng với các nhóm khác nhau của kháng thể có thể lần lượt được gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ . Các cấu trúc dưới đơn vị và cấu hình ba chiều của các nhóm globulin miễn dịch khác nhau đã được biết rõ. Các dạng Ig bao gồm các dạng biến đổi vùng bản lề hoặc các dạng không có vùng bản lề (Roux và đồng tác giả (1998) *J. Immunol.* 161:4083-4090; Lund và đồng tác giả (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310). Chuỗi nhẹ của kháng thể từ loài động vật có xương sống bất kỳ có thể định danh cho một trong hai kiểu, κ và λ , dựa trên trình tự axit amin của vùng chức năng cố định của chúng.

“Vùng Fc chức năng” có “chức năng hiệu ứng” của vùng Fc có trình tự tự nhiên. Chức năng hiệu ứng ví dụ bao gồm gắn kết C1q; CDC; gắn kết Fc-thụ thể; ADCC; ADCP; điều hòa giảm thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B), v.v. Các chức năng hiệu ứng như vậy thường đòi hỏi vùng Fc để tương tác với thụ thể, ví dụ thụ thể Fc γ RI; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB1; Fc γ RIIB2; Fc γ RIIIA; Fc γ RIIIB, và thụ thể FcRn ái lực thấp; và có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm khác nhau như bộc lộ, ví dụ, trong phân định nghĩa trong đây. Fc “chết” là Fc đã được đột biến gen để giữ lại hoạt tính đối với, ví dụ, kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh, nhưng không hoạt hóa thụ thể Fc ái lực cao.

“Vùng Fc có trình tự tự nhiên” bao gồm trình tự axit amin giống với trình tự axit amin của vùng Fc tìm thấy trong tự nhiên. Vùng Fc của người có trình tự tự nhiên bao gồm, ví dụ, vùng Fc IgG1 người có trình tự tự nhiên (không-A và kiểu hình A); vùng Fc IgG2 người có trình tự tự nhiên; vùng Fc IgG3 người có trình tự tự nhiên; và vùng Fc IgG4 người có trình tự tự nhiên, cũng như biến thể có trong tự nhiên của nó.

“Vùng Fc biến thể” bao gồm trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của vùng Fc có trình tự tự nhiên bởi ít nhất một biến đổi axit amin, tốt hơn là một hoặc nhiều axit amin thế. Tốt hơn là, vùng Fc biến thể có ít nhất một axit amin thế so với vùng Fc có trình tự tự nhiên hoặc với vùng Fc của polypeptit gốc, ví dụ, từ khoảng một đến khoảng mười axit amin thế, và tốt hơn là từ khoảng một đến khoảng năm axit amin thế trong vùng Fc có trình tự tự nhiên hoặc trong vùng Fc của polypeptit gốc. Vùng Fc biến thể trong đây tốt hơn là sẽ có độ tương đồng ít nhất khoảng 80% với vùng Fc có trình tự tự nhiên và/hoặc với vùng Fc của polypeptit gốc, và tốt nhất là độ tương đồng ít nhất khoảng 90% với nó, tốt hơn là ít nhất khoảng độ tương đồng 95% với nó.

Trình tự biến thể Fc có thể bao gồm ba axit amin thế trong vùng CH2 để làm giảm sự gắn kết Fc γ RI ở vị trí theo chỉ số EU 234, 235, và 237 (xem Duncan và đồng tác giả, (1988) Nature 332:563). Hai axit amin thế trong vị trí gắn kết bổ thể C1q ở vị trí theo chỉ số EU 330 và 331 giảm sự cố định bổ thể (xem Tao và đồng tác giả, J. Exp. Med. 178:661 (1993) và Canfield và Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991)). Sự thế vào IgG1 người của các gốc IgG2 ở vị trí 233-236 và gốc IgG4 ở vị trí 327, 330 và 331 làm giảm mạnh ADCC và CDC (xem, ví dụ, Armour KL. và đồng tác giả, 1999 Eur J Immunol. 29(8):2613-24; và Shields RL. và đồng tác giả, 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604). Các biến thể Fc khác là có thể, bao gồm nhưng không giới hạn ở biến thể trong đó vùng có khả năng tạo ra liên kết disulfua bị xóa bỏ, hoặc trong đó một số gốc axit amin nhất định bị loại bỏ ở đầu tận cùng N của dạng Fc tự do hoặc gốc methionin được bổ sung vào đó. Do đó, theo một phương án của sáng chế, một hoặc nhiều phần Fc của phân tử scFc có thể bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong vùng bản lề để loại bỏ liên kết disulfua. Theo phương án khác nữa, vùng bản lề của Fc có thể được loại bỏ hoàn toàn. Theo phương án khác nữa, phân tử này có thể bao gồm biến thể Fc.

Hơn nữa, biến thể Fc có thể được tạo cấu trúc để loại bỏ hoặc gần như làm giảm chức năng hiệu ứng bằng cách thế, xóa hoặc thêm các gốc axit amin để tác động đến sự gắn kết bổ thể hoặc gắn kết thụ thể Fc. Ví dụ, và không giới hạn ở, sự xóa gốc có thể ở vị trí gắn kết bổ thể, như vị trí gắn kết C1q. Kỹ thuật để điều chế các dẫn xuất trình tự như vậy của mảnh Fc globulin miễn dịch được bộc lộ trong Công bố Patent quốc tế số WO 97/34631 và WO 96/32478. Ngoài ra, vùng chức năng Fc có thể được sửa đổi bằng cách phosphoryl hóa, sulfat hóa, axyl hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, farnesyl hóa, axetyl hóa, amit hóa, và tương tự.

Fc có thể ở dạng có chuỗi đường tự nhiên, chuỗi đường tăng so với dạng tự nhiên hoặc chuỗi đường giảm so với dạng tự nhiên, hoặc có thể ở dạng không glycosyl hóa hoặc khử glycosyl hóa. Các sửa đổi tăng, giảm, loại bỏ hoặc các sửa đổi khác của chuỗi đường có thể đạt được bằng các phương pháp thông thường trong lĩnh vực này, như phương pháp hóa học, phương pháp enzym hoặc bằng cách biểu hiện nó trong dòng tế bào sản xuất được thao tác di truyền. Các dòng tế bào như vậy bao gồm vi sinh vật, ví dụ *Pichia Pastoris*, và dòng tế bào động vật có vú, ví dụ tế bào CHO, mà biểu hiện tự nhiên các enzym glycosyl hóa. Ngoài ra, các vi sinh vật hoặc tế bào có thể được thao tác di truyền để biểu hiện enzym glycosyl hóa, hoặc có thể được hoàn lại không thể biểu hiện enzym glycosyl hóa (Xem ví dụ, Hamilton, và đồng tác giả, *Science*, 313:1441 (2006); Kanda, và đồng tác giả, *J. Biotechnology*, 130:300 (2007); Kitagawa, và đồng tác giả, *J. Biol. Chem.*, 269 (27): 17872 (1994); Ujita-Lee và đồng tác giả, *J. Biol. Chem.*, 264 (23): 13848 (1989); Imai-Nishiya, và đồng tác giả, *BMC Biotechnology* 7:84 (2007); và WO 07/055916). Một ví dụ của tế bào được thao tác di truyền để có hoạt tính sialyl hóa biến đổi, gen alpha-2,6-sialyltransferaza 1 đã được thao tác di truyền vào trong tế bào buồng trứng chuột túi má Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary) và vào trong tế bào sf9. Kháng thể được biểu hiện bởi các tế bào đã thao tác di truyền này do đó được sialyl hóa bởi sản phẩm gen ngoại sinh. Phương pháp khác để thu được các phân tử Fc có lượng gốc đường sửa đổi so với nhiều phân tử tự nhiên bao gồm việc tách nhiều phân tử nói trên thành các đoạn glycosyl hóa và không glycosyl hóa, ví dụ, sử dụng sắc ký ái lực lectin (xem ví dụ, WO 07/117505). Sự có mặt của các gốc glycosyl hóa cụ thể đã được chỉ ra là thay đổi chức năng của globulin miễn dịch. Ví dụ, việc loại các chuỗi đường khỏi phân tử Fc khiến giảm mạnh ái lực gắn kết với phần C1q của thành phần bổ thể đầu tiên C1 và giảm hoặc mất độc tính tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) hoặc độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC - complement-dependent cytotoxicity), bằng cách đó không gây ra các đáp ứng miễn dịch *in vivo* không cần thiết. Các biến đổi quan trọng khác bao gồm sialyl hóa và fucosyl hóa: sự có mặt của axit sialic trong IgG tỷ lệ với hoạt tính kháng-viêm (xem ví dụ, Kaneko, và đồng tác giả, *Science* 313:760 (2006)), trong khi đó việc loại fucoza khỏi IgG dẫn đến sự tăng hoạt tính ADCC (Xem ví dụ, Shoj-Hosaka, và đồng tác giả, *J. Biochem.*, 140:777 (2006)).

Theo các phương án thay thế, kháng thể theo sáng chế có thể có trình tự Fc có chức năng hiệu ứng tăng, ví dụ bằng cách làm tăng khả năng gắn kết với FcγRIIIA và tăng hoạt tính ADCC. Ví dụ, fucoza gắn với glycan liên kết với N ở vị trí Asn-297 của Fc cản trở

không gian tương tác của Fc với FcγRIIIA, và việc loại fucosa bằng kỹ thuật thao tác trên gốc glyco có thể làm tăng sự gắn kết với FcγRIIIA, chuyển thành >50-lần hoạt tính ADCC so với đối chứng IgG1 kiểu đại. Kỹ thuật thao tác di truyền trên protein, mặc dù các đột biến axit amin trong phần Fc của IgG1, đã tạo ra nhiều biến thể làm tăng ái lực gắn kết Fc với FcγRIIIA. Đáng chú ý, thể đột biến ba-alanin S298A/E333A/K334A thể hiện sự tăng gấp 2 lần gắn kết với FcγRIIIA và chức năng ADCC. Biến thể S239D/I332E (2X) và S239D/I332E/A330L (3X) có sự tăng đáng kể ái lực gắn kết với FcγRIIIA và sự gia tăng khả năng ADCC *in vitro* và *in vivo*. Các biến thể Fc khác được xác định bởi năm men cũng thể hiện sự gắn kết tăng với FcγRIIIA và sự diệt tế bào u tăng trong các mô hình chuột nhắt ghép ngoại lai. Xem, ví dụ Liu và đồng tác giả (2014) JBC 289(6):3571-90, được đưa cụ thể vào đây bằng cách viện dẫn.

Thuật ngữ “kháng thể chứa vùng Fc” để chỉ kháng thể bao gồm vùng Fc. Lysin ở đầu C (gốc 447 theo hệ thống đánh số EU) của vùng Fc có thể được loại bỏ, ví dụ, trong khi tinh chế kháng thể hoặc bằng kỹ thuật tái tổ hợp axit nucleic mã hóa kháng thể. Do đó, kháng thể có vùng Fc theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể có hoặc không có K447.

“Fv” là mảnh kháng thể bé nhất, nó chứa toàn bộ vị trí nhận dạng kháng nguyên và gắn kết kháng nguyên. Kháng thể gắn kết CD3 theo sáng chế bao gồm một dime của một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ vùng chức năng biến đổi trong một mối liên kết chặt, không-cộng hóa trị; tuy nhiên kháng thể khác, ví dụ để sử dụng trong cấu hình đa đặc hiệu, có thể bao gồm VH trong sự không có mặt trình tự VL. Thậm chí vùng chức năng biến đổi đơn (hoặc một nửa của Fv chỉ gồm có ba vùng siêu biến đổi đặc hiệu với kháng nguyên) có khả năng nhận dạng và gắn kết kháng nguyên, mặc dù ái lực có thể thấp hơn của hai vùng chức năng vị trí gắn kết.

Mảnh Fab cũng chứa vùng chức năng cố định của chuỗi nhẹ và vùng chức năng cố định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Mảnh Fab' khác với mảnh Fab ở chỗ bổ sung một số gốc ở đầu tận cùng carboxy của vùng chức năng chuỗi nặng CH1 bao gồm một hoặc nhiều cystein từ vùng bản lề của kháng thể. Fab'-SH trong đây là ký hiệu cho Fab' trong đó (các) gốc cystein của vùng chức năng cố định mang ít nhất một nhóm thiol tự do. Mảnh kháng thể F(ab')₂ ban đầu được tạo ra là cặp của các mảnh Fab' mà có cystein vùng bản lề giữa chúng. Các kỹ thuật ghép hóa học khác của mảnh kháng thể cũng đã được biết.

Dạng “được biến đổi cho phù hợp với người” của kháng thể không phải của người

(ví dụ, loài gặm nhấm), bao gồm kháng thể chuỗi đơn, là kháng thể khảm (bao gồm kháng thể chuỗi đơn) chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải của người. Ví dụ, ví dụ, Jones và đồng tác giả, (1986) *Nature* 321:522-525; Chothia và đồng tác giả (1989) *Nature* 342:877; Riechmann và đồng tác giả (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 487-499; Foote và Winter, (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; Presta và đồng tác giả (1993) *J. Immunol.* 151, 2623-2632; Werther và đồng tác giả (1996) *J. Immunol. Methods* 157:4986-4995; và Presta và đồng tác giả (2001) *Thromb. Haemost.* 85:379-389. Chi tiết kỹ hơn, xem Patent Mỹ số 5,225,539; 6,548,640; 6,982,321; 5,585,089; 5,693,761; 6,407,213; Jones và đồng tác giả (1986) *Nature*, 321:522-525; và Riechmann và đồng tác giả (1988) *Nature* 332:323-329.

Thuật ngữ “kháng thể chuỗi đơn” như được sử dụng trong đây có nghĩa là một chuỗi polypeptit đơn chứa một hoặc nhiều vùng chức năng gắn kết kháng nguyên mà gắn kết epitop của kháng nguyên, trong đó các vùng chức năng như vậy có nguồn gốc từ hoặc có độ tương đồng trình tự với vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể. Các phần của vùng biến đổi này có thể được mã hóa bởi đoạn gen V_H hoặc V_L , đoạn gen D và J_H , hoặc đoạn gen J_L . Vùng biến đổi có thể được mã hóa bởi các đoạn V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L , hoặc V_LJ_L được sắp xếp lại. Các đoạn gen V -, D - và J -có thể có nguồn gốc từ người và động vật khác bao gồm chim, cá, cá mập, động vật có vú, loài gặm nhấm, động vật linh trưởng không phải người, lạc đà, lạc đà không bướu, thỏ và tương tự.

