



(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)



1-0048854

(51)^{2020.01} A61K 39/395; C07K 16/28; C12N 1/15; (13) B
C12P 21/08; C12N 1/21; C12N 15/13;
C12N 15/63; C12N 5/10; A61P 35/00;
C12N 1/19

(21) 1-2021-02367

(22) 30/10/2019

(86) PCT/JP2019/042587 30/10/2019

(87) WO 2020/090892 07/05/2020

(30) 2018-205995 31/10/2018 JP

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/08/2021 401A

(73) ASTELLAS PHARMA INC. (JP)

5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 1038411, Japan

(72) ITO, Misato (JP); KASHIWAGI, Risa (JP); KAWAKAMI, Masakatsu (JP).

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

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG FN14 Ở NGƯỜI, POLYNUCLEOTIT, VECTƠ BIỂU
HIỆN, TẾ BÀO CHỦ, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC
PHẨM

(21) 1-2021-02367

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Fn14 ở người mà gắn kết với Fn14 ở người để ức chế hoạt động qua Fn14 ở người, từ đó ngăn ngừa hoặc điều trị chứng suy mòn do ung thư.

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu về kháng thể kháng Fn14 ở người, và thấy rằng kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit, vectơ biểu hiện, tế bào chủ, phương pháp sản xuất kháng thể và dược phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Fn14 ở người, polynucleotit, vector biểu hiện, tế bào chủ, phương pháp sản xuất kháng thể và dược phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chứng suy mòn là hội chứng chuyển hóa phức tạp kết hợp với các bệnh lý có từ trước đó và được đặc trưng bởi sự mất cơ có hoặc không có sự mất lượng chất béo. Dấu hiệu lâm sàng dễ thấy của chứng suy mòn là sự sụt cân ở người lớn và sự suy giảm tăng trưởng ở trẻ em (Tài liệu phi sáng chế 1). Khoảng 80% bệnh nhân mắc ung thư từ trước bị mắc chứng suy mòn, mà được gọi là chứng suy mòn do ung thư. Chứng suy mòn làm giảm tiên lượng bệnh của bệnh nhân hoặc chất lượng của cuộc sống (quality of life - QOL) do kháng lại với các cách điều trị, và liên quan đến sự gia tăng tỷ lệ tử vong. Tuy nhiên, không có cách điều trị hiệu quả đối với chứng suy mòn. Mặc dù cơ chế của sự xuất hiện của chứng suy mòn là không rõ ràng, chứng suy mòn được coi là trạng thái viêm của toàn bộ cơ thể thông qua các cytokin khác nhau trong những năm gần đây (Tài liệu phi sáng chế 2).

Thụ thể có thể cảm ứng yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 14 (Fn14) (cũng được gọi là TNFRSF12A) là thành viên của họ thụ thể yếu tố gây hoại tử khối u. Fn14 cũng được biết đến là thụ thể Tweak, mà gắn kết với chất cảm ứng yếu tố giống như TNF của sự gây chết tế bào theo chương trình (Tweak). Sự hoạt hóa độc lập hoặc phụ thuộc Tweak của Fn14 đã được biến đổi để hoạt hóa đường tín hiệu NFkB và để kiểm soát sự tăng sinh tế bào, sự di trú, sự biệt hóa, và sự gây chết tế bào theo chương trình, cũng như chứng viêm liên quan đến sự tạo mạch, sự phá hủy và tái tạo mô (Tài liệu phi sáng chế 3).

Về mối liên quan với các bệnh ung thư, đã có báo cáo rằng Fn14 được biểu hiện quá mức trong các bệnh ung thư thể rắn khác nhau (Tài liệu phi sáng chế 4) và Fn14 có liên quan đến sự tiến triển và di căn khối u (Tài liệu phi sáng chế 5). Ngoài

ra, đã có báo cáo rằng trong mẫu hình chuột mắc chứng suy mòn do ung thư, kháng thể kháng Fn14 là hiệu quả trong việc cải thiện các triệu chứng của chứng suy mòn, và hoạt động của chúng là do sự ức chế trong khối u (Tài liệu phi sáng chế 6).

Trong khi đó, sự hoạt hóa Fn14 có thể gây ra việc sản xuất xytokin gây viêm và làm trầm trọng thêm tình trạng viêm. Enavatuzumab (Tài liệu sáng chế 1), mà hiện đang được phát triển lâm sàng, đã được báo cáo như là kháng thể chủ vận kháng Fn14 ở người. Độc tính ở gan đã được báo cáo trong thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 1 của Enavatuzumab (Tài liệu phi sáng chế 7), và đã được gợi ý rằng chứng viêm có thể gây ra bởi việc điều trị bằng Enavatuzumab (Tài liệu phi sáng chế 8).

Kháng thể đơn dòng ở chuột CRCBT-06-002 được báo cáo là kháng thể mà gắn kết với Fn14 ở người và có hoạt tính đối kháng, nhưng không có hoạt tính chủ vận trong các điều kiện cụ thể (Tài liệu sáng chế 2). CRCBT-06-002 đã được báo cáo là có hoạt tính đối kháng mà ức chế sự sản sinh IL-8 được gây cảm ứng bởi sự kích thích Tweak trong dòng tế bào A375 mà là tế bào có nguồn gốc từ u hắc sắc tố ác tính ở người và có hiệu quả trong mẫu hình chuột mắc chứng suy mòn do ung thư. Tuy nhiên, hoạt tính chủ vận mà gây cảm ứng với sự sản sinh IL-8 từ các tế bào A375 mà không có Tweak còn lại (Tài liệu sáng chế 2).

Kháng thể đối kháng kháng Fn14 mà không có hoạt tính chủ vận và có thể tránh khỏi các tác dụng phụ không mong muốn là không được biết đến.

Tài liệu liên quan trong tình trạng kỹ thuật

Tài liệu sáng chế

[Tài liệu sáng chế 1] WO 2009/020933

[Tài liệu sáng chế 2] WO 2013/026099

Tài liệu phi sáng chế

[Tài liệu phi sáng chế 1] Evans WJ et al., Clin Nutr. 2008, Vol. 27, p. 793-799

[Tài liệu phi sáng chế 2] Baracos VE et al., Nat Rev Dis Primers. 2018, Vol. 4 Article number 17105, p. 1-18

[Tài liệu phi sáng chế 3] Winkles JA, Nat Rev Drug Discov. 2008, Vol. 7, p. 411-425

[Tài liệu phi sáng chế 4] Culp PA et al., Clin Cancer Res. 2010, Vol. 16, p. 497-508

[Tài liệu phi sáng chế 5] HU G et al., Tumor Biol. 2017, Vol. 39 June, p. 1-9

[Tài liệu phi sáng chế 6] Johnston AJ et al., Cell. 2015, Vol. 162, p. 1365-1378

[Tài liệu phi sáng chế 7] Lam ET et al., Mol Cancer Ther. 2018, Vol. 17, p. 215-221

[Tài liệu phi sáng chế 8] Choi D et al., Am J Pharmacol Toxicol. 2017, Vol. 12, p. 18-38

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề được giải quyết bởi sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể kháng Fn14 ở người có độ an toàn tốt mà vẫn giữ được hoạt tính đối kháng cao và đã làm giảm hoạt tính chủ vận so với các kháng thể thông thường.

Các phương thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu về việc sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người, và kết quả là, đã sản xuất được kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 31 đến 35 của SEQ ID NO: 2, CDR2 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 50 đến 65 của SEQ ID NO: 2, và CDR3 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 98 đến 114 của SEQ ID NO: 2, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 24 đến 40 của SEQ ID NO: 4, CDR2 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 56 đến 62 của SEQ ID NO: 4, và CDR3 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 95 đến 103 của SEQ ID NO: 4 (Các Ví dụ từ 2 đến 4). Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng kháng thể gắn kết với Fn14 ở người (Ví dụ 6), ức chế sự hoạt hóa NFkB và sự sản xuất IL-8 được gây cảm ứng bởi sự kích thích Tweak (các Ví dụ 7 và 8), và không cảm ứng sự sản xuất IL-8 mà không có Tweak (Ví dụ 8). Kết quả là, kháng thể kháng Fn14 ở người có hoạt tính đối kháng nhưng không có hoạt tính chủ vận được đề xuất, và sáng chế đã được hoàn thiện. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng kháng thể trong đó kháng thể này được chuột hóa (Ví dụ 4) để ngăn chặn sự giảm trọng lượng và khối lượng cơ ở mẫu

hình chuột mắc chứng suy mòn do ung thư (Ví dụ 9), và thời gian sống sót được kéo dài trong trường hợp mà kháng thể và gemcitabin được sử dụng kết hợp so với việc dùng kháng thể đơn lẻ hoặc gemcitabin đơn lẻ (Ví dụ 10).

Ví dụ, sáng chế sau đây được đề xuất theo sáng chế.

[1] Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 31 đến 35 của SEQ ID NO: 2, CDR2 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 50 đến 65 của SEQ ID NO: 2, và CDR3 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 98 đến 114 của SEQ ID NO: 2; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 24 đến 40 của SEQ ID NO: 4, CDR2 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 56 đến 62 của SEQ ID NO: 4, và CDR3 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 95 đến 103 của SEQ ID NO: 4.

[2] Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [1], được chọn từ mục (1) và (2) sau đây:

(1) kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID NO: 4; và

(2) kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được tạo thành bởi sự biến đổi sau dịch mã của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng ở mục (1).

[3] Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [2], bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID NO: 4.

[4] Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [2], trong đó sự biến đổi sau dịch mã là sự pyroglutamylat hóa ở đầu N của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc sự khuyết đoạn lysin ở đầu C của chuỗi nặng.

[5] Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [2], bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2, trong đó glutamin của axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 được biến đổi thành axit pyroglutamic; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 từ 114 của SEQ ID NO: 4.

[6] Kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [2], được chọn từ mục (3) và (4) sau đây:

(3) kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4; và

(4) kháng thể kháng Fn14 ở người được tạo thành bởi sự biến đổi sau dịch mã của kháng thể ở mục (3).