Kháng thể gắn kết CD3 theo sáng chế đặc biệt hữu dụng trong các cấu hình đa đặc hiệu, mà bao gồm không giới hạn ở kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể ba chức, v.v. Nhiều phương pháp và cấu hình protein đã được biết và sử dụng trong kháng thể đơn dòng đặc hiệu kép (BsMAB), kháng thể đặc hiệu ba, v.v.

BsMAB thể hệ thứ nhất chỉ gồm có hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi từ hai kháng thể khác nhau. Hai vùng Fab là kháng hai kháng nguyên. Vùng Fc được tạo thành từ hai chuỗi nặng và tạo ra vị trí gắn kết thứ ba với thụ thể Fc trên tế bào miễn dịch (xem ví dụ Lindhofer và đồng tác giả, *The Journal of Immunology*, quyển 155, trang 219-225, 1995). Kháng thể này có thể là từ cùng loài hoặc khác loài. Ví dụ, dòng tế bào biểu hiện kháng thể chuột cống và chuột nhắt tiết ra Ab chức năng đặc hiệu kép do sự cặp đôi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hạn chế loài. Theo các phương án khác, vùng Fc được thiết kế để chỉ khớp với nhau theo các cách cụ thể.

Các kiểu kháng thể đặc hiệu kép khác bao gồm các Fab liên kết hóa học, chỉ gồm các vùng Fab. Hai mảnh Fab hoặc Fab2 liên kết hóa học tạo ra một kháng thể nhân tạo mà gắn kết với hai kháng nguyên khác nhau, tạo ra nó là một kiểu kháng thể đặc hiệu kép. Mảnh gắn kết kháng nguyên (Fab hoặc Fab2) của hai kháng thể đơn dòng khác nhau được sản xuất và liên kết bởi phương pháp hóa học như phương pháp thioete (xem Glennie, M J và đồng tác giả, *Journal of immunology* 139, trang 2367-75, 1987; Peter Borchmann và đồng tác giả, *Blood*, quyển 100, số 9, trang 3101-3107, 2002).

Các phương pháp khác nhau khác để tạo ra kháng thể nhân tạo đa hóa trị đã được phát triển bằng cách dung hợp tái tổ hợp các vùng chức năng biến đổi của hai kháng thể. Mảnh biến đổi chuỗi đơn (scFv - single-chain variable fragment) là protein dung hợp của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và chuỗi nhẹ (VL) của globulin miễn dịch, được nối với peptit liên kết ngắn gồm 10 đến khoảng 25 axit amin. Trình tự liên kết thường nhiều glyxin để có tính linh động, cũng như serin hoặc threonin để có tính tan, và có thể hoặc nối đầu tận cùng N của VH với đầu tận cùng C của VL, hoặc ngược lại. Mảnh biến đổi chuỗi đơn đặc hiệu kép (di-scFv, bi-scFv) có thể được thao tác di truyền bằng cách tạo liên kết hai scFv có tính đặc hiệu khác nhau. Chuỗi peptit đơn có hai vùng VH và hai vùng VL được tạo ra, tạo ra scFv hóa trị kép.

scFv tiếp đôi đặc hiệu kép cũng được gọi là chất tiếp hợp tế bào T đặc hiệu kép (BiTE). scFv đặc hiệu kép có thể được tạo ra với các peptit liên kết là quá ngắn để hai vùng biến đổi gấp vào nhau (khoảng 5 axit amin), ép scFv phải dime hóa. Kiểu này được gọi là kháng thể kép (Adams và đồng tác giả, *British journal of cancer* 77, trang 1405-12, 1998). Kỹ thuật nền tảng hướng đích lại ái lực kép (DART - Dual-Affinity Re-Targeting) (Macrogenics, Rockville, Md.). Kỹ thuật dung hợp protein này sử dụng hai mảnh biến đổi chuỗi đơn (scFvs) của kháng thể khác nhau trên một chuỗi peptit đơn khoảng 55 kilodalton. SCORPION Therapeutics (Emergent Biosolutions, Inc., Seattle, Wash.) kết hợp hai vùng chức năng gắn kết kháng nguyên trong một protein chuỗi đơn. Một vùng chức năng gắn kết là trên đầu đầu tận cùng C và vùng chức năng gắn kết thứ hai trên đầu tận cùng N của vùng chức năng hiệu ứng, dựa trên vùng Fc globulin miễn dịch.

Protein giống kháng thể đặc hiệu kép và hóa trị bốn cũng bao gồm DVD-Ig mà được thao tác di truyền từ hai kháng thể đơn dòng (Wu, C. và đồng tác giả, *Nature Biotechnology*, 25, trang 1290-1297, 2007). Để xây dựng cấu trúc phân tử DVD-Ig, vùng chức năng V của hai mAb được dung hợp tiếp đôi bởi một trình tự liên kết ngắn (TVAAP)

với vùng chức năng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể thứ nhất (VL) ở đầu tận cùng N, sau đó là VL kháng thể khác và Ck để tạo ra protein chuỗi nhẹ DVD-Ig. Tương tự, vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) của hai mAb được dung hợp tiếp đôi bởi một trình tự liên kết ngắn (ASTKGP) với kháng thể thứ nhất ở đầu tận cùng N, sau đó kháng thể còn lại và vùng chức năng cố định của chuỗi nặng để tạo ra protein chuỗi nặng DVD-Ig (VH1/VL1). Tất cả vùng chức năng cố định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được bảo tồn trong thiết kế DVD-Ig, do chúng là rất quan trọng với sự hình thành phân tử giống IgG đầy đủ được liên kết bởi disulfua. Sự đồng chuyển nạp của tế bào động vật có vú với vector biểu hiện mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng DVD-Ig dẫn đến việc tiết một loại riêng phân tử giống IgG có khối lượng phân tử khoảng 200kDa. Phân tử này hiện nay có bốn vị trí gắn kết, 2 từ mỗi mAb.

Thuật ngữ “phân tử giống kháng thể ba chuỗi đặc hiệu kép ” hoặc “TCA” được sử dụng trong đây để chỉ phân tử giống kháng thể bao gồm, về cơ bản chỉ có, hoặc chỉ có ba tiểu đơn vị polypeptit, hai trong số đó bao gồm, về cơ bản chỉ có, hoặc chỉ có một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên chức năng của các chuỗi kháng thể này, bao gồm vùng gắn kết kháng nguyên và ít nhất một vùng chức năng CH. Cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ này có tính đặc hiệu gắn kết với kháng nguyên thứ nhất. Tiểu đơn vị polypeptit thứ ba bao gồm, về cơ bản chỉ có, hoặc chỉ có kháng thể chỉ có chuỗi nặng bao gồm phần Fc gồm có vùng chức năng CH2 và/hoặc CH3 và/hoặc CH4, trong sự không có mặt của vùng chức năng CH1, và vùng chức năng gắn kết kháng nguyên mà gắn kết epitop của kháng nguyên thứ hai hoặc epitop khác của kháng nguyên thứ nhất, trong đó vùng chức năng gắn kết này có nguồn gốc từ hoặc có độ tương đồng trình tự với vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể. Các phần của vùng biến đổi này có thể được mã hóa bởi đoạn gen V_H và/hoặc V_L , đoạn gen D và J_H , hoặc đoạn gen J_L . Vùng biến đổi có thể được mã hóa bằng các đoạn gen được sắp xếp lại V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L , hoặc V_LJ_L .

Protein TCA sử dụng kháng thể chỉ có chuỗi nặng” hoặc “kháng thể chuỗi nặng” hoặc “polypeptit chuỗi nặng” như được sử dụng trong đây có nghĩa là kháng thể chuỗi đơn bao gồm chuỗi nặng vùng cố định CH2 và/hoặc CH3 và/hoặc CH4 nhưng không chứa vùng chức năng CH1. Theo một phương án, kháng thể chuỗi nặng gồm vùng chức năng gắn kết kháng nguyên, ít nhất một phần của vùng bản lề và vùng chức năng CH2 và CH3. Theo phương án khác, kháng thể chuỗi nặng gồm vùng chức năng gắn kết kháng nguyên, ít nhất

một phần của vùng bản lề và vùng chức năng CH2. Theo phương án khác, kháng thể chuỗi nặng gồm vùng chức năng gắn kết kháng nguyên, ít nhất một phần của vùng bản lề và vùng chức năng CH3. Chuỗi nặng kháng thể trong đó vùng chức năng CH2 và/hoặc CH3 bị cắt cũng được đưa vào. Theo phương án khác, chuỗi nặng gồm vùng chức năng gắn kết kháng nguyên, và ít nhất một vùng chức năng CH (CH1, CH2, CH3, hoặc CH4) mà không có vùng bản lề. Kháng thể chỉ có chuỗi nặng có thể ở dạng dime, trong đó hai chuỗi nặng được liên kết disulfua với phần khác, được gắn cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với nhau. Kháng thể chuỗi nặng có thể thuộc phân nhóm IgG, nhưng kháng thể thuộc các phân nhóm khác, như phân nhóm IgM, IgA, IgD và IgE, cũng có thể có trong đây. Theo một phương án cụ thể, kháng thể chuỗi nặng là thuộc phân typ IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, đặc biệt là phân typ IgG1.

Chuỗi nặng kháng thể chiếm khoảng một phần tư của kháng thể IgG tạo ra bởi loài lạc đà, ví dụ lạc đà và lạc đà không bướu (Hamers-Casterman C., và đồng tác giả *Nature*. 363, 446-448 (1993)). Các kháng thể này được tạo ra bởi hai chuỗi nặng nhưng không có chuỗi nhẹ. Kết quả là, phần gắn kết kháng nguyên biến đổi được gọi là vùng chức năng VHH và nó là vị trí gắn kết kháng nguyên nhỏ nhất, nguyên vẹn, có trong tự nhiên, chỉ dài khoảng 120 axit amin (Desmyter, A., và đồng tác giả *J. Biol. Chem.* 276, 26285-26290 (2001)). Chuỗi nặng kháng thể có tính đặc hiệu cao và ái lực cao có thể được tạo ra kháng lại nhiều kháng nguyên trong quá trình miễn dịch (van der Linden, R. H., và đồng tác giả *Biochim. Biophys. Acta.* 1431, 37-46 (1999)) và phần VHH có thể được tách dòng dễ dàng và biểu hiện trong nấm men (Frenken, L. G. J., và đồng tác giả *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Các mức độ biểu hiện, độ tan, và độ ổn định của chúng là cao hơn đáng kể so với của các mảnh truyền thống F(ab) hoặc Fv (Ghahroudi, M. A. và đồng tác giả *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)). Cá mập cũng đã thể hiện là có vùng chức năng đơn giống VH trong kháng thể của chúng có tên là VNAR. (Nuttall và đồng tác giả *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003); Nuttall và đồng tác giả *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004); Dooley và đồng tác giả, *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003)).

Kháng thể hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên, bao gồm kháng thể chỉ gồm chuỗi nặng và phân tử giống kháng thể ba chuỗi đặc hiệu kép (TCA) trong đây, “mà gắn kết” kháng nguyên được quan tâm, là một kháng thể hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên với ái lực đủ sao cho kháng thể hoặc phân tử gắn kết này hữu dụng trong tác nhân chẩn đoán và/hoặc điều trị chọn đích là kháng nguyên này, và không tương tác chéo đáng kể với các

protein khác. Theo các phương án này, mức độ gắn kết của kháng thể hoặc phân tử gắn kết khác với kháng nguyên không phải là đích sẽ không quá 10% như xác định bởi phân tích sàng lọc tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS - fluorescence activated cell sorting) hoặc kết tủa miễn dịch phóng xạ (RIA - radioimmunoprecipitation).

PROTEIN

Sáng chế đề xuất họ kháng thể gắn mà gắn kết với và hoạt hóa con đường truyền tín hiệu qua CD3, ví dụ hoạt hóa tế bào T CD3⁺. Kháng thể trong họ này bao gồm tập hợp trình tự CDR như xác định trong đây, và được nêu ví dụ là trình tự VH được đề xuất của SEQ ID NO:1-18. Họ kháng thể này mang lại một số lợi ích góp phần vào tính ứng dụng là (các) tác nhân điều trị lâm sàng. Kháng thể trong họ này bao gồm các kháng thể có khoảng ái lực gắn kết, cho phép lựa chọn trình tự cụ thể có ái lực mong muốn. Khả năng dễ để tinh chỉnh ái lực là đặc biệt quan trọng để kiểm soát mức hoạt hóa CD3 trong cá thể đang được điều trị, và bằng cách đó làm giảm độc tính. Ví dụ, nếu chọn đích các kháng nguyên khối u có độ dư thấp (thấp hơn 10.000 phân tử trên mỗi tế bào), dự đoán rằng các chất gắn kết CD3 ái lực cao (<30nM) được ưu tiên. Nếu chọn đích kháng nguyên khối u có độ dư cao (nhiều hơn 50.000 phân tử trên mỗi tế bào), chất gắn kết CD3 với ái lực (>50nM) được ưu tiên. Đánh giá riêng biệt ái lực có thể là khuynh hướng của kháng thể để làm giảm xytokin khi gắn kết với tế bào T, ví dụ giải phóng IL-2, IFN γ , v.v., trong đó có thể mong muốn sự giải phóng xytokin giảm.