[7] Kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [6], bao gồm:

chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2; và

chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4

[8] Kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [6], trong đó the sự biến đổi sau dịch mã là sự pyroglutamylat hóa ở đầu N của chuỗi nặng và/hoặc sự khuyết đoạn lysin ở đầu C của chuỗi nặng.

[9] Kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [8], bao gồm:

chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 454 của SEQ ID NO: 2, trong đó glutamin của axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 được biến đổi thành axit pyroglutamic; và

chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4.

[10] Đoạn gắn kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5], mà là đoạn vùng biến đổi chuỗi đơn, Fab, Fab', hoặc F(ab')₂.

[11] Polynucleotit bao gồm:

trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [3].

[12] Polynucleotit bao gồm:

trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [3].

[13] Vector biểu hiện bao gồm:

polynucleotit theo mục [11] và/hoặc [12].

[14] Tế bào chủ được chọn từ nhóm chỉ gồm mục từ (a) đến (d) sau đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [3] và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [3], và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng;

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [3]; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [3].

[15] Tế bào chủ được chọn từ nhóm chỉ gồm mục từ (e) đến (h) sau đây:

(e) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [7] và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể;

(f) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục

[7], và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể;

(g) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [7]; và

(h) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [7].

[16] Phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng, phương pháp này bao gồm:

bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm chỉ gồm mục (A) đến (C) để biểu hiện kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng:

(A) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [3] và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng;

(B) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [3], và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng; và

(C) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [3], và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

[17] Phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người, phương pháp này bao gồm:

bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm chỉ gồm mục từ (D) đến (F) để biểu hiện kháng thể kháng Fn14 ở người:

(D) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [7] và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể;

(E) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [7], và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể; và

(F) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [7], và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người.

[18] Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được sản xuất bằng phương pháp theo mục [16].

[19] Kháng thể kháng Fn14 ở người được sản xuất bằng phương pháp theo mục [17].

[20] Dược phẩm bao gồm:

kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], [18], và [19]; và

tá dược được dụng.

[21] Dược phẩm bao gồm:

kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [3];

kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục [5]; và

tá dược được dụng.

[22] Dược phẩm bao gồm:

kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [7];

kháng thể kháng Fn14 ở người theo mục [9]; và

tá dược được dụng.

[23] Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [20] đến [22], mà là dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị chứng suy mòn do ung thư.

[24] Phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị chứng suy mòn do ung thư, phương pháp này bao gồm:

 bước dùng lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], [18], và [19].

[25] Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], [18], và [19], mà để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị chứng suy mòn do ung thư.

[26] Sử dụng kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], [18], và [19] để bào chế dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị chứng suy mòn do ung thư.

[27] Dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư hoặc chứng suy mòn do ung thư, bao gồm:

 kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], [18], và [19] làm thành phần hoạt tính,

 trong đó dược phẩm được sử dụng trong tổ hợp với tác nhân chống ung thư.

[28] Dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư hoặc chứng suy mòn do ung thư, bao gồm:

 tác nhân chống ung thư,

 trong đó dược phẩm được sử dụng trong tổ hợp với kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], [18], và [19].

Hiệu quả đạt được của sáng chế

 Kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế hoạt động để ngăn chặn chứng viêm bằng cách ức chế sự hoạt hóa của Fn14 ở người được gây cảm ứng bởi sự kích

thích Tweak mà không thể hiện hoạt tính chủ vận kháng lại Fn14 ở người, và có thể được sử dụng làm tác nhân để ngăn ngừa hoặc điều trị chứng suy mòn do ung thư.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện hiệu quả ức chế của kháng thể kháng Fn14 ở người trong việc sản xuất cytokin IL-8 gây viêm được gây cảm ứng bởi sự kích thích Tweak trong các tế bào A375. Trục tung thể hiện tỷ lệ ức chế (%), và trục hoành thể hiện nồng độ kháng thể (ng/mL).

Fig.2 thể hiện sự tiết IL-8 được gây cảm ứng bởi sự kích thích kháng thể kháng Fn14 ở người trong các tế bào A375 cells. Trục tung thể hiện nồng độ IL-8 (pg/mL), và trục hoành thể hiện nồng độ kháng thể (ng/mL).

Fig.3 thể hiện hiệu quả ức chế của kháng thể kháng Fn14 ở người 4-1m được chuột hóa đối với việc giảm trọng lượng được gây cảm ứng bằng cách cấy ghép các tế bào của dòng tế bào C26 ung thư ruột kết ở chuột nhắt vào các con chuột. Trục tung thể hiện trọng lượng cơ thể (g), và trục hoành thể hiện số ngày đã trôi qua sau khi tiêm tế bào ung thư.

Fig.4 thể hiện hiệu quả ức chế của kháng thể kháng Fn14 ở người 4-1m được chuột hóa đối với việc suy giảm khối lượng cơ được gây cảm ứng bằng cách cấy ghép các tế bào của dòng tế bào C26 ung thư ruột kết ở chuột nhắt vào các con chuột. Trục tung thể hiện trọng lượng (mg) của cơ cẳng chân trước.

Fig.5 thể hiện hiệu quả ức chế của kháng thể kháng Fn14 ở người 4-1m được chuột hóa đối với việc suy giảm ở chức năng cơ được gây cảm ứng bằng cách cấy ghép các tế bào của dòng tế bào C26 ung thư ruột kết ở chuột nhắt vào các con chuột. Trục tung thể hiện độ bền bám (g).

Fig.6 thể hiện hiệu quả của kháng thể kháng Fn14 ở người 4-1m được chuột hóa trong tổ hợp với gemcitabin trong thời gian sống sót của chuột đã được cấy ghép các tế bào của dòng tế bào C26 ung thư ruột kết ở chuột nhắt. Trục tung thể hiện tỷ lệ sống sót (%), và trục hoành thể hiện số ngày trôi qua sau khi tiêm tế bào ung thư.

Fig.7 thể hiện hiệu quả của việc sử dụng kết hợp kháng thể kháng Fn14 ở người 4-1m được chuột hóa với gemcitabin trên thể tích khối thu được tạo thành

bằng cách cấy ghép các tế bào của dòng tế bào C26 ung thư ruột kết ở chuột nhắt vào các con chuột. Trục tung thể hiện thể tích khối u (mm^3), và trục hoành thể hiện số ngày trôi qua sau khi tiêm tế bào ung thư.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả một cách chi tiết.

Có năm lớp IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE trong kháng thể. Cấu trúc cơ sở của phân tử kháng thể được tạo kết cấu có các chuỗi nặng có trọng lượng phân tử từ 50000 đến 70000 và các chuỗi nhẹ có trọng lượng phân tử từ 20000 đến 30000 trong mỗi lớp nói chung. Chuỗi nặng thường chỉ gồm chuỗi polypeptit bao gồm xấp xỉ 440 axit amin, có cấu trúc khác biệt với mỗi lớp, và được gọi là $\text{Ig}\gamma$, $\text{Ig}\mu$, $\text{Ig}\alpha$, $\text{Ig}\delta$, và $\text{Ig}\epsilon$ lần lượt tương ứng với IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE. Hơn nữa, bốn phân lớp của IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 là có mặt trong IgG, và các chuỗi nặng lần lượt tương ứng với chúng được gọi là $\text{Ig}\gamma 1$, $\text{Ig}\gamma 2$, $\text{Ig}\gamma 3$, và $\text{Ig}\gamma 4$. Chuỗi nhẹ thường chỉ gồm chuỗi polypeptit bao gồm 220 axit amin, hai loại trong số chúng, loại L và loại K là đã biết, và được gọi là $\text{Ig}\lambda$ và $\text{Ig}\kappa$. Trong cấu hình peptit ở cấu trúc cơ sở của các phân tử kháng thể, hai chuỗi nặng tương đồng và hai chuỗi nhẹ tương đồng được liên kết bằng các liên kết disulfit (liên kết S-S) và các liên kết không cộng hóa trị, và trọng lượng phân tử của chúng là từ 150000 đến 190000. Hai loại chuỗi nhẹ có thể được bắt cặp với chuỗi nặng bất kỳ. Các phân tử kháng thể lần lượt thường chỉ gồm hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau.

Liên quan đến các liên kết S-S trong chuỗi, bốn liên kết S-S có mặt trong chuỗi nặng (năm trong các chuỗi $\text{Ig}\mu$ và $\text{Ig}\epsilon$) và hai trong số chúng có mặt trong chuỗi nhẹ; một vòng được tạo thành trên mỗi 100 đến 110 gốc axit amin, và cấu trúc không gian là tương tự trong số các vòng và được gọi là đơn vị cấu trúc hoặc miền. Miền nằm ở phía đầu N của cả hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, có trình tự axit amin không đổi thậm chí trong trường hợp mẫu thử từ cùng một lớp (phân lớp) của cùng một loại động vật được gọi là vùng biến đổi, và các miền lần lượt được gọi là vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL). Trình tự axit amin của phía đầu C từ vùng biến đổi là gần như không đổi trong mỗi lớp hoặc phân lớp và

được gọi là vùng ổn định (các miền lần lượt được thể hiện là CH1, CH2, CH3, hoặc CL, một cách lần lượt).

Vị trí gắn kết kháng nguyên được tạo kết cấu VH và VL, và tính đặc hiệu gắn kết phụ thuộc vào trình tự axit amin của vị trí này. Mặt khác, các hoạt tính sinh học như gắn kết với các chất bổ sung và các tế bào biểu hiện thụ thể Fc khác nhau phản ánh sự khác biệt trong các cấu trúc vùng ổn định trong số mỗi lớp Ig. Đã được hiểu rằng sự biến đổi của các vùng biến đổi của các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng là hầu hết là giới hạn ở ba vùng siêu biến nhỏ có mặt trong cả hai chuỗi và các vùng này được gọi là các vùng xác định bổ sung (CDR: CDR1, CDR2, và CDR3 từ phía đầu N). Các phần còn lại của vùng biến đổi được gọi là vùng khung (framework region - FR) và tương đối ổn định.