Kháng thể thích hợp có thể được chọn từ các kháng thể được nêu trong đây để phát triển và sử dụng, bao gồm nhưng không giới hạn ở sử dụng làm kháng thể đặc hiệu kép. Việc xác định ái lực của protein được xem xét có thể thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ phép đo Biacore, v.v. Các kháng thể trong họ kháng thể có thể có ái lực với CD3 với giá trị K_d nằm trong khoảng từ 10⁻⁶ đến khoảng 10⁻¹¹, bao gồm nhưng không giới hạn ở: từ khoảng 10⁻⁶ đến khoảng 10⁻¹⁰; từ khoảng 10⁻⁶ đến khoảng 10⁻⁹; từ khoảng 10⁻⁶ đến khoảng 10⁻⁸; từ khoảng 10⁻⁸ đến khoảng 10⁻¹¹; từ khoảng 10⁻⁸ đến khoảng 10⁻¹⁰; từ khoảng 10⁻⁸ đến khoảng 10⁻⁹; từ khoảng 10⁻⁹ đến khoảng 10⁻¹¹; từ khoảng 10⁻⁹ đến khoảng 10⁻¹⁰; hoặc giá trị bất kỳ trong các khoảng này. Việc lựa chọn ái lực có thể được xác nhận bởi thử nghiệm sinh học để hoạt hóa tế bào T trong, ví dụ, và mô hình *in vitro* hoặc tiền lâm sàng, và đánh giá độc tính có thể. Việc xác định mức giải phóng xytokin có thể được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp thuận tiện bất

kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở các thử nghiệm mô tả trong ví dụ.

Sự tiếp hợp của thụ thể tế bào T (TCR), hoặc bằng cách gắn kết phức MH-peptit hoặc kháng thể kháng-TCR/CD3, sẽ khởi động sự hoạt hóa tế bào T. Ví dụ về kháng thể kháng-TCR/CD3 mà hoạt hóa tế bào T là OKT3 và UCHT1. Các kháng thể kháng-CD3 cạnh tranh chéo để gắn kết với CD3 trên tế bào T và được sử dụng thường xuyên trong các thử nghiệm hoạt hóa tế bào T. Kháng thể kháng-CD3 theo sáng chế cạnh tranh chéo với OKT3 để gắn kết với CD3 người. Phụ thuộc vào ái lực gắn kết với CD3 và epitop trên CD3, kháng thể kháng-CD3 hoạt hóa tế bào T có các kết quả chức năng khác nhau. Việc ủ *in vitro* tế bào T của người với kháng thể kháng-CD3 ái lực thấp gây ra sự hoạt hóa không hoàn toàn tế bào T, sản sinh ra IL-2 và IL-10 thấp. Ngược lại, chất gắn kết CD3 ái lực cao hoạt hóa tế bào T tạo ra IL-2 nhiều hơn đáng kể và các xytokin khác. Kháng thể kháng-CD3 ái lực thấp được coi là chất chủ vận một phần mà gây ra chọn lọc một số chức năng hiệu ứng, diệt khối u tiềm năng và điều hòa tăng CD69, trong khi không gây ra được các chức năng khác, như sản sinh IL-2 và IL-10. Chất gắn kết ái lực cao theo sáng chế là chất chủ vận hoàn toàn hoạt hóa nhiều chức năng hiệu ứng miễn dịch của tế bào T. Độ mạnh của tương tác với CD3 và epitop được nhận dạng tạo ra sự hoạt hóa tế bào T ở chất lượng khác nhau. Sự sản sinh xytokin tối đa của tế bào T được hoạt hóa bởi kháng thể kháng-CD3 ái lực thấp là thấp hơn mức hoạt hóa tối đa bởi kháng thể kháng-CD3 ái lực cao. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế gây giải phóng thấp hơn một hoặc cả hai IL-2 và IL-10 khi kết hợp với tế bào T trong thử nghiệm hoạt hóa khi so với kháng thể kháng-CD3 đối chứng trong cùng thử nghiệm, trong đó kháng thể đối chứng có thể là ID 304703 (SEQ ID NO:22) hoặc kháng thể có ái lực tương đương. Mức giải phóng tối đa IL-2 và/hoặc IL-10 có thể thấp hơn khoảng 75% mức giải phóng bởi kháng thể đối chứng, thấp hơn khoảng 50% mức giải phóng bởi kháng thể đối chứng, thấp hơn khoảng 25% mức giải phóng bởi kháng thể đối chứng, và có thể thấp hơn khoảng 10% mức giải phóng bởi kháng thể đối chứng.

Theo một số phương án theo sáng chế, kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể đa đặc hiệu được đề xuất, có thể có cấu hình bất kỳ đã bàn luận trong đây, bao gồm nhưng không giới hạn ở ba chuỗi đặc hiệu kép. Kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đặc hiệu với protein không phải là CD3, và có thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Theo một số phương án như vậy, kháng thể thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên liên kết khối u, kháng nguyên đích, ví dụ integrin, v.v.,

kháng nguyên gây bệnh, protein điểm kiểm soát, và tương tự. Nhiều định dạng của kháng thể đặc hiệu kép là nằm trong phạm vi của sáng chế, bao gồm nhưng không giới hạn ở polypeptit chuỗi đơn, polypeptit hai chuỗi, polypeptit ba chuỗi, polypeptit bốn chuỗi, và nhiều hơn của chúng.

Họ kháng thể đặc hiệu CD3 bao gồm vùng chức năng VH, bao gồm trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 trong vùng khung VH của người. Trình tự CDR có thể được đặt, ví dụ, trong vùng quanh các gốc axit amin 26-33; 51-58; và 97-112 lần lượt của CDR1, CDR2 và CDR3, của trình tự vùng biến đổi được nêu ví dụ nêu trong SEQ ID NO:1-18. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng trình tự CDR có thể ở các vị trí khác nhau nếu trình tự vùng khung khác nhau được chọn, mặc dù thường trật tự của trình tự vẫn được giữ nguyên.

Trình tự CDR của kháng thể họ 2 có thể có công thức trình tự sau đây. X chỉ axit amin biến đổi, có thể là axit cụ thể được nêu sau đây.

CDR1

G₁ F₂ T₃ F₄ X₅ X₆ Y₇ A₈

trong đó:

X₅ có thể là axit amin bất kỳ; theo một số phương án X₅ là D, A hoặc H; theo một số phương án X₅ là D.

X₆ có thể là axit amin bất kỳ; theo một số phương án X₆ là D hoặc N; theo một số phương án D₆ là D.

Theo một số phương án, trình tự CDR1 của kháng thể kháng-CD3 họ 2 bao gồm trình tự bất kỳ được nêu trong SEQ ID NO:1-18, các gốc 26-33.

CDR2

I₁' S₂' W₃' N₄' S₅' G₆' S₇' I₈'

Theo một số phương án, trình tự CDR2 của kháng thể kháng-CD3 họ 2 bao gồm trình tự bất kỳ được nêu trong SEQ ID NO:1-18, các gốc 51-58.

CDR3

A₁" K₂" D₃" S₄" R₅" G₆" Y₇" G₈" X₉" Y₁₀" X₁₁" X₁₂" G₁₃" G₁₂" A₁₅" Y₁₆"

trong đó:

X₉” có thể là axit amin bất kỳ, theo một số phương án X₉” là D hoặc S; theo một số phương án X₉” là D;

X₁₁” có thể là axit amin bất kỳ, theo một số phương án X₁₁” là R hoặc S;

X₁₂” có thể là axit amin bất kỳ, theo một số phương án X₁₂” là L hoặc R.

Theo một số phương án, trình tự CD3 của kháng thể kháng-CD3 họ 2 có công thức A K D S R G Y G D Y X₁₁” X₁₂” G G A Y trong đó X₁₁” và X₁₂” như được xác định ở trên. Theo một số phương án, trình tự CDR3 của kháng thể kháng-CD3 họ 2 bao gồm trình tự bất kỳ được nêu trong SEQ ID NO:1-18, các gốc 97-112.

Theo một số phương án, vùng chức năng VH gắn kết CD3 được cặp đôi với vùng chức năng vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Theo một số phương án như vậy, chuỗi nhẹ là chuỗi nhẹ cố định. Theo một số phương án, chuỗi nhẹ bao gồm vùng chức năng VL với trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 trong vùng khung VL của người. Trình tự CDR có thể là trình tự SEQ ID NO:19. Theo một số phương án, trình tự CDR1 bao gồm các gốc axit amin 27-32; 50-52; 89-97 lần lượt của CDR1, CDR2, CDR3.

Theo một số phương án, trình tự CDR của kháng thể họ 2 có trình tự có độ tương đồng ít nhất là 85%, độ tương đồng ít nhất là 90%, độ tương đồng ít nhất là 95%, độ tương đồng ít nhất là 99% so với trình tự CDR hoặc tập hợp trình tự CDR trong trình tự bất kỳ trong SEQ ID NO:1-18. Theo một số phương án, trình tự CDR theo sáng chế bao gồm một, hai, ba axit amin thế hoặc nhiều hơn so với trình tự CDR hoặc tập hợp trình tự CDR trong trình tự bất kỳ trong SEQ ID NO:1-18. Theo một số phương án, (các) axit amin thế là một hoặc nhiều vị trí 5 hoặc 10 của CDR1, vị trí 2, 6 hoặc 7 của CDR2, vị trí 1, 8, 9 hoặc 10 của CDR3, so với công thức được nêu trên.

Trong đó, protein theo sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép, một gốc gắn kết, tức là kết hợp VH/VL hoặc chỉ VH, là đặc hiệu với CD3 người trong khi nhánh còn lại có thể đặc hiệu với tế bào đích, bao gồm tế bào ung thư, như tế bào ung thư buồng trứng, vú, dạ dày - ruột non, não, đầu và cổ, tuyến tiền liệt, ruột kết, và phổi, và tương tự, cũng như các khối u máu như u tế bào B, bao gồm bệnh bạch cầu, u lympho, ung thư mô kết, ung thư biểu mô, u tế bào thần kinh, ung thư biểu mô tế bào vảy, u tế bào mầm, bệnh di căn, u không biệt hóa, u tinh seminom, u melanin, u tủy, u nguyên bào thần kinh, u tế bào hỗn

hợp, bệnh tạo u gây ra do các tác nhân gây viêm, và các bệnh ác tính khác, tế bào bị nhiễm mầm bệnh, tế bào tự phản ứng gây viêm và/hoặc tự miễn. Gốc không phải CD3 cũng có thể đặc hiệu với protein điều hòa miễn dịch, như sẽ mô tả trong đây.

Kháng nguyên liên kết khối u (TAA) là tương đối hạn chế với tế bào u, trong đó kháng nguyên đặc hiệu khối u (TSA - tumor-specific antigen) là duy nhất với tế bào u. TSA và TAA đặc trưng là các phần của phân tử nội bào được biểu hiện trên bề mặt tế bào là một phần của phức tương hợp mô chính.

Kháng nguyên biệt hóa đặc hiệu mô là các phân tử có trên tế bào u và phần đối liên kết tế bào bình thường của chúng. Kháng nguyên liên kết khối u được biết là nhận dạng bởi mAb chữa bệnh nằm trong nhiều phân nhóm khác nhau. Kháng nguyên biệt hóa tạo máu là các glycoprotein thường kết hợp với sự gom nhóm cụm biệt hóa (CD - cluster of differentiation) và bao gồm CD20, CD30, CD33 và CD52. Kháng nguyên biệt hóa trên bề mặt tế bào là nhóm đa dạng của các glycoprotein và carbohydrat được tìm thấy trên bề mặt của cả tế bào bình thường và tế bào u. Kháng nguyên có tham gia vào sự phát triển và con đường truyền tín hiệu biệt hóa thường là các yếu tố phát triển và thụ thể yếu tố phát triển. Yếu tố phát triển là các đích của kháng thể ở các bệnh nhân ung thư bao gồm CEA, thụ thể yếu tố phát triển biểu bì (EGFR; cũng gọi là ERBB1), ERBB2 (cũng gọi là HER2), ERBB3, MET (cũng gọi là HGFR), thụ thể yếu tố phát triển giống insulin 1 (IGF1R), thụ thể ephrin A3 (EPHA3), thụ thể phổi tử gây chết tế bào theo chương trình liên quan đến yếu tố hoại tử mô (TNF- tumor necrosis factor) 1 (TRAILR1; cũng gọi là TNFRSF10A), TRAILR2 (cũng gọi là TNFRSF10B) và chất hoạt hóa thụ thể của phổi tử yếu tố nhân-κB (RANKL; cũng gọi là TNFSF11). Kháng nguyên có tham gia trong sự tạo mạch thường là protein hoặc yếu tố phát triển mà trợ giúp sự hình thành hệ vi mạch mới, bao gồm yếu tố phát triển nội mô mạch (VEGF), thụ thể VEGF (VEGFR), integrin αVβ3 và integrin α5β1. Chất đệm khối u và chất nền ngoại bào là các cấu trúc hỗ trợ không phân tán được của khối u. Kháng nguyên chất đệm và chất nền ngoại bào là các đích điều trị bao gồm protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP) và tenascin.

Ví dụ về kháng thể chữa bệnh hữu dụng trong cấu hình đặc hiệu kép bao gồm, không giới hạn ở, rituximab; Ibritumomab; tiuxetan; tositumomab; Brentuximab; vedotin; Gemtuzumab; ozogamicin; Alemtuzumab; IGN101; adecatumumab; Labetuzumab; huA33; Pemtumomab; oregovomab; CC49 (minretumomab); cG250; J591; MOv18;

MORAb-003 (farletuzumab); 3F8, ch14.18; KW-2871; hu3S193; IgN311; Bevacizumab; IM-2C6; CDP791; Etaracizumab; Volociximab; Cetuximab, panitumumab, nimotuzumab; 806; Trastuzumab; pertuzumab; MM-121; AMG 102, METMAB; SCH 900105; AVE1642, IMC-A12, MK-0646, R1507; CP 751871; KB004; IIIA4; Mapatumumab (HGS-ETR1); HGS-ETR2; CS-1008; Denosumab; Sibrotuzumab; F19; và 81C6.

Thụ thể điểm kiểm soát miễn dịch đã được nghiên cứu tích cực nhất trong phạm vi liệu pháp miễn dịch ung thư lâm sàng, kháng nguyên liên kết lympho bào-T gây độc tế bào số 4 (CTLA4 - cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; cũng gọi là CD152) và protein diệt tế bào theo chương trình 1 (PD1; cũng gọi là CD279) – cả hai là thụ thể kiểu ức chế. Hoạt tính lâm sàng của kháng thể ức chế các thụ thể này có nghĩa là tính miễn dịch chống ung thư có thể tăng lên ở nhiều mức và chiến thuật kết hợp này có thể được lập nên một cách thông minh, được hướng dẫn bởi cân nhắc về cơ chế và mô hình tiền lâm sàng.

Hai phối tử của PD1 là phối tử PD1 1 (PDL1; cũng gọi là B7-H1 và CD274) và PDL2 (cũng gọi là B7-DC và CD273). PDL1 được biểu hiện trên tế bào ung thư và qua sự gắn kết với thụ thể PD1 của nó trên tế bào T mà nó ức chế sự hoạt hóa/chức năng tế bào T.

Gen hoạt hóa lympho bào 3 (LAG3; cũng gọi là CD223), 2B4 (cũng gọi là CD244), yếu tố làm yếu lympho bào B và T (BTLA; cũng gọi là CD272), protein màng 3 của tế bào T (TIM3; cũng gọi là HAVcr2), thụ thể adenosin A2a (A2aR) và họ thụ thể ức chế tế bào diệt, mỗi yếu tố có liên quan đến sự ức chế hoạt tính lympho bào và trong một số trường hợp gây suy giảm lympho bào. Kháng thể chọn đích là các thụ thể này có thể được sử dụng trong phương pháp của sáng chế.

Tác nhân chủ vận phân tử đồng kích thích miễn dịch cũng hữu dụng trong phương pháp của sáng chế. Các tác nhân như vậy bao gồm chất chủ vận hoặc CD40 và OX40. CD40 là protein đồng kích thích tìm thấy được trên tế bào trình diện kháng nguyên (APC - antigen presenting cell) và đòi hỏi phải có để hoạt hóa các tế bào này. Các APC bao gồm thực bào (đại thực bào và tế bào đuôi gai) và tế bào B. CD40 là một phần của họ thụ thể TNF. Các phân tử truyền tín hiệu hoạt hóa sơ cấp của CD40 là IFN γ và phối tử CD40 (CD40L). Sự kích thích qua CD40 hoạt hóa đại thực bào.

Kháng thể kháng CCR4 (CD194) được quan tâm bao gồm kháng thể đơn dòng được biến đổi cho phù hợp với người kháng thụ thể C-C chemokin 4 (CCR4) với hoạt tính kháng

viêm và chống tăng sinh tiềm năng. CCR2 được biểu hiện trên đại thực bào gây viêm có thể được tìm thấy trong các điều kiện viêm khác nhau, ví dụ viêm khớp dạng thấp; và đã được xác định là được biểu hiện trên đại thực bào kích thích khối u. CCR2 cũng được biểu hiện trên các tế bào T điều hòa, và phối tử CCR2, CCL2, làm trung gian cho sự kết tập tế bào T điều hòa vào trong khối u. Tế bào T điều hòa ức chế đáp ứng của tế bào T chống khối u và do đó mong muốn ức chế hoặc tiêu chúng.

Sản xuất protein theo sáng chế

Mặc dù kháng thể có thể được điều chế bằng phương pháp tổng hợp hóa học, đặc trưng chúng được tạo ra bằng phương pháp dùng kỹ thuật tái tổ hợp ADN, như biểu hiện đồng thời tất cả các chuỗi tạo nên protein trong tế bào chủ tái tổ hợp đơn, hoặc biểu hiện đồng thời chuỗi nặng polypeptit và kháng thể, ví dụ kháng thể người. Ngoài ra, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể cũng có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng một vector biểu hiện đơn polycistron. Việc tinh chế polypeptit cụ thể đạt được bằng cách sử dụng kỹ thuật tinh chế protein chuẩn như sắc ký ái lực (protein A), sắc ký loại trừ kích thước và/hoặc sắc ký tương tác kỵ nước. Đặc hiệu kép là đủ khác biệt về kích thước và độ kỵ nước để có thể thực hiện tinh chế bằng các quy trình chuẩn.

Lượng kháng thể và polypeptit chuỗi nặng sinh ra trong tế bào chủ đơn có thể được tối thiểu hóa bằng cách thao tác di truyền vùng cố định của kháng thể và chuỗi nặng sao cho việc homodime hóa được ưu tiên so với heterodime hóa, ví dụ bằng cách đưa vào các tương tác tự bổ sung (xem ví dụ WO 98/50431 về các khả năng, như chiến thuật “cấu hình lồi-khớp vào-lõm” (xem WO 96/27011)). Do đó một khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất phương pháp để tạo ra đặc hiệu kép trong thể chủ tái tổ hợp, phương pháp này bao gồm bước: biểu hiện trong tế bào chủ tái tổ hợp trình tự axit nucleic mã hóa ít nhất hai chuỗi nặng của polypeptit, trong đó chuỗi nặng của polypeptit khác nhau trong vùng cố định của chúng đủ để làm giảm hoặc ngăn cản sự hình thành homodime nhưng làm tăng sự hình thành đặc hiệu kép.

Khi protein bao gồm ba chuỗi, ví dụ FlicAb, chúng có thể được tạo ra bằng cách biểu hiện đồng thời ba chuỗi (2 chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ) tạo nên phân tử này trong tế bào chủ tái tổ hợp đơn.

Để sản xuất tái tổ hợp protein trong đây, một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa tất cả các chuỗi, ví dụ 2, 3 4, v.v. được phân tách và xen vào trong vector sao chép để tách dòng

tiếp (khuếch đại ADN) hoặc để biểu hiện. Nhiều vector là có sẵn. Các thành phần vector thường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều thành phần sau: trình tự tín hiệu, gốc sao chép, một hoặc nhiều gen đánh dấu, yếu tố tăng cường, gen khởi đầu, và trình tự dừng phiên mã.

Theo một phương án ưu tiên, tế bào chủ theo phương pháp của sáng chế có khả năng biểu hiện mức độ cao các globulin miễn dịch của người, tức là ít nhất 1 pg/tế bào/ngày, tốt hơn là ít nhất 10 pg/tế bào/ngày và thậm chí tốt hơn là ít nhất 20 pg/tế bào/ngày hoặc hơn mà không cần khuếch đại phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi đơn trong tế bào chủ này.

Dược phẩm

Một khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất dược phẩm chứa một hoặc nhiều protein theo sáng chế trong hỗn hợp với chất mang dược dụng thích hợp. Chất mang dược dụng như được sử dụng trong đây được nêu ví dụ, nhưng không giới hạn ở, chất hỗ trợ, chất mang rắn, nước, chất đệm, hoặc chất mang khác được sử dụng trong lĩnh vực này để giữa các thành phần dược, hoặc hỗn hợp của chúng.

Dược phẩm chứa protein sử dụng phù hợp với sáng chế được điều chế để bảo quản bằng cách trộn các protein có độ tinh khiết mong muốn tùy chọn với chất mang dược dụng, tá dược hoặc chất ổn định (xem, ví dụ Remington's Pharmaceutical Sciences xuất bản lần thứ 16, Osol, A. Ed. (1980)), như ở dạng chế phẩm làm đông khô hoặc dung dịch nước. Chất mang, tá dược, hoặc chất ổn định chấp nhận được là không độc với người dùng ở liều và nồng độ sử dụng, và bao gồm chất đệm như phosphat, xitrat, và axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và metionin; chất bảo quản (như octadecyldimethylbenzyl amoni clorua; hexamethonium clorua; benzalkonium clorua, benzethonium clorua; phenol, butyl hoặc rượu benzyl; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit trọng lượng phân tử thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosaccharit, disaccarit, và carbohydrat khác bao gồm glucoza, manosa, hoặc dextrin; tác nhân chelat hóa như EDTA; đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; đổi ion tạo muối như natri; phức kim loại (ví dụ, phức Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như TWEEN™, PLURONICS™ hoặc polyetylen glycol (PEG).

Chế phẩm kháng thể kháng-CD3 được bộc lộ, ví dụ, trong Công bố Patent Mỹ số 20070065437, toàn bộ tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các chế phẩm tương tự có thể được sử dụng cho protein của sáng chế. Các thành phần chính của chế phẩm này là chất đệm pH có tác dụng trong khoảng pH từ 3,0 đến 6,2, muối, chất hoạt động bề mặt, và lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép có tính đặc hiệu kháng-CD3.

Phương pháp sử dụng

Phương pháp được đề xuất để điều trị hoặc làm thuyên giảm bệnh, bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh viêm, bệnh tự miễn, bệnh ung thư tiên phát hoặc di căn, v.v. trong một liệu pháp bao gồm cho tiếp xúc tế bào đích với chế phẩm gắn kết kháng nguyên theo sáng chế, cụ thể trong đó chế phẩm gắn kết kháng nguyên là kháng thể đa đặc hiệu thích hợp với tình trạng bệnh được điều trị, ví dụ trong đó một gốc gắn kết gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên liên kết khối u để điều trị tế bào ung thư liên quan; gốc gắn kết đặc hiệu với yếu tố gây bệnh được quan tâm để điều trị bệnh nhiễm trùng liên quan, và tương tự. Các phương pháp này bao gồm sử dụng cho đối tượng cần được điều trị điều trị lượng có hiệu quả điều trị hoặc liều có hiệu quả của chất theo sáng chế, bao gồm nhưng không giới hạn ở hỗn hợp của chất phản ứng với dược chất hóa trị liệu, liệu pháp phóng xạ, hoặc phẫu thuật.

Liều có hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế để điều trị bệnh thay đổi phụ thuộc nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm đường dùng, vị trí đích, điều kiện sinh lý của bệnh nhân, bệnh nhân là người hay động vật, các thuốc khác đã sử dụng, và việc điều trị là phòng bệnh hay chữa bệnh. Thông thường, bệnh nhân là người, nhưng động vật có vú không phải là người cũng có thể được điều trị, ví dụ động vật thú nuôi như chó, mèo, ngựa, v.v., động vật có vú trong phòng thí nghiệm như thỏ, chuột nhắt, chuột cống, v.v., và tương tự. Liều điều trị có thể được chuẩn hóa để tối ưu độ an toàn và hiệu quả.

Các mức liều có thể được xác định dễ dàng bởi bác sĩ có chuyên môn, và có thể điều chỉnh theo yêu cầu, ví dụ, yêu cầu điều chỉnh đáp ứng của đối tượng với liệu pháp. Lượng thành phần hoạt động có thể được kết hợp với nguyên liệu chất mang để tạo ra dạng liều đơn sẽ thay đổi phụ thuộc vào cơ thể chủ được điều trị và đường dùng cụ thể. Dạng liều đơn vị thường chứa thành phần hoạt động với lượng nằm trong khoảng từ 1mg đến khoảng 500mg.

Theo một số phương án, liều điều trị của tác nhân này có thể với lượng nằm trong

khoảng từ 0,0001 đến 100mg/kg, và thông thường hơn nằm trong khoảng từ 0,01 đến 5mg/kg, của trọng lượng cơ thể chủ. Ví dụ, liều có thể là 1 mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 10mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc nằm trong khoảng từ 1-10mg/kg. Một liệu trình điều trị ví dụ đòi hỏi việc sử dụng một lần mỗi hai tuần tuần hoặc một lần một tháng hoặc một lần mỗi 3 đến 6 tháng. Chất điều trị theo sáng chế thường được sử dụng nhiều lần. Khoảng giãn liều giữa các liều đơn có thể là hàng tuần, hàng tháng hoặc hàng năm. Khoảng giãn liều cũng có thể là không thường xuyên theo chỉ định bằng cách đo mức trong máu của chất điều trị ở bệnh nhân. Cách khác, vật điều trị theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng chế phẩm giải phóng duy trì, trong trường hợp đòi hỏi dùng ít thường xuyên hơn. Liều và tần suất sử dụng thay đổi phụ thuộc vào thời gian bán thải của polypeptit ở bệnh nhân.

Trong ứng dụng phòng bệnh, có thể sử dụng liều tương đối thấp với khoảng giãn liều tương đối không thường xuyên trong một khoảng thời gian dài. Một số bệnh nhân tiếp tục nhận việc điều trị cho đến cuối đời. Trong ứng dụng điều trị bệnh khác, đôi khi đòi hỏi liều tương đối cao với khoảng giãn liều tương đối ngắn cho đến khi sự phát triển của bệnh giảm hoặc ngừng, và tốt hơn là cho đến bệnh nhân thể hiện sự cải thiện một phần hoặc hoàn toàn triệu chứng bệnh. Sau đó, bệnh nhân có thể được sử dụng phác đồ phòng bệnh.

Theo các phương án khác nữa, phương pháp theo sáng chế bao gồm điều trị, làm giảm hoặc ngăn chặn sự phát triển khối u, sự di căn khối u hoặc sự xâm lấn khối u ung thư bao gồm ung thư biểu mô, ung thư máu như bệnh bạch cầu và u lympho, u melanin, ung thư mô kết, u thần kinh đệm, v.v. Với ứng dụng phòng bệnh, được phẩm hoặc thuốc được sử dụng cho bệnh nhân nhạy cảm với, hoặc nói cách khác có nguy cơ mắc bệnh với lượng đủ để loại bỏ hoặc làm giảm nguy cơ, làm nhẹ mức độ nặng của bệnh, hoặc làm chậm sự phát bệnh, bao gồm các triệu chứng sinh hóa, mô học và/hoặc phản ứng của bệnh, biến chứng của nó và kiểu hình gây bệnh trung gian thể hiện trong quá trình phát triển của bệnh.

Chế phẩm để điều trị bệnh có thể được sử dụng bởi đường dùng ngoài đường tiêu hóa, tại chỗ, trong tĩnh mạch, trong khối u, đường miệng, dưới da, trong động mạch, trong sọ, trong màng bụng, trong mũi hoặc trong cơ. Đường dùng đặc trưng là trong tĩnh mạch hoặc trong khối u, mặc dù các đường khác có thể có hiệu quả tương đương.

Đặc trưng, chế phẩm được điều chế là thuốc tiêm được, hoặc là dung dịch hoặc huyền phù lỏng; dạng rắn thích hợp với dung dịch trong, hoặc huyền phù trong, tá dược lỏng trước khi tiêm cũng có thể được điều chế. Chế phẩm cũng có thể được nhũ hóa hoặc

bao nang trong liposom hoặc vi hạt như polylactit, polyglycolide, hoặc copolyme để tăng tác dụng hỗ trợ, như bàn luận ở trên. Langer, Science 249: 1527, 1990 và Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Các tác nhân theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng thuốc cấy giải phóng chậm dưới da hoặc thuốc cấy có thể được tạo công thức theo cách mà cho phép giải phóng thành phần hoạt động duy trì hoặc theo xung. Dược phẩm thường được tạo công thức là vô khuẩn, gần như đẳng trương và tuân thủ đầy đủ tất cả các quy định của thực hành sản xuất thuốc tốt (GMP - Good Manufacturing Practice) của Hiệp hội thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ.