Các đoạn gắn kết kháng nguyên khác nhau bao gồm VH và VL của kháng thể cũng có hoạt tính gắn kết kháng nguyên, và các ví dụ tiêu biểu về đoạn gắn kết kháng nguyên này gồm có đoạn vùng biến đổi chuỗi đơn (scFv), Fab, Fab', và F(ab')₂. scFv là kháng thể đơn trị mà được tạo kết cấu VH và VL được kết nối với nhau qua liên kết. Fab là đoạn kháng thể đơn trị mà được tạo kết cấu đoạn chuỗi nhẹ và chuỗi nặng bao gồm VH, miền CH1, và một phần của vùng bản lề. Fab' là đoạn kháng thể đơn trị mà được tạo kết cấu đoạn chuỗi nhẹ và chuỗi nặng bao gồm VH, miền CH1, và một phần của vùng bản lề, và phần của vùng bản lề gồm có các gốc xystein được tạo kết cấu liên kết S-S giữa các chuỗi nặng. Đoạn F(ab')₂ là đoạn kháng thể hóa trị hai trong đó hai đoạn Fab' được liên kết bởi liên kết S-S giữa các chuỗi nặng trong vùng bản lề.

<Kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế>

Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế gồm có kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng có các đặc trưng sau đây.

Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 31 đến 35 của SEQ ID NO: 2, CDR2 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 50 đến 65 SEQ ID NO: 2, và CDR3 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 98 đến 114 của SEQ ID NO: 2 và vùng biến đổi chuỗi

nhẹ bao gồm CDR1 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 24 đến 40 của SEQ ID NO: 4, CDR2 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 56 đến 62 của SEQ ID NO: 4, và CDR3 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 95 đến 103 của SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án, kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án, kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế có các đặc tính như được mô tả ở trên, và còn bao gồm vùng ổn định chuỗi nặng và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Đối với vùng ổn định, bất kỳ vùng ổn định của phân lớp nào (ví dụ, Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3, hoặc Ig γ 4 làm vùng ổn định chuỗi nặng, và Ig λ hoặc Ig κ làm vùng ổn định chuỗi nhẹ) có thể được chọn. Theo một phương án, kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế bao gồm vùng ổn định Ig γ 1 ở người làm vùng ổn định chuỗi nặng và vùng ổn định Ig κ ở người làm vùng ổn định chuỗi nhẹ.

Số gốc liên quan đến việc đưa các sự đột biến axit amin vào vùng ổn định của kháng thể được sử dụng theo sáng chế có thể được xác định theo chỉ số EU (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda). L234A và L235A lần lượt là sự thay thế leuxin ở vị trí axit amin 234 và vị trí 235 axit amin bằng alanin trong vùng ổn định Ig γ 1 ở người theo chỉ số EU theo Kabat et al.. Các ví dụ về vùng ổn định Ig γ 1 ở người có các đột biến axit amin ở L234A và L235A gồm có vùng ổn định Ig γ 1 ở người chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 126 đến 455 của SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án, kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế bao gồm chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4.

Đã được biết rằng khi kháng thể được biến hiện trên các tế bào, kháng thể được biến đổi sau khi dịch mã. Các ví dụ về sự biến đổi sau dịch mã gồm có sự

khuyết đoạn lysin ở đầu C của chuỗi nặng bởi carboxypeptidaza, sự biến đổi của glutamin hoặc axit glutamic ở đầu N của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đến axit pyroglutamic bởi sự pyroglutamylat hóa, sự glycosylat hóa, sự oxy hóa, sự khử amit hóa, và glycation, và đã được biết rằng các sự biến đổi sau dịch mã này xảy ra trong các kháng thể kháng thể (Liu H et al., J Phar Sci. 2008, Vol. 97 No. 7, p. 2426-2447).

Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được biến đổi sau dịch mã. Các ví dụ của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế được biến đổi sau dịch mã gồm có các kháng thể kháng Fn14 ở người mà trải qua sự pyroglutamylat hóa ở đầu N của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc sự khuyết đoạn lysin ở đầu C của chuỗi nặng, hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng. Đã được biết rằng trong lĩnh vực kỹ thuật này sự biến đổi sau dịch mã như vậy là do sự pyroglutamylat hóa ở đầu N hoặc sự khuyết đoạn lysin ở đầu C không có bất kỳ ảnh hưởng nào đến hoạt tính của kháng thể (Lyubarskaya Y et al., Anal Biochem. 2006, Vol. 348, p. 24-39).

Theo một phương án, kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế gồm có kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được tạo thành bởi sự biến đổi sau dịch mã của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án, sự biến đổi sau dịch mã là sự pyroglutamylat hóa ở đầu N của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc sự khuyết đoạn lysin ở đầu C của chuỗi nặng.

Theo một phương án, kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2, trong đó glutamin của axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 được biến đổi thành axit

pyroglutamic, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án, kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế được tạo thành bởi sự biến đổi sau dịch mã của kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4, và sự biến đổi sau dịch mã là sự pyroglutamyl hóa ở đầu N của chuỗi nặng và/hoặc sự khuyết đoạn lysin ở đầu C của chuỗi nặng.

Theo một phương án, kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế bao gồm chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 454 của SEQ ID NO: 2, trong đó glutamin của axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 được biến đổi thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin của axit amin số 4.

Theo một phương án, đoạn gắn kết kháng nguyên theo sáng chế là scFv, Fab, Fab', hoặc F(ab')₂.

Bất kỳ người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể điều chế dạng dung hợp mà trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được dung hợp với peptit hoặc protein khác, hoặc cũng có thể điều chế dạng biến đổi mà trong đó tác nhân biến đổi được liên kết dựa vào sáng chế, và kháng thể theo sáng chế cũng gồm có các dạng này của các kháng thể hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng. Các peptit hoặc protein khác sử dụng để dung hợp không bị giới hạn cụ thể ở dạng dung hợp gắn kết với Fn14, và các ví dụ của chúng gồm có albumin huyết thanh ở người, các peptit thể khác nhau, peptit mô tếp xoắn nhân tạo, các protein gắn kết maltoza, glutathion S transferaza, các chất độc khác nhau, và các peptit hoặc protein khác có khả năng thúc đẩy sự đa trùng hợp. Tác nhân biến đổi được sử dụng cho biến đổi không bị giới hạn đặc biệt miễn là dạng biến đổi gắn kết với Fn14, và các ví dụ của chúng gồm có polyetylen glycol, chuỗi đường, các phospholipit, các liposom, và các hợp chất phân tử thấp.

Theo một phương án, tác nhân biến đổi được sử dụng cho sự biến đổi của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế là polyetylen glycol.

“Kháng thể kháng Fn14 ở người” theo sáng chế có nghĩa là kháng thể gắn kết với Fn14 ở người. Có thể xác định liệu kháng thể kháng Fn14 ở người có gắn kết với Fn14 ở người hay không bằng cách sử dụng phương pháp đo hoạt tính gắn kết đã biết. Các ví dụ về phương pháp đo hoạt tính gắn kết gồm có Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - ELISA). Trong trường hợp sử dụng ELISA, ví dụ, protein Fn14 ở người được cố định trên đĩa và kháng thể thí nghiệm được bổ sung vào đó để phản ứng. Sau khi phản ứng, kháng thể thứ cấp như kháng thể kháng IgG, được đánh dấu bằng enzym như peroxidaza từ cây cải ngựa (horseradish peroxidase - HRP), được phản ứng. Sau khi phản ứng, bước rửa được thực hiện, và sau đó nó có thể xác nhận xem liệu kháng thể thí nghiệm có gắn kết với Fn14 ở người hay không bằng cách xác định sự gắn kết của kháng thể thứ cấp thông qua phép đo hoạt tính bằng cách sử dụng thuốc thử phát hiện hoạt tính (ví dụ, trong trường hợp đánh dấu HRP labeling, TMB Microwell Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., 50-76-03)). Như là phương pháp đo đặc hiệu, phương pháp mô tả trong Ví dụ 6 sau đây có thể được sử dụng.

Bên cạnh việc gắn kết với Fn14 ở người, kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế gồm có kháng thể gắn kết với Fn14 có nguồn gốc từ các động vật khác (ví dụ, chuột nhắt Fn14), cũng như kháng thể gắn kết với Fn14 ở người.

Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế có thể dễ dàng điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, dựa trên thông tin trình tự trên chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế, mà được bộc lộ ở bản mô tả sáng chế. Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể, và có thể được sản xuất theo phương pháp được mô tả trong phần <Phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế, và kháng thể kháng Fn14 được sản xuất bằng phương pháp> sẽ được mô tả sau đây.

Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế được tinh thể thêm khi cần thiết, được bào chế theo phương pháp thông thường, và có thể được sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh viêm

nhiễm như sự tạo mạch quá mức hoặc các bệnh suy nhược như chứng giảm cân, suy nhược cơ bắp, và chứng suy mòn.

<Polynucleotit theo sáng chế>

Polynucleotit theo sáng chế gồm có polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế.

Theo một phương án, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế là polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2.

Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện bằng trình tự axit amin của các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2 gồm có polynucleotit bao gồm trình tự bazơ của các bazơ từ số 1 đến 375 của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2.

Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2 gồm có polynucleotit bao gồm trình tự bazơ được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID NO: 4.

Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID

NO: 4 gồm có polynucleotit bao gồm trình tự bazơ của các bazơ từ số 1 đến 342 của SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án, polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4.

Các ví dụ về polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4 gồm có polynucleotit bao gồm trình tự bazơ được thể hiện bằng SEQ ID NO: 3.

Polynucleotit theo sáng chế có thể dễ dàng điều chế bởi known by a người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực dựa trên trình tự bazơ. Ví dụ, polynucleotit theo sáng chế có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp gen đã biết trong lĩnh vực này. Đối với phương pháp tổng hợp gen, các phương pháp khác nhau như phương pháp tổng hợp các gen kháng thể được mô tả trong WO90/07861 đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể sử dụng.

<Vector biểu hiện theo sáng chế>

Vector biểu hiện theo sáng chế gồm có vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế, và/hoặc polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế.