Độc tính của protein mô tả trong đây có thể được xác định bởi các quy trình được chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc động vật thí nghiệm, ví dụ, bằng cách xác định giá trị LD₅₀ (liều gây chết 50% quần thể) hoặc giá trị LD₁₀₀ (liều gây chết 100% quần thể). Tỷ lệ liều giữa hiệu quả gây độc và hiệu quả điều trị là chỉ số điều trị. Số liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và nghiên cứu trên động vật có thể được sử dụng trong việc xây dựng khoảng liều mà không độc để sử dụng cho người. Liều của protein mô tả trong đây tốt hơn là nằm trong khoảng từ nồng độ tuần hoàn bao gồm liều có hiệu quả mà ít hoặc không gây độc. Liều có thể thay đổi nằm trong khoảng từ này phụ thuộc vào dạng liều sử dụng và đường dùng. Chế phẩm chính xác, đường dùng và liều có thể được chọn bởi bác sĩ cụ thể khi xem xét tình trạng của bệnh nhân.

Dược phẩm có thể được sử dụng trong nhiều dạng liều đơn vị phụ thuộc vào phương pháp sử dụng. Ví dụ, dạng liều đơn vị thích hợp cho đường miệng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuốc bột, thuốc viên, viên tròn, viên nang và viên hình thoi. Công nhận rằng chế phẩm theo sáng chế khi sử dụng qua đường miệng, nên được bảo vệ khỏi đường tiêu hóa. Đặc trưng điều này được thực hiện bằng cách tạo phức các phân tử với chế phẩm để làm chúng chống lại sự thủy phân do axit và enzym, hoặc bằng cách nhồi các phân tử trong chất mang thích hợp, như liposom hoặc hàng rào bảo vệ. Các cách thức bảo vệ tác nhân khỏi đường tiêu hóa đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Các chế phẩm để sử dụng thường sẽ bao gồm kháng thể hoặc các chất có thể tiêu đích khác được hòa tan trong chất mang dược dụng, tốt hơn là dung dịch chất mang. Nhiều dung dịch chất mang có thể được sử dụng, ví dụ, nước muối đệm và tương tự. Các dung dịch này là vô khuẩn và thường không có các chất không mong muốn. Các chế phẩm này có thể được tiệt khuẩn bằng kỹ thuật thông thường, đã biết rõ. Chế phẩm có thể chứa chất hỗ trợ dược dụng khi yêu cầu để gần giống với điều kiện sinh lý như chất điều chỉnh độ pH

và chất đệm, chất điều chỉnh độc tính và tương tự, ví dụ, natri axetat, natri clorua, kali clorua, canxi clorua, natri lactat và tương tự. Nồng độ của tác nhân hoạt động trong các chế phẩm này có thể thay đổi nhiều, và sẽ được chọn trước hết dựa trên thể tích lỏng, độ nhớt, trọng lượng cơ thể và yếu tố tương tự phù hợp với đường dùng cụ thể được chọn và nhu cầu của bệnh nhân (ví dụ, Remington's Pharmaceutical Science (xuất bản lần thứ 15, 1980) và Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman và đồng tác giả, eds., 1996)).

Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là kit chứa tác nhân hoạt động và chế phẩm của nó, theo sáng chế và hướng dẫn sử dụng. Kit còn có thể chứa ít nhất một chất phản ứng khác, ví dụ được chất hóa trị liệu, v.v. Kit đặc trưng chứa nhãn thuốc chỉ ra việc sử dụng dự tính của các thành phần trong kit. Thuật ngữ nhãn thuốc bao gồm chữ viết, hoặc nguyên liệu ghi chép cung cấp trên hoặc cùng với kit, hoặc cách khác đi kèm với kit.

Chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị chữa bệnh. Chế phẩm được sử dụng cho bệnh nhân với lượng đủ để về cơ bản tiêu tế bào đích, như mô tả ở trên. Lượng đủ để thực hiện việc này được xác định là "liều có hiệu quả điều trị", liều này có thể mang lại sự tăng tỷ lệ sống tổng cộng. Việc sử dụng riêng lẻ hoặc nhiều chế phẩm có thể được sử dụng phụ thuộc vào liều và tần suất yêu cầu và dung nạp bởi bệnh nhân. Liều cụ thể yêu cầu cho việc điều trị sẽ phụ thuộc vào tình trạng bệnh và tiền sử của động vật có vú, cũng như các yếu tố khác như tuổi, trọng lượng, giới tính, đường dùng, hiệu lực, v.v.

Sáng chế được mô tả đầy đủ, sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng các thay đổi và điều chỉnh khác nhau có thể được thực hiện mà không vượt quá phạm vi hoặc tinh thần của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 Chuột cống được thao tác di truyền biểu hiện kháng thể chỉ có chuỗi nặng

Locut IgH người được xây dựng và tổ hợp trong nhiều phần, chúng tham gia vào việc điều chỉnh và nối các gen vùng C của chuột cống, sau đó chúng được nối kiểu xuôi dòng với vùng V_{H6}-D-J_H của người. Hai BAC với các cụm riêng biệt của gen V_H của người sau đó được bơm đồng thời với BAC mã hóa mảnh (V_{H6}-D-J_H của người - C chuột nhất) đã ghép.

Chuột cống biến đổi gen mang locut globulin miễn dịch của chuỗi nặng nhân tạo

trong cấu hình chưa được sắp xếp lại được tạo ra. Các gen bao gồm vùng cố định mã hóa IgM, IgD, IgG2b, IgE, IgA và gen tăng cường 3'. RT-PCR và phân tích huyết thanh (ELISA) chuột cống biến đổi gen thể hiện sự sắp xếp lại có tính lặp lại của locut globulin miễn dịch biến đổi gen và sự biểu hiện kháng thể chỉ gồm chuỗi nặng của nhiều isotyp khác nhau trong huyết thanh. Chuột cống biến đổi gen được cho bú chéo với chuột cống có locut chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ngoại sinh đột biến được mô tả trong đơn Patent Mỹ số 2009/0098134 A1. Phân tích các động vật này chứng minh sự bất hoạt việc biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch của chuột cống và mức biểu hiện cao của kháng thể chuỗi nặng có vùng biến đổi được mã hóa bởi gen V, D, và J của người. Việc gây miễn dịch chuột cống biến đổi gen khiến tạo ra đáp ứng huyết thanh độ chuẩn cao của kháng thể chuỗi nặng đặc hiệu với kháng nguyên. Các con chuột cống biến đổi gen bao gồm chuỗi nặng kháng thể có vùng VDJ của người được gọi là UniRat.

Ví dụ 2 Chuột cống được thao tác di truyền biểu hiện kháng thể chuỗi nhẹ cố định

Quỹ gen kháng thể biến đổi gen của người được tạo thành từ chuỗi H có sự sắp xếp lại đa dạng $(V_H-D-J_H)_n$ kết hợp với chuỗi L duy nhất. Đối với chuỗi L được sắp xếp lại này, Vk-Jk1-Ck của người, được hợp nhất vào trong dòng mầm chuột cống bằng cách vi tiêm ADN và động vật biến đổi gen thu được được cho bú chủng chuột cống được mô tả trên mà chủng này biểu hiện tự nhiên chuỗi H của người (Osborn và đồng tác giả, 2013). Chủng chuột cống mới có tên là OmniFlic.

Gây miễn dịch chuột cống OmniFlic, sử dụng nhiều kháng thể khác nhau, tạo ra các mức cao của IgG đặc hiệu kháng nguyên tương tự như chuột cống biến đổi gen khác có mang cùng locut IgH. Phân tích quỹ gen bằng RT-PCR xác định thấy sự sắp xếp lại gen V_H biến đổi cao ở mức sao chép và protein cao. Ngoài ra, cũng xác định được chỉ một sản phẩm chuỗi L, cũng được biểu hiện ở mức độ cao.

Trình tự gắn kết đặc hiệu kháng nguyên từ OmniFlic thu được bằng NGS và chọn từ thư viện ADN bổ sung (cADN) (nấm men, *E.coli*, thực khuẩn thể), khi sắp xếp trình tự các bản sao chuỗi H khác nhau xác định được. Để biểu hiện trong tế bào động vật có vú, các cấu trúc chuỗi H siêu đột biến được chuyển nạp cùng với trình tự Igk biến đổi gen gốc. Trong Vk-Jk1-Ck đã sắp xếp lại này, không cho phép có thay đổi đột biến và luôn luôn cùng một chuỗi L được biểu hiện với các sản phẩm chuỗi H khác nhau để tạo ra IgG của người đơn dòng.

Ví dụ 3 Tạo ra kháng thể đặc hiệu kháng nguyên ở chuột cống biến đổi gen,

Để tạo ra kháng thể chuỗi nặng đặc hiệu kháng nguyên ở chuột cống, chuột cống được thao tác di truyền đang biểu hiện được gây miễn dịch trong hai ngày.

Gây miễn dịch với vùng chức năng ngoại bào tái tổ hợp của PD-L1 và BCMA. Vùng chức năng ngoại bào tái tổ hợp của PD-L1 và BCMA được mua từ R&D Systems và được pha loãng với nước muối vô khuẩn và kết hợp với tá dược. Chất kháng nguyên hoặc được kết hợp với tá dược Freund hoàn toàn (CFA) và tá dược Freund không hoàn toàn (IFA) hoặc chất hỗ trợ Titermax và Ribi. Lần gây miễn dịch thứ nhất (mồi) với chất kháng nguyên trong CFA hoặc Titermax được sử dụng ở chân trái và phải. Sau lần gây miễn dịch thứ nhất với chất kháng nguyên trong CFA, hai lần gây miễn dịch nữa trong IFA (tăng cường) hoặc 4 lần gây miễn dịch nữa trong Ribi và một lần nữa trong Titermax được sử dụng ở mỗi chân. Trình tự gây miễn dịch này gây phát triển tế bào B sinh ái lực kháng thể cao. Nồng độ chất kháng nguyên là 10 microgam trên mỗi chân. Huyết thanh được lấy từ chuột cống ở máu cuối cùng để xác định độ chuẩn huyết thanh.

Để tạo ra kháng thể kháng-CD3 $\delta\epsilon$ của người, chuột cống được thao tác di truyền được gây miễn dịch bằng quy trình gây miễn dịch dựa trên ADN.

Chuột cống OmniFlic được gây miễn dịch bởi cấu trúc CD3-epsilon/delta của người và khi đuôi dài ở Aldevron, Inc. (Fargo, ND) sử dụng kỹ thuật kháng thể GENOVAC. Hạch bạch huyết kiệt máu được thu hoạch sau lần gây miễn dịch tăng cường cuối cùng và ARN được phân tách. Sau khi tổng hợp ADN bổ sung, quỹ gen kháng thể chuỗi nặng IgH được xác định đặc điểm bằng kỹ thuật sắp xếp trình tự thế hệ tiếp theo (Next Generation Sequencing) và phần mềm tiêu chuẩn cơ sở độc quyền của chúng tôi. Lựa chọn trình tự VH đặc hiệu kháng nguyên được xem xét thể hiện dấu hiệu lựa chọn đặc hiệu kháng nguyên dương tính. Vài trăm trình tự VH mã hóa FlicAb được lựa chọn để tổ hợp gen và tách dòng vào vector biểu hiện. Sau đó, kháng thể IgG1 FlicAb người hoàn toàn được biểu hiện trong tế bào HEK để phân tích bởi Flow và ELISA. FlicAb của người được kiểm tra về sự gắn kết với tế bào T sơ cấp của người và tế bào Jurkat theo dòng. Ngoài ra, FlicAb của người được thử nghiệm bằng cách sử dụng protein CD3 $\delta\epsilon$ tái tổ hợp trong ELISA. Tất cả FlicAb có sự gắn kết dương với tế bào T của người được nêu trong Fig.1 và Fig.2. Các trình tự được chọn được xác định đặc điểm tiếp trong thử nghiệm hoạt hóa tế bào T.

Ví dụ 4 Xác định đặc điểm kháng thể

Bảng số liệu của Fig.3 tổng kết tính chất của kháng thể kháng-CD3 họ 2 ở định dạng đặc hiệu đơn và đặc hiệu kép. Cột 1 thể hiện ID trình tự của trình tự VH kháng-CD3. Cột 2 thể hiện giá trị MFI của mức gắn kết tế bào Jurkat của kháng thể kháng-CD3 đặc hiệu đơn gốc. Cột 3 thể hiện giá trị MFI của mức gắn kết tế bào T cyno (khí đuôi dài) của kháng-CD3 đặc hiệu đơn gốc. Cột 4 thể hiện tên của kháng thể đặc hiệu kép α CD3: α BCMA. Cột 5 thể hiện mức picogram của IL-2 được giải phóng bởi tế bào T pan được kích thích bởi kháng thể đặc hiệu kép gắn kết protein BCMA được bao lên nhựa ở liều được chỉ ra. Cột 6 thể hiện mức picogram của IL-6 được giải phóng bởi tế bào T pan được kích thích bởi kháng thể đặc hiệu kép gắn kết protein BCMA được bao lên nhựa ở liều được chỉ ra. Cột 7 thể hiện mức picogram của IL-10 được giải phóng bởi tế bào T pan được kích thích bởi kháng thể đặc hiệu kép gắn kết protein BCMA được bao lên nhựa ở liều được chỉ ra. Cột 8 thể hiện mức picogram của IFN- γ được giải phóng bởi tế bào T pan được kích thích bởi kháng thể đặc hiệu kép gắn kết protein BCMA được bao lên nhựa ở liều được chỉ ra. Cột 9 thể hiện mức picogram của TNF α được giải phóng bởi tế bào T pan được kích thích bởi kháng thể đặc hiệu kép gắn kết protein BCMA được bao lên nhựa ở liều được chỉ ra. Cột 10 thể hiện giá trị EC₅₀ của sự ly giải tế bào u U266 do kháng thể đặc hiệu kép trong sự có mặt của tế bào T pan của người. Cột 11 thể hiện phần trăm ly giải tế bào u U266 trong sự có mặt của kháng thể đặc hiệu kép và tế bào T pan của người ở liều 333 ng/mL kháng thể đặc hiệu kép. Cột 12 thể hiện ái lực gắn kết protein của nhánh kháng-CD3 của kháng thể đặc hiệu kép đo được bởi Octet. Cột 13 thể hiện giá trị MFI của mức gắn kết tế bào Jurkat của kháng thể đặc hiệu kép.

Ví dụ 5 Xác định đặc điểm kháng thể đặc hiệu kép

Bảy kháng thể đặc hiệu kép α CD3_fam2: α BCMA, mỗi kháng thể có nhánh kháng-CD3 duy nhất và nhánh kháng-BCMA chung, được thử nghiệm về khả năng diệt tế bào u U266 BCMA+ bằng cách đổi hướng tế bào phôi T hoạt hóa. Trong thí nghiệm này, tế bào U266 biểu hiện BCMA được trộn với tế bào T pan hoạt hóa với tỷ lệ E:T 10:1 cùng với việc bổ sung kháng thể đặc hiệu kép. Thể hiện trong Fig.4, trục x thể hiện nồng độ kháng thể sử dụng và trục-y thể hiện mức % ly giải tế bào u 6 giờ sau khi bổ sung kháng thể.

Sự so sánh hoạt tính ly giải tế bào u do kháng thể đặc hiệu kép với sự giải phóng IL-2 xytokin được trình bày trong biểu đồ từng điểm của Fig.5. Mỗi tương quan giữa mức sản sinh IL-2 và mức ly giải tế bào u U266 là $R^2 = 0,37$. Sự so sánh hoạt tính ly giải tế bào

u do kháng thể đặc hiệu kép với sự giải phóng IFN- γ xytokin được trình bày trong biểu đồ từng điểm của Fig.6. Mỗi tương quan giữa mức sản sinh IFN- γ và mức ly giải tế bào u U266 là $R^2 = 0,53$. Sự so sánh hoạt tính ly giải tế bào u U266 do kháng thể đặc hiệu kép với ái lực gắn kết kháng-CD3 được trình bày trong biểu đồ từng điểm của Fig.7. Mỗi tương quan giữa giá trị EC50 diệt U266 và ái lực gắn kết protein là $R^2 = 0,93$.

Ví dụ 6 Sự ly giải tế bào u

Kháng thể đặc hiệu kép $\alpha\text{CD3_F1F}:\alpha\text{BCMA}$ được thử nghiệm về khả năng diệt ba tế bào u BCMA+ khác nhau và một dòng tế bào BCMA-âm tính bằng cách đổi hướng tế bào phôi T hoạt hóa. Trong thí nghiệm này, tế bào u được trộn với tế bào T pan hoạt hóa với tỷ lệ E:T 10:1 cùng với việc bổ sung kháng thể đặc hiệu kép. Các kết quả được thể hiện trong Fig.8A-6D. Ô A thể hiện sự diệt tế bào RPMI-8226, ô B thể hiện sự diệt tế bào NCI-H929, ô C thể hiện sự diệt tế bào U-266, và ô D thể hiện sự diệt tế bào K562, đối chứng âm. Trục x thể hiện nồng độ kháng thể sử dụng và trục-y thể hiện mức % ly giải của tế bào u 6 giờ sau khi bổ sung kháng thể.

Mức giải phóng xytokin IL-2 được đo sau khi để nghỉ tế bào T của người được nuôi cấy với các dòng tế bào u khác nhau và liều tăng dần kháng thể đặc hiệu kép $\alpha\text{CD3_F1F}:\alpha\text{BCMA}$. Fig.9A thể hiện sự giải phóng IL-2 được kích thích bởi tế bào RPMI-8226, Fig.9B thể hiện sự giải phóng IL-2 được kích thích bởi tế bào NCI-H929, Fig.9C thể hiện sự giải phóng IL-2 được kích thích bởi tế bào U-266, và Fig.9D thể hiện sự giải phóng IL-2 được kích thích bởi tế bào K562, đối chứng âm.

Mức giải phóng xytokin IFN- γ được đo sau khi để nghỉ tế bào T của người được nuôi cấy với các dòng tế bào u khác nhau và liều tăng dần kháng thể đặc hiệu kép $\alpha\text{CD3_F1F}:\alpha\text{BCMA}$. Fig.10A thể hiện sự giải phóng IFN- γ được kích thích bởi tế bào RPMI-8226, Fig.10B thể hiện sự giải phóng IFN- γ được kích thích bởi tế bào NCI-H929, Fig.10C thể hiện sự giải phóng IFN- γ được kích thích bởi tế bào U-266, và Fig.10D thể hiện sự giải phóng IFN- γ được kích thích bởi tế bào K562, đối chứng âm.

Ví dụ được đưa ra để cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này phần bộc lộ và mô tả toàn bộ về cách tạo ra và sử dụng sáng chế, và không nhằm làm hạn chế phạm vi mà các tác giả sáng chế đề cập đến cũng như họ không nhằm thể hiện rằng các thử nghiệm sau đây là tất cả hoặc chỉ có các thử nghiệm này được tiến hành. Các nỗ

lực đã được thực hiện để đảm bảo độ chính xác với các số liệu sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.) nhưng một số sai số thử nghiệm và độ lệch có thể cần tính đến. Trừ khi được nêu khác, các phần là phần về khối lượng, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là độ Celsius, và áp suất là hoặc gần áp suất khí quyển.

Khi sáng chế được mô tả về các phương án cụ thể của nó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này nên hiểu rằng có thể thực hiện các thay đổi khác nhau và các đối tượng tương đương có thể được thay thế mà không vượt ra ngoài phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, nhiều phương án sửa đổi có thể được thực hiện để điều chỉnh tình trạng, nguyên liệu, chế phẩm, quy trình, bước quy trình hoặc các bước quy trình cụ thể, theo mục tiêu, tinh thần và phạm vi sáng chế. Tất cả các phương án sửa đổi như vậy được dự tính là nằm trong phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ đính kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đa đặc hiệu bao gồm:

(i) gốc gắn kết thứ nhất mà có tính đặc hiệu gắn kết với CD3δ ϵ ở người, bao gồm:
miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm:

(A) trình tự CDR1 bao gồm GFTFDDYA (SEQ ID NO: 29), trình tự CDR2 bao gồm ISWNSGSI (SEQ ID NO: 24), và trình tự CDR3 bao gồm AKDSRGYGDYRLGGAY (SEQ ID NO: 41); hoặc

(B) trình tự CDR1 bao gồm GFTFHNYA (SEQ ID NO: 34), trình tự CDR2 bao gồm ISWNSGSI (SEQ ID NO: 24), và trình tự CDR3 bao gồm AKDSRGYGDYSLGGAY (SEQ ID NO: 43); và

miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự CDR1 bao gồm QSVSSN (SEQ ID NO: 35), trình tự CDR2 bao gồm GAS (SEQ ID NO: 38), và trình tự CDR3 bao gồm QQYNNWPWT (SEQ ID NO: 45); và

(ii) gốc gắn kết thứ hai mà có tính đặc hiệu gắn kết với kháng nguyên liên kết khối u (TAA) hoặc kháng nguyên đặc hiệu khối u (TSA).

2. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 1, trong đó gốc gắn kết thứ nhất bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự CDR1 bao gồm GFTFDDYA (SEQ ID NO. 29), trình tự CDR2 bao gồm ISWNSGSI (SEQ ID NO: 24), và trình tự CDR3 bao gồm AKDSRGYGDYRLGGAY (SEQ ID NO: 41).

3. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 1, trong đó gốc gắn kết thứ nhất bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự CDR1 bao gồm GFTFHNYA (SEQ ID NO: 34), trình tự CDR2 bao gồm ISWNSGSI (SEQ ID NO: 24), và trình tự CDR3 bao gồm AKDSRGYGDYSLGGAY (SEQ ID NO: 43).

4. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó:

trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 trong miền biến đổi chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ nhất có mặt trong vùng khung VH của người; và

trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ của gốc gắn kết thứ nhất có mặt trong vùng khung Vkappa của người.

5. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 4, trong đó:

miền biến đổi chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự vùng khung nêu trong SEQ ID NO: 1; và

miền biến đổi chuỗi nhẹ của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự vùng khung nêu trong SEQ ID NO: 19.

6. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 4, trong đó:

miền biến đổi chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự vùng khung nêu trong SEQ ID NO: 13; và

miền biến đổi chuỗi nhẹ của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự vùng khung nêu trong SEQ ID NO: 19.

7. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 5, trong đó:

miền biến đổi chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1; và

miền biến đổi chuỗi nhẹ của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19.

8. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 6, trong đó:

miền biến đổi chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13; và

miền biến đổi chuỗi nhẹ của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19.

9. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 1, trong đó gốc gắn kết thứ hai bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng đơn, trong cấu hình đơn hoặc tiếp đôi.

10. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 1, trong đó gốc gắn kết thứ nhất bao gồm tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nhẹ và tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nặng, và trong đó gốc gắn kết thứ hai bao gồm tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nặng.

11. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 10, trong đó tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nhẹ của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm vùng cố định chuỗi nhẹ.

12. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 10, trong đó tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm ít nhất một miền cố định của chuỗi nặng.

13. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 12, trong đó tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm miền CH1, miền CH2, và miền CH3.

14. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 13, trong đó tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ nhất bao gồm vùng bản lề được định vị giữa miền CH1 và miền CH2.

15. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 10, trong đó tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ hai bao gồm ít nhất một miền cố định.

16. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 15, trong đó tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ hai bao gồm miền CH2 và miền CH3, nhưng không có miền CH1.

17. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 15 hoặc 16, trong đó tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ hai bao gồm vùng bản lề được định vị giữa gốc gắn kết thứ hai và miền CH2.

18. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 17, trong đó các miền CH2 và CH3 của tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ nhất và các miền CH2 và CH3 của tiểu đơn vị polypeptit chuỗi nặng của gốc gắn kết thứ hai cùng tạo ra vùng Fc.

19. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 18, trong đó vùng Fc bao gồm vùng Fc của IgG1 của người có trình tự tự nhiên.

20. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 18, trong đó vùng Fc bao gồm vùng Fc của IgG1 của người biến thể.

21. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 20, trong đó vùng Fc của IgG1 của người biến thể được thiết kế để làm giảm một hoặc nhiều chức năng hiệu ứng.

22. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 18, trong đó vùng Fc bao gồm vùng Fc của IgG4 của người có trình tự tự nhiên.

23. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 18, trong đó vùng Fc bao gồm vùng Fc của IgG4 của người biến thể.

24. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 23, trong đó vùng Fc của IgG4 của người biến thể được thiết kế để làm giảm một hoặc nhiều chức năng hiệu ứng.

25. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 24, trong đó vùng Fc được thiết kế để làm giảm sự hình thành homodime.

26. Dược phẩm chứa kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25.

27. Polynucleotit mã hóa kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25.

28. Vector bao gồm polynucleotit theo điểm 27.

29. Tế bào bao gồm vector theo điểm 28.

30. Phương pháp sản xuất kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25, bao gồm bước phát triển tế bào theo điểm 29 trong các điều kiện cho phép sự biểu hiện của kháng thể đa đặc hiệu, và phân lập kháng thể đa đặc hiệu từ tế bào này.

31. Kit để điều trị bệnh hoặc rối loạn cho cá nhân cần điều trị, bao gồm kháng thể đa đặc hiệu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25, hoặc dược phẩm theo điểm 26, và hướng dẫn sử dụng.
32. Kit theo điểm 31, trong đó bộ kit này còn bao gồm ít nhất một chất phản ứng bổ sung.
33. Kit theo điểm 32, trong đó ít nhất một chất phản ứng bổ sung bao gồm dược chất hóa trị liệu.
34. Kháng thể đa đặc hiệu theo điểm 1, trong đó kháng thể đa đặc hiệu này là kháng thể đặc hiệu kép.

1/11

FIG. 1A

ID nội bộ		CDR1	CDR2	CDR3
312557	SEQ ID NO:1	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308261	SEQ ID NO:2	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
308159	SEQ ID NO:3	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
308160	SEQ ID NO:4	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
308256	SEQ ID NO:5	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312585	SEQ ID NO:6	GFTFANYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312614	SEQ ID NO:7	GFTFNYYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312583	SEQ ID NO:8	GFTFADYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312586	SEQ ID NO:9	GFTFDNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312624	SEQ ID NO:10	GFTFDNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312578	SEQ ID NO:11	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312620	SEQ ID NO:12	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312634	SEQ ID NO:13	GFTFHNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312579	SEQ ID NO:14	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312630	SEQ ID NO:15	GFTFDNYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYSLGGAY
312570	SEQ ID NO:16	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312567	SEQ ID NO:17	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY
312558	SEQ ID NO:18	GFTFDDYA	ISWNSGSI	AKDSRGYGDYRLGGAY

FIG. 1B

312325	SEQ ID NO:19	QSVSSN	GAS	QQYNNWPWT
308902- hóa trị hai	SEQ ID NO:20	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPFDH
308902	SSEQ ID NO:21	GFTVSSYG	IRGSDGST	AKQGENDGPFDH

FIG. 1C

304703	SEQ ID NO. 22	GGSISSGGHY	IHYSGST	ARWRHDIFAAYFYGGMDV
--------	---------------	------------	---------	--------------------