Theo một phương án, các ví dụ về vector biểu hiện theo sáng chế gồm có vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế, vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế, và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể.

Các vector biểu hiện được sử dụng để biểu hiện polynucleotit theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể như polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và/hoặc polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế có thể được biểu hiện ở các tế bào chủ khác nhau như các tế bào nhân chuẩn (ví dụ, các tế bào động vật, các tế bào côn trùng, các tế bào thực vật, và nấm men) và/hoặc các tế bào nhân sơ (ví dụ, *Escherichia coli*), và các polypeptit mã hóa bởi chúng có thể được sản xuất. Các ví dụ về vector biểu hiện gồm có các vector plasmit và các vector virus (ví dụ, adenovirus hoặc retrovirus). Ví dụ, pEE6.4 hoặc pEE12.4 có thể được sử dụng. Gen kháng thể cũng có thể được biểu hiện bằng cách đưa phân đoạn gen biến đổi vào vector biểu hiện đã có gen vùng ổn định Ig ở người như AG- γ 1 và AG- κ (ví dụ, xem WO94/20632).

Vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm promotor mà liên kết hoạt động với polynucleotit theo sáng chế. Các ví dụ về promotor để biểu hiện polynucleotit theo sáng chế với tế bào động vật gồm có promotor có nguồn gốc virus như CMV, RSV, hoặc SV40, promotor actin, promotor EF (yếu tố kéo dài) 1 α , và promotor sốc nhiệt. Các ví dụ về promotor để biểu hiện polynucleotit theo sáng chế bởi vi khuẩn (ví dụ, *Escherichia*) gồm có promotor trp, promotor lac, λ promotor PL, và promotor tac. Hơn nữa, các ví dụ về promotor để biểu hiện polynucleotit theo sáng chế bằng nấm men gồm có promotor GAL1, promotor GAL10, promotor PH05, promotor PGK, promotor GAP, và promotor ADH.

Trong trường hợp sử dụng tế bào động vật, tế bào côn trùng, hoặc nấm men làm tế bào chủ, vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm codon khởi đầu và codon chặn cuối. Trong trường hợp này, vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm trình tự tăng cường, vùng chưa dịch mã trên phía 5' side và phía 3' của các gen mã hóa kháng thể theo sáng chế hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng, trình tự báo hiệu bài tiết, điểm nối, điểm polyadenyl hoá, hoặc đơn vị có thể tái tạo. Trong trường hợp mà *Escherichia coli* được sử dụng làm vật chủ, vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm codon khởi đầu, codon chặn

cuối, vùng chặn cuối, và đơn vị có thể tái tạo. Trong trường hợp này, vector biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm chỉ thị lựa chọn (ví dụ, các gen kháng tetracyclin, các gen kháng ampicillin, các gen kháng kanamycin, các gen kháng neomycin, hoặc các gen ihydrofolat reductaza mà thường được sử dụng theo mục đích.

<Tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế>

Các ví dụ về tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế gồm có tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế gồm có tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo sáng chế, mà được chọn từ nhóm chỉ gồm mục từ (a) đến (d) sau đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng;

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế; và

(d) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế.

Theo một phương án, tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế gồm có tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện theo sáng chế, mà được chọn từ nhóm group chỉ gồm mục từ (e) đến (h) sau đây:

(e) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể;

(f) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể;

(g) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế; và

(h) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế.

Tế bào chủ được biến nạp không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là tế bào chủ là thích hợp với vector biểu hiện được sử dụng, được biến nạp với vector biểu hiện, và có thể biểu hiện kháng thể. Các ví dụ về tế bào chủ được biến nạp gồm có các tế bào khác nhau như các tế bào tự nhiên hoặc các tế bào được thiết lập nhân tạo mà thường được sử dụng trong lĩnh vực theo sáng chế (ví dụ, các tế bào động vật (ví dụ, các tế bào CHO-K1SV), các tế bào côn trùng (ví dụ, Sf9), vi khuẩn (ví dụ, Escherichia), nấm men (ví dụ, Saccharomyces hoặc Pichia) và dạng tương tự). Ví dụ, các tế bào được nuôi cấy như các tế bào CHO (tế bào CHO-K1SV và tế bào CHO-DG44), các tế bào 293, và các tế bào NS0 có thể được sử dụng.

Phương pháp biến nạp tế bào chủ không bị giới hạn một cách cụ thể, và, ví dụ, phương pháp canxi phosphat hoặc phương pháp electroporation có thể được sử dụng.

<Phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế, và kháng thể kháng Fn14 ở người sản xuất bằng phương pháp này>

Phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế gồm có phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm chỉ gồm mục (A) đến (C) sau đây để biểu hiện kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng:

(A) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng;

(B) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng; và

(C) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một phương án, phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế gồm có phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm chỉ gồm mục (D) đến (F) sau đây để biểu hiện kháng thể kháng Fn14 ở người:

(D) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể;

(E) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng

chế và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể; và

(F) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể.

Phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là phương pháp bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng. Theo một phương án, các ví dụ về tế bào chủ được sử dụng trong phương pháp gồm có các tế bào chủ của mục (A) đến (D) được mô tả ở trên.

Tế bào chủ được biến nạp có thể được nuôi cấy bằng phương pháp đã biết. Các điều kiện nuôi cấy, ví dụ, nhiệt độ, độ pH của môi trường nuôi cấy, và thời gian nuôi cấy được chọn thích hợp. Trong trường hợp mà tế bào chủ là tế bào động vật, các ví dụ về môi trường nuôi cấy gồm có môi trường nuôi cấy MEM được bổ sung khoảng 5% đến 20% huyết thanh thai bò (Eagle H, Science. 1959, Vol. 130, No. 3373, p. 432-437), môi trường nuôi cấy DMEM (Dulbecco R và Freeman G, Virology. 1959, Vol. 8, p. 396-397), môi trường nuôi cấy RPMI1640 (Moore GE et al., J Am Med Assoc. 1967, Vol. 199, p. 519), và môi trường nuôi cấy 199 (Morgan JF et al., Proc Soc Exp Biol Med. 1950, Vol. 73, p. 1-8). Độ pH của môi trường nuôi cấy tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6 đến 8, và việc nuôi cấy thường được thực hiện ở khoảng 30°C đến 40°C trong khoảng từ 15 đến 336 giờ trong điều kiện thông gió hoặc khuấy tùy ý. Trong trường hợp mà tế bào chủ là tế bào côn trùng, có thể sử dụng làm môi trường nuôi cấy, ví dụ, môi trường nuôi cấy Grace's (Smith GE et al., Proc Natl Acad Sci USA., 1985, Vol. 82, p. 8404) được bổ sung huyết thanh thai bò. Độ pH của môi trường nuôi cấy tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 8, và việc nuôi cấy thường được thực hiện ở khoảng 20°C đến 40°C trong khoảng 15 giờ đến 100 giờ trong điều kiện thông gió hoặc khuấy tùy ý. Trong trường hợp mà tế bào chủ là *Escherichia coli* hoặc nấm men, làm môi trường nuôi cấy, ví dụ, môi trường nuôi cấy lỏng được bổ sung nguồn dinh dưỡng là thích hợp. Môi trường nuôi cấy

đinh dưỡng tốt hơn là gồm có nguồn cacbon, nguồn nitơ vô cơ, hoặc nguồn nitơ hữu cơ cần thiết cho sự phát triển của tế bào chủ được biến nạp. Các ví dụ về nguồn cacbon gồm có glucosơ, dextran, tinh bột hòa tan, và sucrosơ và các ví dụ về nguồn nitơ vô cơ hoặc nguồn nitơ hữu cơ gồm có các muối amoni, các muối nitrat, các axit amin, rượu ngâm ngô, pepton, casein, dịch chiết thịt, bột đậu nành, và dịch chiết cà chua. Các chất dinh dưỡng khác (ví dụ, các muối vô cơ (ví dụ, canxi clorua, natri dihydro phosphat, và magie clorua), các vitamin), và các chất kháng sinh (ví dụ, tetracyclin, neomycin, ampicillin, và kanamycin) có thể được gồm có trong đó như mong muốn. Độ pH của môi trường nuôi cấy tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 8. Trong trường hợp mà tế bào chủ là *Escherichia coli*, ví dụ, môi trường nuôi cấy LB hoặc môi trường nuôi cấy M9 (Mol. Clo., Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, Vol. 3, A2.2) có thể tốt hơn là được sử dụng làm môi trường nuôi cấy. Việc nuôi cấy thường được thực hiện ở khoảng 14°C đến 39°C trong khoảng từ 3 đến 24 giờ trong điều kiện thông khí hoặc khuấy tùy ý. Trong trường hợp mà tế bào chủ là nấm men, ví dụ, môi trường tối thiểu Burkholder (Bostian KA et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1980, Vol. 77, p. 4504-4508) có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy. Việc nuôi cấy thường được thực hiện ở khoảng 20°C đến 35°C trong khoảng từ 14 đến 144 giờ trong điều kiện thông khí hoặc khuấy tùy ý. Bằng cách thực hiện việc nuôi cấy theo cách được mô tả ở trên, có thể biểu hiện kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế.

Phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế còn có thể bao gồm, ngoài bước nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp theo sáng chế để biểu hiện kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng, còn bước hồi phục, ví dụ, phân lập và tinh chế kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng từ tế bào chủ được biến nạp và/hoặc dịch nuôi cấy. Các ví dụ về phương pháp phân lập và tinh chế gồm có các phương pháp sử dụng tính hòa tan như phương pháp tách muối và phương pháp kết tủa dung môi, các phương pháp sử dụng sự khác biệt về trọng lượng như thẩm tách, siêu lọc, và lọc gel, các phương pháp sử dụng điện tích như sắc ký trao đổi ion và sắc ký hydroxylapatit, các phương pháp sử dụng ái lực đặc hiệu như sắc ký ái lực, các phương pháp sử dụng sự khác biệt về tính kỵ nước

như sắc ký hiệu năng cao pha đảo, và các phương pháp sử dụng sự khác biệt về điểm đẳng điện như điện di tập trung đẳng điện. Ví dụ, kháng thể tích tụ trong dịch nuôi cấy có thể được tinh chế bằng các phương pháp sắc ký khác nhau, ví dụ, sắc ký cột sử dụng cột Protein A hoặc cột Protein G.

Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế cũng gồm có kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được sản xuất bằng phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế.

<Dược phẩm theo sáng chế>

Dược phẩm theo sáng chế gồm có dược phẩm bao gồm kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế, và tá dược được dùng. Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng phương pháp thường được sử dụng với các tá dược, mà là, các tá dược dùng cho thuốc hoặc các chất mang dùng cho thuốc thường được sử dụng trong lĩnh vực này. Các ví dụ về các dạng liều lượng của các dược phẩm gồm có thuốc dùng ngoài đường tiêu hóa như thuốc tiêm và thuốc truyền nhỏ giọt, và các loại thuốc này có thể được dùng qua đường tiêm truyền tĩnh mạch, dùng qua đường tiêm truyền dưới da, dùng qua đường tiêm truyền trong cơ, hoặc dạng tương tự. Trong chế phẩm thuốc, các tá dược, các chất mang, và các chất phụ trợ theo các dạng liều lượng có thể được sử dụng trong phạm vi dược dụng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm nhiều loại kháng thể kháng Fn14 ở ngoài hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Ví dụ, sáng chế cũng gồm có dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng mà không biến đổi sau khi dịch mã, và kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được tạo thành bởi sự biến đổi sau dịch mã của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế bao gồm kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng cũng gồm có dược phẩm sau đây.

Dược phẩm bao gồm kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit

amin có các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID NO: 4, và kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được tạo thành bởi sự biến đổi sau dịch mã của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

Dược phẩm theo sáng chế cũng gồm có dược phẩm bao gồm kháng thể trong đó lysin ở đầu C của chuỗi nặng là bị loại bỏ, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được biến đổi sau khi dịch mã ở đầu N, kháng thể trong đó lysin ở đầu C của chuỗi nặng là bị loại bỏ và được biến đổi sau khi dịch mã ở đầu N, và/hoặc kháng thể mà có lysin ở đầu C của chuỗi nặng và không bị biến đổi sau dịch mã ở đầu N.

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế bao gồm kháng thể kháng Fn14 ở người cũng gồm có dược phẩm bao gồm hai hoặc nhiều loại kháng thể kháng Fn14 ở người trong số mục từ (5) đến (8) sau đây:

(5) kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 454 của SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4.

(6) kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2, trong đó glutamin của axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 được biến đổi thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4.

(7) kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 454 của SEQ ID NO: 2, trong đó glutamin của axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 được biến đổi thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4.

(8) kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế bao gồm kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng cũng gồm có dược phẩm sau đây. Dược phẩm bao gồm kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm chuỗi nặng

chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4, kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 454 của SEQ ID NO: 2, trong đó glutamin của axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 được biến đổi thành axit pyroglutamic, và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4, và tá được được dụng.

Lượng kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế sẽ được bổ sung vào chế phẩm thay đổi phụ thuộc vào mức độ của các triệu chứng của bệnh nhân, độ tuổi của bệnh nhân, dạng liều lượng của thuốc được sử dụng, độ chuẩn gắn kết của kháng thể, hoặc các yếu tố tương tự, và ví dụ, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng ở lượng nằm trong khoảng từ 0,001 mg/kg đến 100 mg/kg trong suốt quá trình sử dụng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng làm tác nhân ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh như chứng suy mòn do ung thư trong đó Fn14 ở người hoạt động có liên quan đến tác nhân gây bệnh.

Sáng chế gồm có dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị chứng suy mòn do ung thư, bao gồm kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Ngoài ra, sáng chế gồm có phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa chứng suy mòn do ung thư, bao gồm bước dùng lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Ngoài ra, sáng chế gồm có kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị chứng suy mòn do ung thư. Ngoài ra, sáng chế gồm có việc sử dụng kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế để bào chế dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị chứng suy mòn do ung thư.

Sáng chế đề cập đến dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư hoặc chứng suy mòn do ung thư, mà bao gồm kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và được sử dụng trong tổ hợp với tác nhân chống ung thư. Sáng chế đề cập đến phương pháp để ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư hoặc chứng suy mòn do ung thư, mà bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu

của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và tác nhân chống ung thư. Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế mà được sử dụng trong tổ hợp với tác nhân chống ung thư để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư hoặc chứng suy mòn do ung thư. Sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế để bào chế được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư hoặc chứng suy mòn do ung thư, và việc sử dụng được phẩm trong tổ hợp với tác nhân chống ung thư.

Sáng chế đề cập đến được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư hoặc chứng suy mòn do ung thư, mà bao gồm tác nhân chống ung thư và được sử dụng trong tổ hợp với kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Sáng chế đề cập đến tác nhân chống ung thư mà được sử dụng trong tổ hợp với kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế để sử dụng trong ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư hoặc chứng suy mòn do ung thư. Sáng chế đề cập đến việc sử dụng tác nhân chống ung thư để bào chế được phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư hoặc chứng suy mòn do ung thư, và việc sử dụng được phẩm trong tổ hợp với kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế.

Theo một phương án, tác nhân chống ung thư được sử dụng theo sáng chế là gemcitabin.

Để hiểu rõ hơn về sáng chế, các ví dụ cụ thể được đề cập đến sẽ được cung cấp, nhưng đây chỉ là các ví dụ và sáng chế không bị giới hạn trong đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Liên quan đến các phần sử dụng các bộ kit hoặc các thuốc thử có sẵn trên thị trường, các thí nghiệm được thực hiện theo quy trình kèm theo trừ khi có lưu ý khác đi.

(Ví dụ 1: Thu nhận các protein dung hợp Fn14-Fc ở người và chuột nhắt)

Các tác giả sáng chế điều chế protein dung hợp Fn14-Fc ở người và protein dung hợp Fn14-Fc ở chuột nhắt để sử dụng làm kháng nguyên để thu nhận kháng thể kháng Fn14 và nguyên liệu được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc. Protein

dung hợp Fn14-Fc ở người là protein dung hợp trong đó đầu C của trình tự ngoại bào một phần của trình tự Fn14 ở người (các axit amin từ số 1 đến 79 của số truy cập NCBI: NP_057223.1) và đầu N của vùng Fc ở người (các axit amin từ số 106 đến 330 của NCBI số truy cập NCBI: P01857.1) được liên kết với liên kết peptit (SEQ ID NO: 9). Protein dung hợp Fn14-Fc ở chuột nhất là protein dung hợp trong đó đầu C của trình tự ngoại bào một phần của trình tự Fn14 ở chuột nhất (các axit amin số từ 1 đến 75 của số truy cập NCBI: AAF07882.1) và đầu N của vùng Fc ở chuột nhất là được liên kết, và cụ thể là, protein dung hợp trong đó các gen mã hóa trình tự ngoại bào một phần của trình tự Fn14 ở chuột nhất là được kết hợp vào vị trí tách đa dòng giữa vùng promoter hEF1-HTLV và vùng mIgG2B-Fc của pFUSE-mIgG2B-Fc1 (InvivoGen, pfuse-mg2bfc1) sử dụng các enzym giới hạn EcoRI và EcoRV và được biểu hiện. Các vector biểu hiện trong đó các gen mã hóa các protein dung hợp được mô tả ở trên được kết hợp vào trong vector GS pEE12.4 (Lonza) được chuẩn bị và lần lượt đưa vào trong các tế bào CHO-K1SV (Lonza). Mỗi protein dung hợp Fn14-Fc ở người và protein dung hợp Fn14-Fc ở chuột nhất được tinh chế từ dịch nuôi cấy của các tế bào CHO-K1SV theo phương pháp thông thường.

(Ví dụ 2: Thu nhận kháng thể kháng Fn14 ở người)

Kháng thể được chuẩn bị bằng cách sử dụng kỹ thuật phát triển kháng thể đơn dòng ở người “VelocImmune” (kỹ thuật kháng thể VelocImmune: Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (US Patent No. 6596541)) trên chuột nhất. Kháng thể thu được bằng kỹ thuật VelocImmune là kháng thể (cũng được gọi là kháng thể chimeric) có vùng biến đổi của kháng thể ở người và vùng ổn định của kháng thể ở chuột nhất. Chuột VelocImmune được tạo miễn dịch với chất phụ trợ để tạo ra phản ứng miễn dịch cùng với protein Fn14 ở người trong đó vùng Fc ở người được cắt và loại bỏ khỏi protein dung hợp Fn14-Fc ở người được chuẩn bị trong Ví dụ 1 sử dụng FabRICATOR (Sigma, 77661). Các tế bào bạch huyết thu được từ hạch bạch huyết của chuột nhất đã được tạo miễn dịch được dung hợp với các tế bào u tủy có nguồn gốc từ chuột nhất SP2/0-Ag14 (ATCC: CRL-1581) theo phương pháp thông thường để điều chế các hybridoma, và các hybridoma được tạo kháng thể đơn dòng. Các hybridoma sản xuất kháng thể, mà gắn kết với Fn14 ở người và ngăn chặn sự

hoạt động NFkB được gây cảm ứng bởi sự kích thích Tweak (sau đây, được gọi là “hoạt tính NFkB được gây cảm ứng bởi Tweak” trong các Ví dụ sau đây), được chọn, và kháng thể được tinh chế.

(Ví dụ 3: Xét nghiệm hoạt tính NFkB)

Để đánh giá hoạt động chủ vận của kháng thể được tìm thấy trong Ví dụ 2 ở Fn14 ở người, hoạt động của kháng thể với sự hoạt hóa NFkB không có Tweak được đánh giá bằng xét nghiệm thông báo. Cụ thể là, các tế bào HEK293 (ATCC, CRL-1573) trong vector thông báo luciferaza pGL4.32 (Promega K.K., E8491) có yếu tố đáp ứng phiên mã NFkB kết hợp vào trong đó đã được cấy vào một cách ổn định (sau đây, được gọi là các tế bào NFkB/HEK293) được điều chế và sử dụng để đánh giá.