2/11

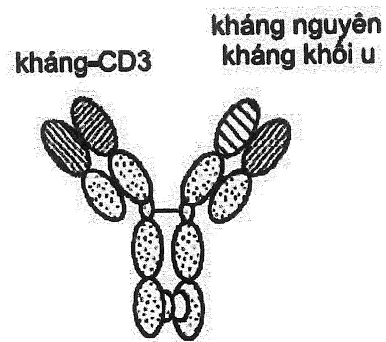


FIG. 2A

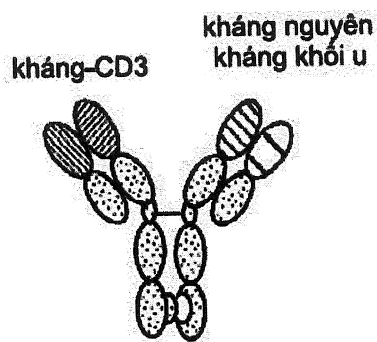


FIG. 2B

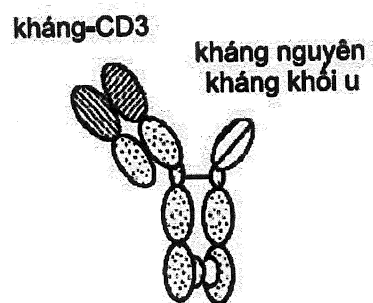


FIG. 2C

3/11

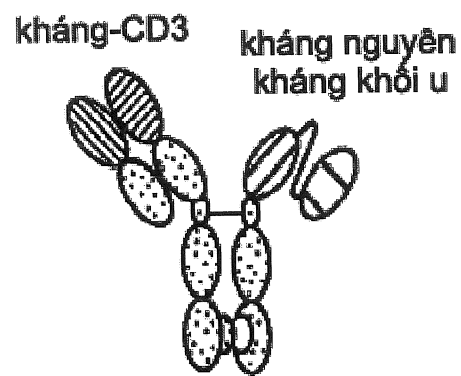


FIG. 2D

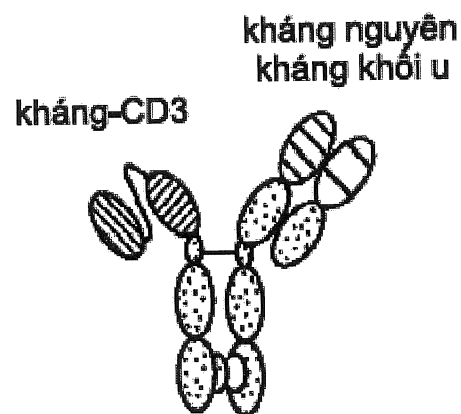


FIG. 2E

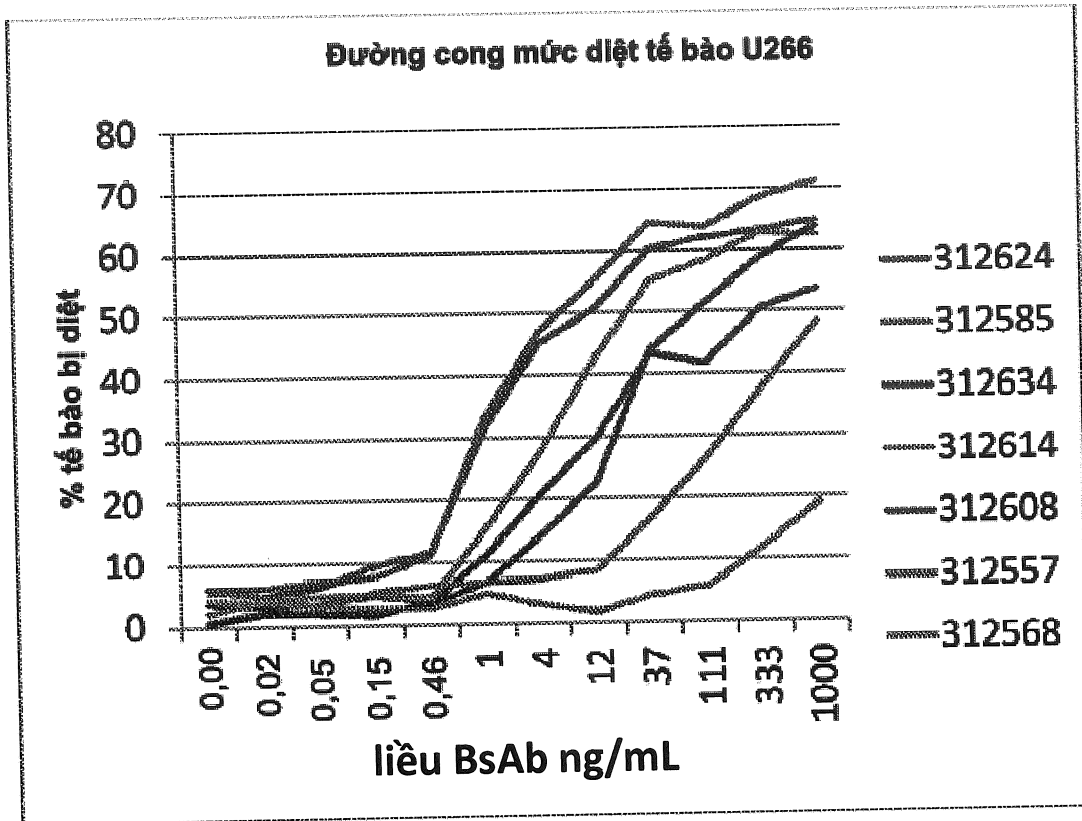
4/11

Cột	KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP KHÁNG CD3:KHÁNG BCMA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	KHÁNG THỂ KHÁNG CD3 GÓC				IL-2	IL-6	IL-10	IFN γ	TNF α	giá trị EC50 diệt tế bào (ng/ml)	% diệt (333ng/mL)	KD (nM)	Gắn kết tế bào Jurkat (MFI)
ID kháng thể kháng CD3		Gắn kết tế bào Jurkat (MFI)	Gắn kết tế bào Cyno (MFI)	ở liều BsAb ng/ml	37	111	111	12	12	2,0	63	227	296
312624		30,5	1,4	CD3_F2E-BCMA	130	1,0	24,1	705	1787	2,0	63	227	296
312585		32,7	0,9	CD3_F2C-BCMA	193	0,5	19,2	751	1821	2,1	68	44	513
312614		32,4	0,9	CD3_F2D-BCMA	294	1,5	89,9	1185	2387	6,1	63	86	357
312634		21,4	1,1	CD3_F2F-BCMA	44	0,5	2,4	333	485	9,8	51	714	67
312608		25,9	1,0	CD3_F2A-BCMA	196	0,5	3,3	505	1161	22,2	59	199	110
312557		6,1	1,0	CD3_F2B-BCMA	8	0,5	0,6	154	553	150,1	38	1000	31
312568		4,1	1,2	CD3_F2G-BCMA	1	0,5	0,5	49	231	352,0	12	ND	9
304703		15,9	26,2	CD3_F1A-BCMA	212	0,8	48,5	746	1844	6,4	71	98	149

FIG. 3

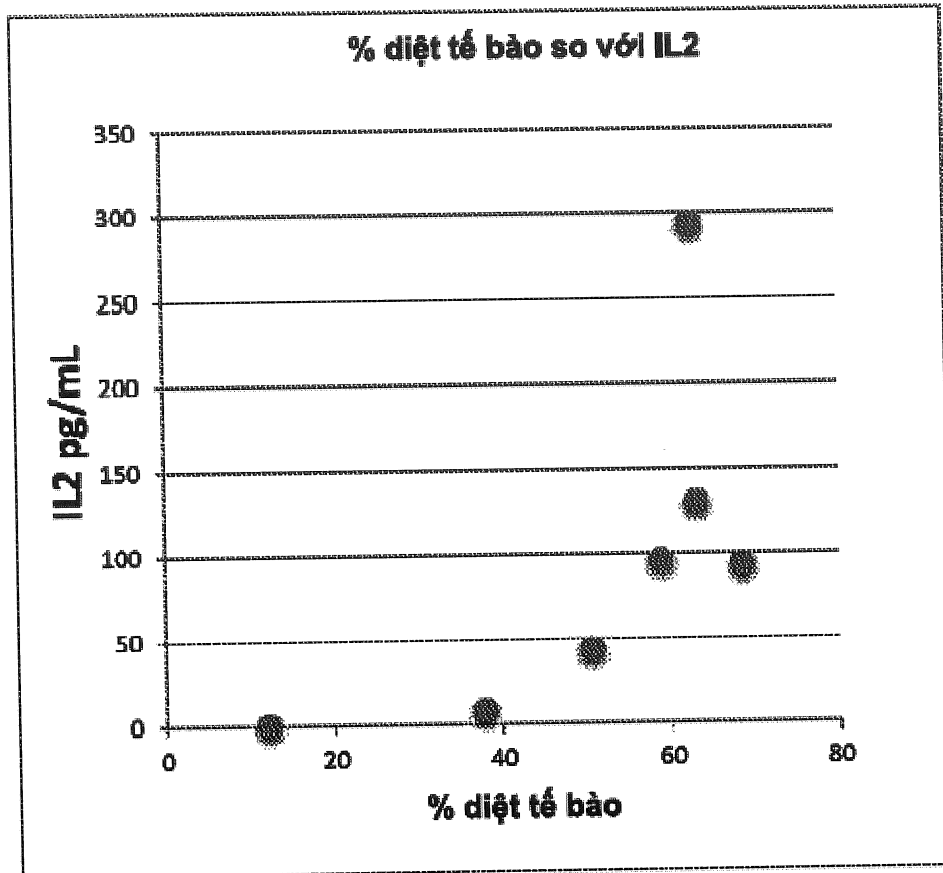
5/11

FIG. 4



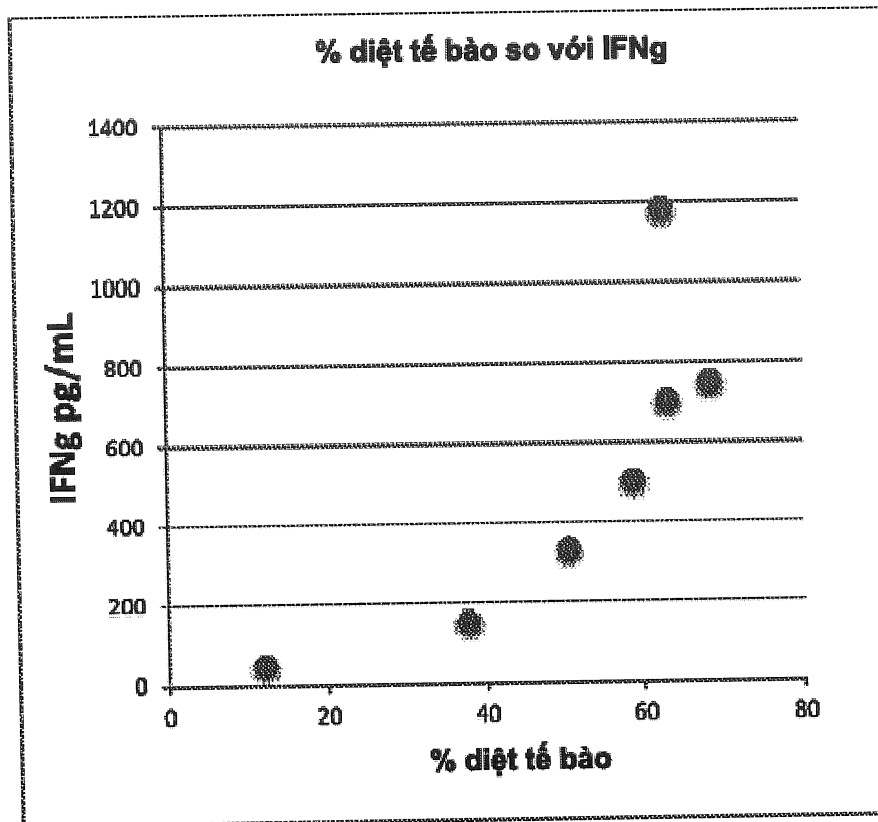
6/11

FIG. 5



7/11

FIG. 6



8/11

FIG. 7

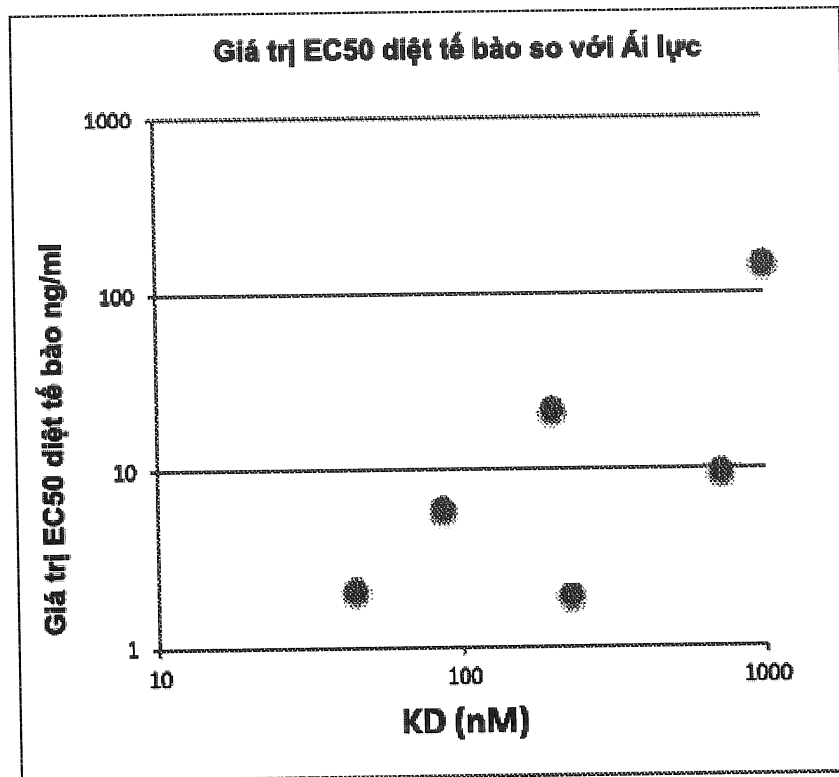


FIG. 8B NCI-H929

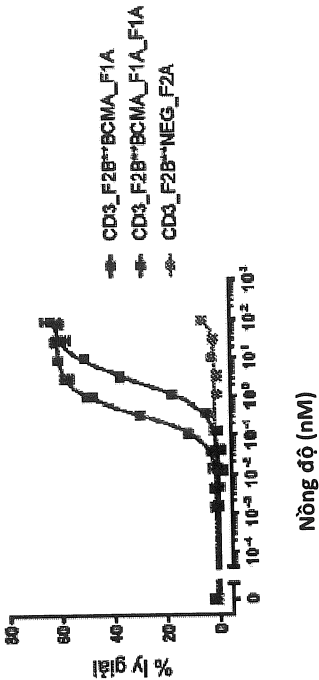


FIG. 8D K562

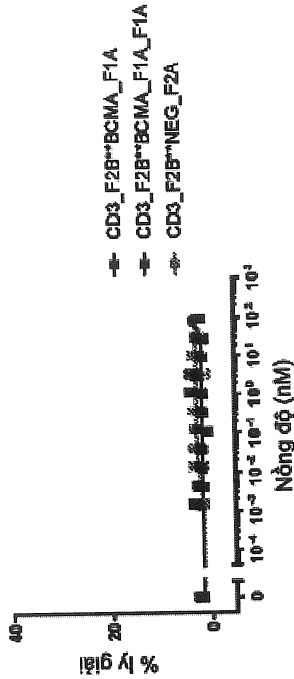


FIG. 8A RPMI-8226

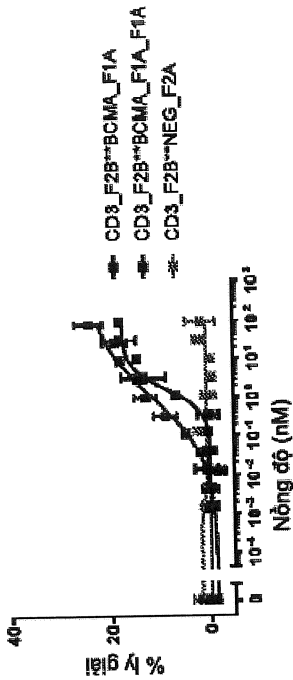
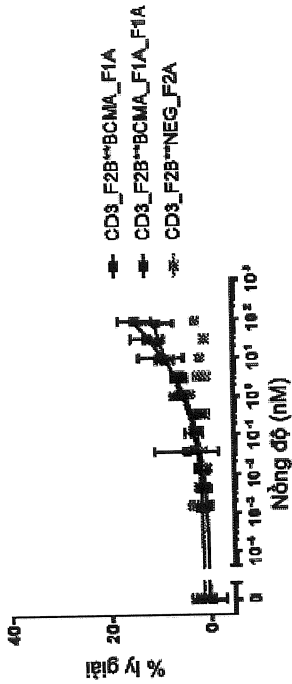