Các tế bào NFkB/HEK293 được tạo huyền phù trong DMEM chỉ gồm huyết thanh thai bò 10% (Sigma, D6429) ở mức $1,25 \times 10^5$ tế bào/mL, và được gieo ở mức 80 μ L/giếng ở đĩa 96 giếng đáy sạch (Corning Incorporated, 3610). Sau khi nuôi cấy 2 giờ trong tủ áp được cài đặt ở 37°C với khí quyển CO₂ 5%, chuỗi pha loãng 12 bước đối với kháng thể đã được tinh chế thu được trong Ví dụ 2 được chuẩn bị trong môi trường nuôi cấy nêu trên với tỷ lệ chung khoảng 3 lần từ nồng độ cuối từ 1 ng/mL đến 300 μ g/mL, và sau đó thêm ở mức 20 μ L/giếng. Sau khi nuôi cấy qua đêm ở 37°C với CO₂ 5%, sự biểu hiện luciferaza được đo bằng cách sử dụng Hệ xét nghiệm Luciferaza dùng thuốc thử đo lường luciferaza ONE-Glo (Promega Corporation) để định lượng sự hoạt hóa NFkB.

Kết quả là, kháng thể kháng Fn14 ở người mà không gây cảm ứng với sự hoạt hóa NFkB, tức là, không biểu hiện hoạt tính chủ vận, được chọn và đặt tên là 4-1.

(Ví dụ 4: Điều chế kháng thể được nhân hóa và kháng thể được chuột hóa hoàn toàn)

Các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được tách dòng từ các hybridoma sản xuất kháng thể được chọn trong Ví dụ 3, và trình tự được xác định. Sau khi xác định trình tự kháng thể, các gen mã hóa các trình tự báo hiệu (Wittle N et al., Protein Engineering. 1987, Vol. 1, No. 6, p. 499-505) và các gen vùng ổn định Igy1 ở người (chỉ gồm trình tự bazơ của các bazơ số 376 đến 1365 của

SEQ ID NO: 1) có các đột biến axit amin ở L234A và L235A được lần lượt gắn vào phía 5' và phía 3' của các gen vùng biến đổi chuỗi nặng, và các gen chuỗi nặng được đưa vào vector GS pEE6.4 (Lonza). Ngoài ra, các gen mã hóa các trình tự báo hiệu (Wittle N et al., Protein Engineering. 1987, Vol. 1, No. 6, p. 499-505) và các gen vùng ổn định (chỉ gồm trình tự bazơ của các bazơ số 343 đến 660 của SEQ ID NO: 3) của chuỗi κ ở người được lần lượt gắn vào phía 5' và phía 3' của các gen vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và các gen chuỗi nhẹ được đưa vào vector GS pEE12.4. Các vector GS này được trải qua quá trình phân đoạn enzym giới hạn bằng NotI-HF và PvuI-HF, và được gắn bằng cách sử dụng Kit gắn ADN <Mighty Mix> (Takara Bio Inc., 6023) để tạo thành vector GS trong đó cả các gen chuỗi nặng và các gen chuỗi nhẹ được đưa vào. Kháng thể được tinh chế theo phương pháp thông thường từ dịch nuôi cấy của các tế bào CHO-K1SV thu được bằng cách gây nhiễm vector, và do đó kháng thể được nhân hóa hoàn toàn 4-1 được thu nhận và đặt tên là 4-1h.

Trình tự bazơ của chuỗi nặng 4-1h đã được điều chế được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, do vậy, trình tự axit amin mã hóa được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2, trình tự bazơ của chuỗi nhẹ được thể hiện bằng SEQ ID NO: 3, và do vậy, trình tự axit amin mã hóa được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4. Vùng biến đổi của chuỗi nặng được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2 chỉ gồm trình tự axit amin của các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4 chỉ gồm trình tự axit amin của các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID NO: 4. CDR1, CDR2, và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng của 4-1h lần lượt chỉ gồm các trình tự axit amin của các axit amin từ số 31 đến 35, 50 đến 65, và 98 đến 114 của SEQ ID NO: 2. CDR1, CDR2, và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 4-1h lần lượt chỉ gồm các trình tự axit amin của các axit amin từ số 24 đến 40, 56 đến 62, và 95 đến 103 của SEQ ID NO: 4.

Kháng thể chuột hóa của 4-1h (sau đây, được gọi là 4-1m) được chuẩn bị để làm giảm nguy cơ sinh miễn dịch trong đánh giá kháng thể kháng Fn14 ở người bằng chuột nhắt trong thí nghiệm in vivo. Trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi của 4-1m được chuẩn bị bằng cách thế một phần vùng khung (framework region - FR) của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của 4-1h bằng FR của các kháng thể chuột nhắt.

[0086]

4-1m thu được bằng cách sử dụng phương pháp giống như phương pháp tạo thành vector, sự biểu hiện kháng thể, và sự tinh chế đối với 4-1h được mô tả ở trên. Đối với vùng ổn định của chuỗi nặng, các gen mã hóa các gen vùng ổn định Igγ2a ở chuột nhắt (chỉ gồm trình tự bazơ của các bazơ từ số 376 đến 1365 của SEQ ID NO: 5) có đột biến axit amin D265A được sử dụng, và đối với vùng ổn định của chuỗi nhẹ, các gen vùng ổn định (chỉ gồm trình tự bazơ của các bazơ từ số 343 đến 660 của SEQ ID NO: 7) của chuỗi κ ở chuột nhắt được sử dụng.

Trình tự bazơ của chuỗi nặng của 4-1m đã được chuẩn bị được thể hiện bằng SEQ ID NO: 5, do vậy, trình tự axit amin mã hóa được thể hiện bằng SEQ ID NO: 6, trình tự bazơ của chuỗi nhẹ được thể hiện bằng SEQ ID NO: 7, và do vậy, trình tự axit amin mã hóa được thể hiện bằng SEQ ID NO: 8. Vùng biến đổi của chuỗi nặng được thể hiện bằng SEQ ID NO: 6 chỉ gồm trình tự axit amin của các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 6, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được thể hiện bằng SEQ ID NO: 8 chỉ gồm trình tự axit amin của các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID NO: 8. CDR1, CDR2, và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng của 4-1m lần lượt chỉ gồm các trình tự axit amin của các axit amin từ số 31 đến 35, 50 đến 65, và 98 đến 114 của SEQ ID NO: 6. CDR1, CDR2, và CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 4-1m lần lượt chỉ gồm các trình tự axit amin của các axit amin từ số 24 đến 40, 56 đến 62, và 95 đến 103 của SEQ ID NO: 8.

(Ví dụ 5: Phân tích biến đổi axit amin của kháng thể được nhân hóa hoàn toàn)

4-1h được tinh chế được đưa vào phân tích biến đổi axit amin, và kết quả là, hầu hết các kháng thể được tinh chế đều có sự pyroglutamyl hóa ở đầu N của chuỗi nặng và sự khuyết đoạn lysin ở đầu C.

(Ví dụ 6: ELISA gắn kết Fn14 ở người và ở chuột nhắt của kháng thể được nhân hóa và kháng thể được chuột hóa hoàn toàn)

Các hoạt tính gắn kết của 4-1h và 4-1m thu nhận được trong Ví dụ 4 đến protein Fn14 được đánh giá. Protein dung hợp Fn14-Fc ở người và protein dung hợp Fn14-Fc ở chuột nhắt được thu nhận trong Ví dụ 1 được pha loãng trong nước muối đệm (phosphate buffered saline - PBS) ở 1 µg/mL và được thêm vào đĩa trong suốt 384 giếng MaxiSorp (Nunc, 464718) ở mức 15 µL/giếng. Quá trình ủ được thực

hiện qua đêm ở 4°C để cố định. Vào ngày hôm sau, chất lỏng pha rắn được loại bỏ, và quá trình rửa được thực hiện bằng nước muối đệm Tris chỉ gồm Tween-20 0,05% (Tween-20-containing Tris-buffered saline - TBS-T). PBS chỉ gồm Blocking One 20% (Nacalai tesque, Inc., 03953-95) được thêm vào đó ở mức 50 μ L/giếng. Chất kết quả được để ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, và sau đó được rửa bằng TBS-T. Các chuỗi pha loãng 4-1h hoặc 4-1m được thu nhận trong Ví dụ 4 được chuẩn bị bằng cách pha loãng trong 12 bước ở tỷ lệ chung gấp 4 lần từ nồng độ tối đa ở 30 μ g/mL bằng cách sử dụng TBS-T chỉ gồm Blocking One 5% (sau đây, được gọi là chất pha loãng), và được bổ sung vào ở mức 20 μ L/giếng. Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, quá trình rửa được thực hiện bằng TBS-T. Kháng thể chuỗi nhẹ kháng kappa ở người được đánh dấu bằng peroxidaza từ cây cải ngựa (SouthernBiotech, 2060-05) làm kháng thể thứ cấp được pha loãng 5000 lần bằng chất pha loãng được bổ sung ở mức 20 μ L/giếng để phát hiện 4-1h, và kháng thể chuỗi nhẹ kháng kappa ở chuột nhắt được đánh dấu bằng peroxidaza từ cây cải ngựa (SouthernBiotech, 1050-05) là, kháng thể thứ cấp được pha loãng 4000 lần bằng chất pha loãng được bổ sung ở mức 20 μ L/giếng để phát hiện 4-1m. Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, quá trình rửa được thực hiện bằng TBS-T. Chất nền Peroxidaza TMB Microwell (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., 50-76-03) được thêm vào, và chất kết quả được để trong 3 phút để đánh giá 4-1h, hoặc để trong 5 phút để đánh giá 4-1m. Sau đó, dừng phản ứng bằng cách thêm vào axit sulfuric 2M, và độ hấp thụ ở 450 nm được đo bằng SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, LLC). Thí nghiệm được thực hiện hai lần, và các trị số EC₅₀ được tính toán bằng đường cong logistic 4 tham số.