FIG. 8C U-266



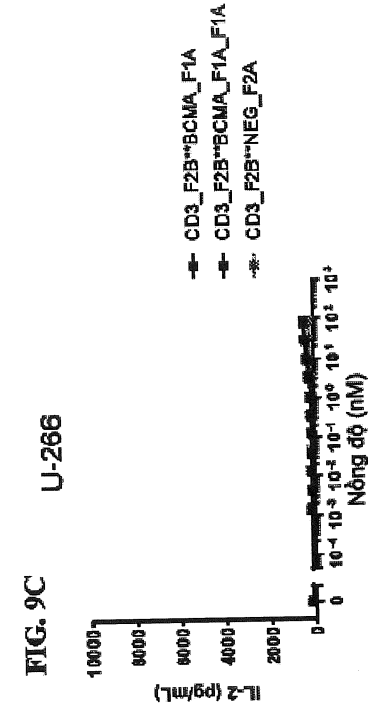
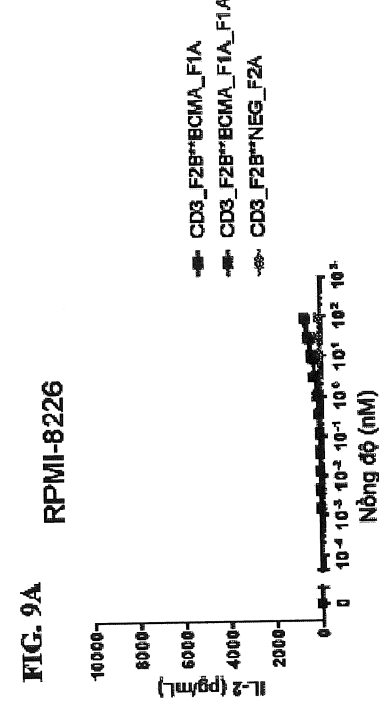
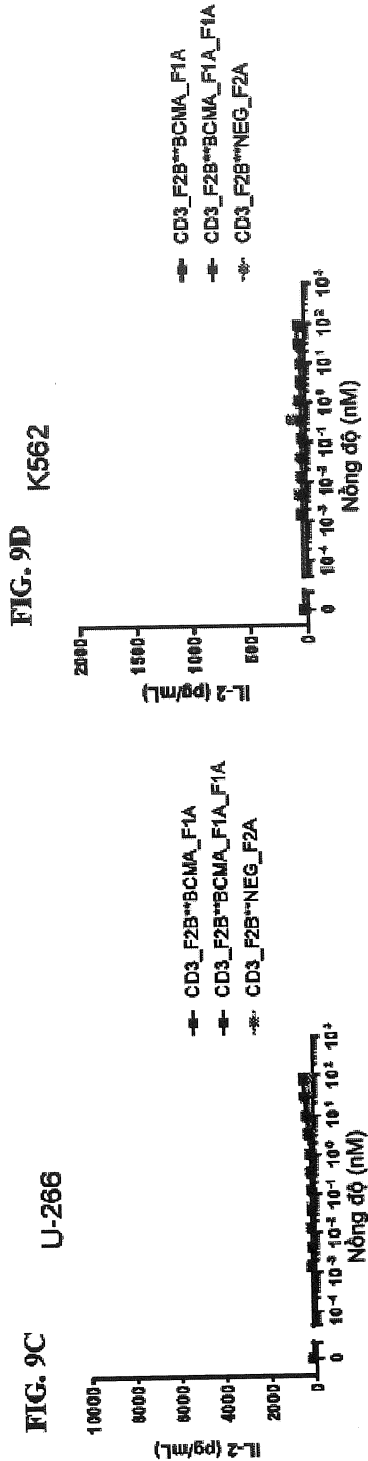
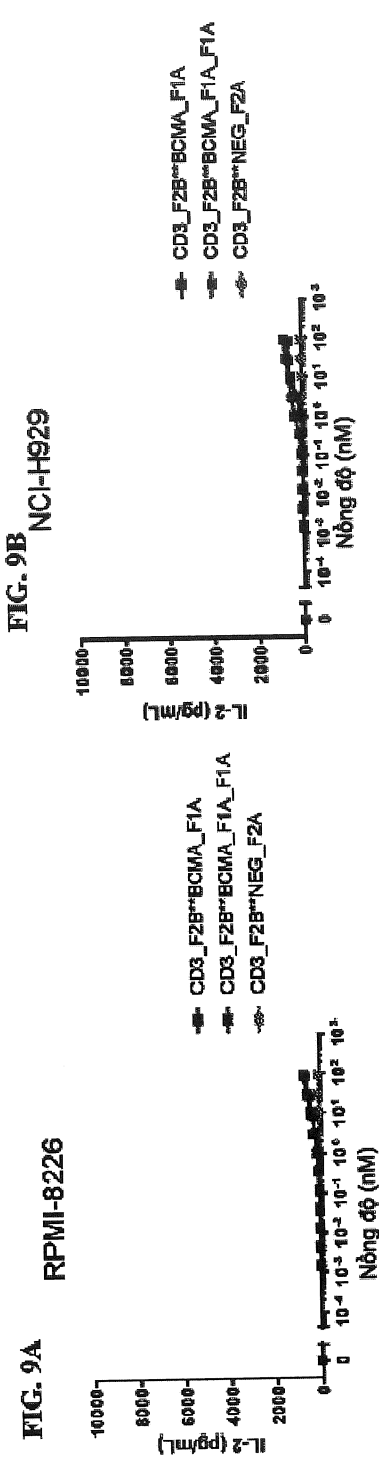


FIG. 10B
NCI-H929



FIG. 10D
K562

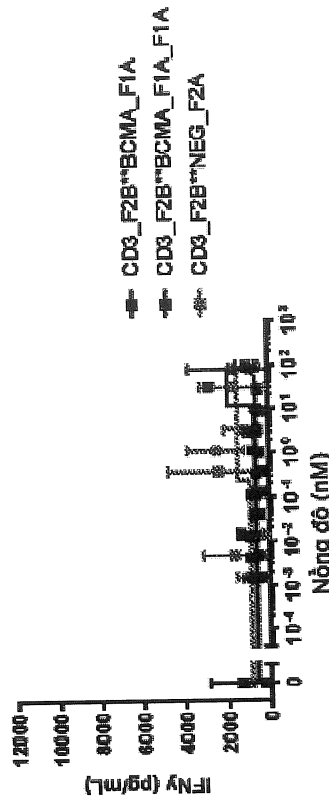


FIG. 10A
RPMI-8226

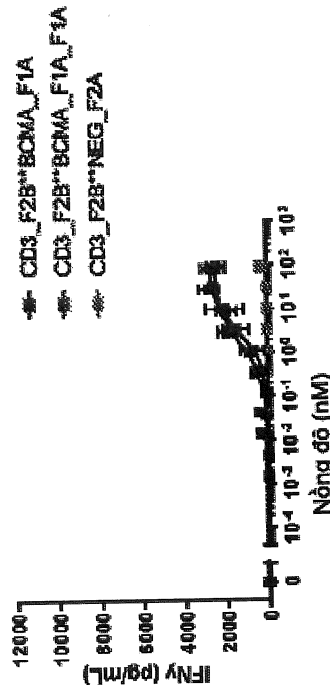
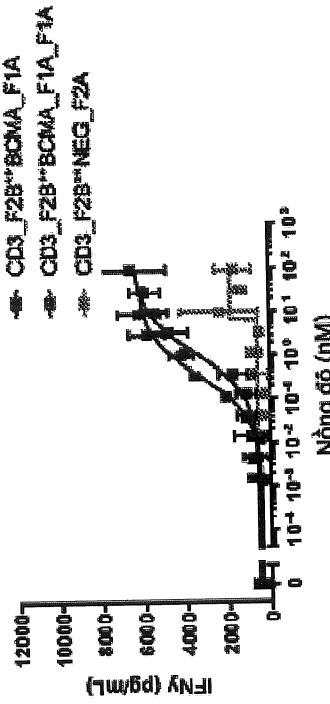


FIG. 10C
U-266



<110> TENEOBIO, INC.

<130> TNO-0010-EP2

<140> EP 17851217.4

<141> 2017-06-20

<150> PCT/US2017/038377

<151> 2017-06-20

<150> 62/491,908

<151> 2017-04-28

<150> 62/394,360

<151> 2016-09-14

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

$\langle 211 \rangle$ 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

 $\langle 400 \rangle$ 1

~~400~~ 1
 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 Ser Ile Gly 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 Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1

115

120

<210> 2
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 2
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe 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 Ser Ile Gly 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 3
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 3
 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 Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 2

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser 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

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 4

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 Ser Ile Gly 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 Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 5

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 Ser Ile Gly 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 Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
100 105 110

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

<210> 6

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 6

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 Ala Asn 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 Ser Ile Asp 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 7

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 Asn Asn 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 Ser Ile Gly 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 Gly Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 8

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 8

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 Ala 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 Ser Ile Gly 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 Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
100 105 110

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

<210> 9

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 9

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 Asn 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 Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser 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

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
6

100

105

110

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

<210> 10

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 10

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 Asn 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 Ser Ile Gly 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 11

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 11

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 Ser Ile Gly 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 12

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 12

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 Ser Ile Gly 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 Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Ser Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 13
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 13
 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 His Asn 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 Ser Ile Gly 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 Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 14
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 14
 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 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 Ser Ile Gly 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 Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
100 105 110

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

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 15

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 Asn 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 Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser 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

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
100 105 110

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

<210> 16

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 16

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 Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser 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

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 17

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 17

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 Glu 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 Ser Ile Gly 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 Leu Tyr Tyr Cys
 11

85

90

95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 18

<211> 123

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 18

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 Ser Ile Gly 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 Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110

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

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 19

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 12

20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 20
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens
 <400> 20
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Arg Gly Ser Asp 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 Gln Gly Glu Asn Asp Gly Pro Phe Asp His Arg Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
 115 120 125

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
 130 135 140

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp
 145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser Gly Ile Arg
 165 170 175

Gly Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
 180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
 195 200 205

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gln Gly
 210 215 220

Glu Asn Asp Gly Pro Phe Asp His Arg Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 225 230 235 240

Val Ser Ser

<210> 21
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 21
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ser Gly Ile Arg Gly Ser Asp 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
 14

85

90

95

Ala Lys Gln Gly Glu Asn Asp Gly Pro Phe Asp His Arg Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 22
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg Trp Arg His Asp Ile Phe Ala Ala Tyr Pro Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (5)..(6)
 <223> Axit amin bất kỳ

<400> 23
 Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa Tyr Ala
 1 5

<210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 24
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
 1 5

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
 "

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Axit amin bất kỳ

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(12)
 <223> Axit amin bất kỳ

<400> 25
 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Xaa Tyr Xaa Xaa Gly Gly Ala Tyr
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(12)
 <223> Axit amin bất kỳ

<400> 26

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Xaa Xaa Gly Gly Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /luu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 27

Thr Val Ala Ala Pro
1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /luu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro
1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 29

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 30

Gly Phe Thr Phe Ala Asn Tyr Ala
1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Người Homo sapiens

<400> 31

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 32
 Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 33
 Gly Phe Thr Phe Asp Asn Tyr Ala
 1 5

<210> 34
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 34
 Gly Phe Thr Phe His Asn Tyr Ala
 1 5

<210> 35
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 35
 Gln Ser Val Ser Ser Asn
 1 5

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 36
 Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 37
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly His Tyr
 1 5 10

<210> 38
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 38
 Gly Ala Ser
 1

<210> 39
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 39
 Ile Arg Gly Ser Asp Gly Ser Thr
 1 5

<210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 40
 Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 41
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 41
 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
 1 5 10 15

<210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 42
 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 1 5 10 15

<210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 43
 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 44
 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Ser Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 1 5 10 15

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 45
 Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 46
 Ala Lys Gln Gly Glu Asn Asp Gly Pro Phe Asp His
 1 5 10

<210> 47
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 47
 Ala Arg Trp Arg His Asp Ile Phe Ala Ala Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15

Gly Met Asp Val
 20

<210> 48
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (11)..(11)
 <223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (1)..(16)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể dựa vào trình tự không có sự ưu tiên đối với các gốc
trong các giải thích đối với các vị trí biến thể"

<400> 48
Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
1 5 10 15

2