Kết quả là, 4-1h và 4-1m được chuẩn bị trong Ví dụ 4 được xác nhận để có hoạt tính gắn kết với Fn14 ở người và Fn14 ở chuột nhắt (Bảng 1).

Bảng 1: Các hoạt tính gắn kết của 4-1h và 4-1m với Fn14 ở người và Fn14 ở chuột nhắt

[Bảng 1]

Tên kháng thể	EC ₅₀ (ng/mL)	
	Ở người	Ở chuột nhắt
4-1h	30,4	23,2

4-1h	18,2	16,5
------	------	------

(Ví dụ 7: Xét nghiệm ức chế sự hoạt hóa NFkB được gây cảm ứng bởi Tweak đối với kháng thể nhân hóa hoàn toàn)

Để đánh giá hoạt tính đối kháng của 4-1h được thu nhận trong Ví dụ 4 kháng lại Fn14, hoạt động ức chế sự hoạt hóa NFkB được gây cảm ứng bởi Tweak được đánh giá bằng xét nghiệm thông báo.

Các tế bào NFkB/HEK293 được chuẩn bị trong Ví dụ 3 được tạo huyền phù trong DMEM chỉ gồm huyết thanh thai bò 10% ở mức $1,25 \times 10^5$ tế bào/mL, và được gieo ở mức 80 μ L/giếng trong đĩa 96 giếng màu trắng đáy sạch. Sau khi nuôi cấy qua đêm ở 37°C bằng CO₂ 5%, chuỗi pha loãng 11 của 4-1h thu được trong Ví dụ 4 được chuẩn bị trong môi trường nuôi cấy nêu trên với tỷ lệ chung gấp 3 lần từ nồng độ cuối từ 0,1 ng/mL đến 10 μ g/mL, và sau đó được thêm vào ở mức 10 μ L/giếng. Sau khi nuôi cấy trong 30 phút ở 37°C bằng CO₂ 5%, 10 μ L Tweak (PeproTech, Inc., 310-06) được thêm vào sao cho nồng độ cuối là 100 ng/mL. Sau khi nuôi cấy trong 5 giờ ở 37°C bằng CO₂ 5%, sự hoạt hóa NFkB được định lượng theo phương pháp trong Ví dụ 3. Nhóm mà trong đó chỉ môi trường nuôi cấy không có kháng thể được thêm vào được thiết lập làm nhóm đối chứng, nhóm thêm Tweak vào được xác định là độ ức chế 0%, và nhóm thêm không phải là Tweak vào được xác định là độ ức chế 100% để tính toán nồng độ ức chế 50% (giá trị IC₅₀) của kháng thể bằng đường cong logistic 4 tham số. Các kháng thể được thí nghiệm hai lần, và các trị số IC₅₀ trong ba thử nghiệm được lấy trung bình về mặt hình học để tính toán khoảng tin cậy 95% (Bảng 2). Trong thí nghiệm này, kháng thể kháng Fn14 ở người CRCBT-06-002 từ chuột nhắt (Tài liệu sáng chế 2) được sử dụng làm kháng thể so sánh.

Kết quả là, đã tìm ra là 4-1h có hoạt tính đối kháng mạnh hơn so với CRCBT-06-002.

Bảng 2: Hoạt tính ức chế 4-1h so với sự hoạt hóa NFkB được gây cảm ứng bởi Tweak

[Bảng 2]

Tên kháng thể	IC ₅₀ (ng/mL) (khoảng tin cậy 95%)
---------------	--

4-1h	41,5 (27,2-63,4)
CRCBT-06-002	115 (72,7-183)

(Ví dụ 8: Xét nghiệm sản xuất IL-8 đối với kháng thể được nhân hóa hoàn toàn)

Hoạt tính chức năng của 4-1h được thu nhận trong Ví dụ 4 được đánh giá bằng xét nghiệm sản xuất IL-8 in vitro. Các tế bào A375 (ATCC, CRL-1619) được tạo huyền phù trong DMEM chỉ gồm huyết thanh thai bò 10% ở mức 5×10^4 tế bào/mL, và được gieo hạt ở mức 100 μ L/giếng trong đĩa đáy phẳng 96 giếng (IWAKI CO., LTD., 3860-096). Sau khi nuôi cấy qua đêm ở 37°C bằng CO₂ 5%, quá trình rửa được thực hiện bằng PBS. Chuỗi pha loãng 10 lần của 4-1h thu được trong Ví dụ 4 được chuẩn bị đến nồng độ cuối từ 1 ng/mL đến 100 μ g/mL trong môi trường nuôi cấy nêu trên, và được thêm vào các tế bào. Sau khi nuôi cấy qua đêm ở 37°C bằng CO₂ 5% với sự có mặt của Tweak ở nồng độ cuối 5 ng/mL (quá trình đánh giá hoạt tính đối kháng) hoặc không có mặt của Tweak (quá trình đánh giá hoạt tính chủ vận), dịch nuôi cấy được thu gom lại, và nồng độ IL-8 trong dịch nuôi cấy được đo bằng cách sử dụng kit ELISE IL-8/CXCL8 Quantikine ở người (R&D Systems, D8000C). Các thể tích cuối trong quá trình đánh giá hoạt tính đối kháng và quá trình đánh giá hoạt tính chủ vận lần lượt là 65 μ L/giếng và 100 μ L/giếng trong các thử nghiệm. Trong thí nghiệm, các kháng thể được kiểm tra hai lần bằng cách sử dụng CRCBT-06-002 làm kháng thể so sánh.

Trong quá trình đánh giá hoạt tính đối kháng, nhóm mà trong đó chỉ có môi trường nuôi cấy không có kháng thể được thêm vào đã được thiết lập làm nhóm đối chứng, nhóm được thêm Tweak được xác định là độ ức chế 0%, và nhóm không thêm Tweak được xác định là độ ức chế 100% để tính toán tỷ lệ ức chế. Trung bình số học của các tỷ lệ ức chế tối đa $\pm$ sai số được định chuẩn trong mỗi trong số bốn thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 3 (Bảng 3). Biểu đồ của hoạt tính đối kháng được thể hiện trong Fig.1, và biểu đồ của hoạt tính chủ vận được thể hiện trong Fig.2.

Như thể hiện trong Bảng 3 và Fig.1, đã tìm ra rằng 4-1h thể hiện hầu hết hoạt tính ức chế hoàn toàn so với sự sản xuất IL-8 được gây cảm ứng bởi sự kích thích Tweak, trong khi CRCBT-06-002 chỉ biểu hiện hoạt tính ức chế theo phần. Ngoài ra, như thể hiện trong Fig.2, sự sản xuất IL-8 được gây cảm ứng bởi CRCBT-06-002 bằng chính nó mà không có mặt Tweak, trong khi 4-1h theo sáng chế khó gây cảm ứng với sự sản xuất IL-8.

Từ các điểm nêu trên, đã tìm ra rằng CRCBT-06-002 là kháng thể đối kháng theo phần có hoạt tính chủ vận, trong khi 4-1h là kháng thể đối kháng hoàn toàn có ít hoạt tính chủ vận đối với Fn14 ở người.

Bảng 3: Các hoạt tính ức chế của 4-1h và CRCBT-06-002 so với sự sản xuất IL-8 được gây cảm ứng bởi sự kích thích Tweak

[Bảng 3]

Tên kháng thể	Các tỷ lệ ức chế tối đa (%) Sai số được định chuẩn $\pm$ trung bình
4-1h	96,4 $\pm$ 0,4
GRCBT-06-002	53,0 $\pm$ 6,8

(Ví dụ 9: Hoạt động của mẫu hình chuột nhắt mắc chứng suy mòn do ung thư)

Các con chuột mang dòng tế bào ung thư ruột kết ở chuột nhắt C26 (COLON 26) là một trong số các mẫu hình mắc chứng suy mòn do ung thư tiêu biểu thể hiện sự giảm trọng lượng và giảm khối lượng cơ, mà các đặc tính của chứng suy mòn (Aulino P et al., BCM Cancer. 2010, Vol. 10 363, p. 1-15) (Bonetto A et al., J Vis Exp. 2016, Nov. 30 117, p. 1-21).

Các tế bào C26 (Viện Ung thư quốc gia) được tạo huyền phù ở mức 10^6 tế bào/100 μ L bằng cách sử dụng màng BD Matrigel Matrix Basement không chỉ gồm Phenol-red (BD, 356237) được tiêm dưới da với lượng 100 μ L vào chuột nhắt CD2F1 đực (Charles River Laboratories Japan Inc.) để chuẩn bị chuột nhắt mang khối u C26. Sau khi xác nhận rằng trọng lượng cơ thể của chuột nhắt mang khối u C26 bắt đầu giảm, việc dùng kháng thể được bắt đầu. Cụ thể là, 4-1m được pha loãng bằng PBS được dùng dưới da cho chuột nhắt mang khối u C26 ở mức 3 mg/kg (liều lượng: 10 mL/kg) ở ngày thứ 25, 28, 30, 32, và 35 sau khi tiêm tế bào.

Kháng thể đối chứng cùng loại được dùng cho nhóm đối chứng bằng cách tương tự. Kháng thể IgG2a ở chuột nhắt kháng lại keyhole limpet hemocyanin (keyhole limpet hemocyanin - KLH), mà là kháng nguyên mà không tồn tại trong cơ thể sinh vật, được thu nhận và sử dụng theo phương pháp thông thường như kháng thể đối chứng isotype. Việc dùng kháng thể được bắt đầu ở 15 con chuột trong mỗi nhóm. Hai con chuột trong nhóm dùng 4-1m và bảy con chuột trong nhóm đối chứng bị chết ở ngày thứ 37 mà là ngày kết thúc thử nghiệm.

Vào ngày trước khi kết thúc thử nghiệm (ngày thứ 36), sức nắm chặt được đo bằng cách sử dụng thiết bị đo sức nắm chặt đối với động vật nhỏ (MELQUEST Co., Ltd., GPM-100B). Trọng lượng cơ thể được đo vào ngày thứ 37, và trọng lượng của cơ cẳng chân trước đã tách riêng được đo như khối lượng cơ. Về các chỉ số được đo vào ngày thứ 36 và ngày thứ 37, có sự khác biệt đáng kể giữa nhóm dùng 4-1m và nhóm đối chứng được đo bằng cách sử dụng Student's t-test. Trong tất cả các trường hợp, $p < 0,05$ được xem là đáng kể, và trong trường hợp mà trong đó có sự khác biệt đáng kể, ký hiệu (*) được đặt ở đồ thị (ký hiệu ** trong đồ thị chỉ ra rằng ở đây có sự khác biệt đáng kể vì $p < 0,01$).

Trọng lượng cơ thể thay đổi được đo liên tục đến ngày thứ 37 được thể hiện trong Fig.3. Việc giảm trọng lượng vẫn tiếp diễn thậm chí sau khi bắt đầu dùng cho nhóm đối chứng. Tuy nhiên, việc giảm trọng lượng được ngăn chặn ở nhóm dùng 4-1m, và vào ngày thứ 37, sự giảm trọng lượng đáng kể được quan sát thấy ở nhóm dùng 4-1m so với nhóm đối chứng ($P=0,0019$). Ngoài ra, việc giảm khối lượng cơ được quan sát thấy ở nhóm dùng 4-1m (Fig.4, $p=0,0009$). Hơn nữa, sức nắm chặt cũng tăng đáng kể (Fig.5, $p=0,0003$) ở nhóm dùng 4-1m, và sự cải thiện được thể hiện không chỉ ở khối lượng cơ mà còn ở chức năng cơ.

Các kết quả nêu trên cho thấy rằng 4-1m là hữu dụng để kháng lại chứng suy mòn và có thể hữu dụng ngay cả khi việc dùng trị liệu sau khi quan sát thấy việc giảm trọng lượng.

(Ví dụ 10: Hoạt động trong thời gian sống sót ở mẫu hình chuột nhắt mắc chứng suy mòn do ung thư)

Các con chuột mang khối u C26 được chuẩn bị theo cùng cách như trong Ví dụ 9. Việc dùng kháng thể được bắt đầu với 5 con chuột trong mỗi nhóm từ thời

gian khi mà trọng lượng cơ thể của chuột nhất mang khối u C26 bắt đầu giảm. Cụ thể là, 4-1m được pha loãng bằng PBS được dùng dưới da ở mức 0,3 mg/kg (liều lượng: 10 mL/kg) ba lần một tuần từ ngày thứ 22 đến ngày thứ 70 sau khi tiêm tế bào, và sau đó là vào ngày thứ 71, 76, 78, 83, và 85. Kháng thể đối chứng cùng isotype như trong Ví dụ 9 được dùng cho nhóm đối chứng bằng cách giống như với 4-1m. Gemcitabin (tên thương mại: GEMZAR, Eli Lilly and Company) được pha loãng bằng PBS được dùng dưới da vào nhóm dùng gemcitabin ở mức 10 mg/kg (liều lượng: 10 mL/kg). Cả 4-1m và gemcitabin đều được dùng cho nhóm dùng kết hợp gemcitabin-4-1m trong cùng một ngày. Đường kính dài và đường kính ngắn của khối u được đo liên tục bằng cách sử dụng các đo bằng compa (ASONE, VC01-150), và thể tích khối u được tính toán bằng công thức sau đây.

Thể tích khối u = Đường kính dài (mm) $\times$ Đường kính ngắn (mm) $\times$ Đường kính ngắn (mm)/2

Tỷ lệ sống sót của các con chuột được thể hiện ở các đường cong sống sót Kaplan-Meier trong Fig.6. Trong trường hợp mà sự khác nhau ở các đường cong sống sót giữa các nhóm được so sánh, thí nghiệm logrank được thực hiện, và $p < 0,05$ được coi là đáng kể. Thời gian sống sót trung bình của nhóm đối chứng, nhóm dùng 4-1m, và nhóm dùng gemcitabin lần lượt là 41 ngày, 57 ngày, và 55 ngày. Thời gian sống sót trung bình của nhóm dùng kết hợp gemcitabin-4-1m là 83 ngày, và sự khác biệt đáng kể được quan sát thấy được so với đường cong sống sót của nhóm dùng 4-1m riêng lẻ hoặc gemcitabin riêng lẻ.

Trong cả trường hợp mà kháng thể được dùng riêng lẻ và trường hợp mà kháng thể được dùng trong tổ hợp với gemcitabin, không có ảnh hưởng của việc dùng 4-1m đối với thể tích khối u (Fig.7).

Các kết quả nêu trên đã thể hiện rằng 4-1m có thể kéo dài thời gian sống sót mà không ảnh hưởng đến kích cỡ khối u, và hiệu quả hơn trong việc cải thiện tỷ lệ sống sót bằng cách sử dụng các tác nhân chống ung thư như gemcitabin.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Kháng thể kháng Fn14 ở người theo sáng chế là hữu dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh khác nhau trong đó Fn14 ở người có liên quan đến tác nhân

gây bệnh. Ngoài ra, phương pháp sản xuất polynucleotit, vectơ biểu hiện, tế bào chủ được biến nạp, hoặc kháng thể theo sáng chế là được kỳ vọng là hữu dụng để sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người.

Danh mục trình tự không có chữ

Trong tiêu đề số <223> của danh mục trình tự sau đây, phần mô tả “Trình tự nhân tạo” được tạo ra. Cụ thể là, các trình tự bazơ được thể hiện bằng các SEQ ID NO: 1, 3, 5, và 7 của danh mục trình tự lần lượt là các trình tự bazơ của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người, và các trình tự axit amin được thể hiện bằng các SEQ ID NO: 2, 4, 6, và 8 lần lượt là các trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa bằng các SEQ ID NO: 1, 3, 5, và 7. Các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 9 là trình tự liên kết peptit mà liên kết với protein Fn14 ở người và protein vùng Fc ở người.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chỉ gồm trình tự axit amin có các số axit amin từ 31 đến 35 của SEQ ID NO: 2, CDR2 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 50 đến 65 của SEQ ID NO: 2, và CDR3 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 98 đến 114 của SEQ ID NO: 2; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 24 đến 40 của SEQ ID NO: 4, CDR2 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 56 đến 62 của SEQ ID NO: 4, và CDR3 chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 95 đến 103 của SEQ ID NO: 4.

2. Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 1, được chọn từ mục (1) và (2) sau đây:

(1) kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID NO: 4; và

(2) kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được tạo thành bởi sự biến đổi sau dịch mã của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng ở mục (1), trong đó sự biến đổi sau dịch mã là sự pyroglutamyl hóa ở đầu N của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc sự khuyết đoạn lysin ở đầu C của chuỗi nặng.

3. Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 2, bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 114 của SEQ ID NO: 4.

4. Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 2, bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 125 của SEQ ID NO: 2, trong đó glutamin của số axit amin 1 của SEQ ID NO: 2 được biến đổi thành axit pyroglutamic; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 từ 114 của SEQ ID NO: 4.

5. Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 2, trong đó kháng thể kháng Fn14 ở người được chọn từ mục (3) và (4) sau đây:

(3) kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2 và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4; và

(4) kháng thể kháng Fn14 ở người được tạo thành bởi sự biến đổi sau dịch mã của kháng thể ở mục (3), trong đó sự biến đổi sau dịch mã là sự pyroglutamyl hóa ở đầu N của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc sự khuyết đoạn lysin ở đầu C của chuỗi nặng.

6. Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 5, trong đó kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm:

chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2; và chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4

7. Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 5, trong đó kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm:

chuỗi nặng chỉ gồm trình tự axit amin có các axit amin từ số 1 đến 454 của SEQ ID NO: 2, trong đó glutamin của axit amin số 1 của SEQ ID NO: 2 được biến đổi thành axit pyroglutamic; và

chuỗi nhẹ chỉ gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4.

8. Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó đoạn gắn kết kháng nguyên là đoạn vùng biến đổi chuỗi đơn, Fab, Fab', hoặc $F(ab')_2$.

9. Polynucleotit bao gồm:

trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 3, và

trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 3.

10. Vector biểu hiện bao gồm:

polynucleotit theo điểm 9.

11. Tế bào chủ được chọn từ nhóm chỉ gồm mục từ (a) đến (c) sau đây:

(a) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 3 và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng;

(b) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 3, và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng; và

(c) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 3, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 3.

12. Tế bào chủ được chọn từ nhóm chỉ gồm mục từ (e) đến (g) sau đây:

(e) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo điểm 6 và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể;

(f) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo điểm 6, và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể; và

(g) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo điểm 6, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người theo điểm 6.

13. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng, phương pháp này bao gồm:

bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm chỉ gồm mục (A) đến (C) sau đây để biểu hiện kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng:

(A) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 3 và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng;

(B) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 3, và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng; và

(C) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 3, và tế bào chủ được

biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

14. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng Fn14 ở người bao gồm:

bước nuôi cấy tế bào chủ được chọn từ nhóm chỉ gồm mục (D) đến (F) để biểu hiện kháng thể kháng Fn14 ở người:

(D) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo điểm 6 và polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể;

(E) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo điểm 6, và vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể; và

(F) tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nặng của kháng thể kháng Fn14 ở người theo điểm 6, và tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện bao gồm polynucleotit bao gồm trình tự bazơ mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng Fn14 ở người.

15. Kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 13.

16. Kháng thể kháng Fn14 ở người được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 14.

17. Dược phẩm bao gồm:

kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, và 15 hoặc kháng thể kháng Fn14 theo điểm 16; và

tá dược được dụng.

18. Dược phẩm bao gồm:

kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 3;

kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 4; và

tá dược được dụng.

19. Dược phẩm bao gồm:

kháng thể kháng Fn14 ở người theo điểm 6;

kháng thể kháng Fn14 ở người theo điểm 7; và

tá dược được dụng.

20. Dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị ung thư hoặc chứng suy mòn do ung thư, bao gồm:

kháng thể kháng Fn14 ở người hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, và 15 hoặc kháng thể kháng Fn14 theo điểm 16 làm thành phần hoạt tính,

trong đó dược phẩm được sử dụng trong tổ hợp với tác nhân chống ung thư.

1/5

Fig. 1

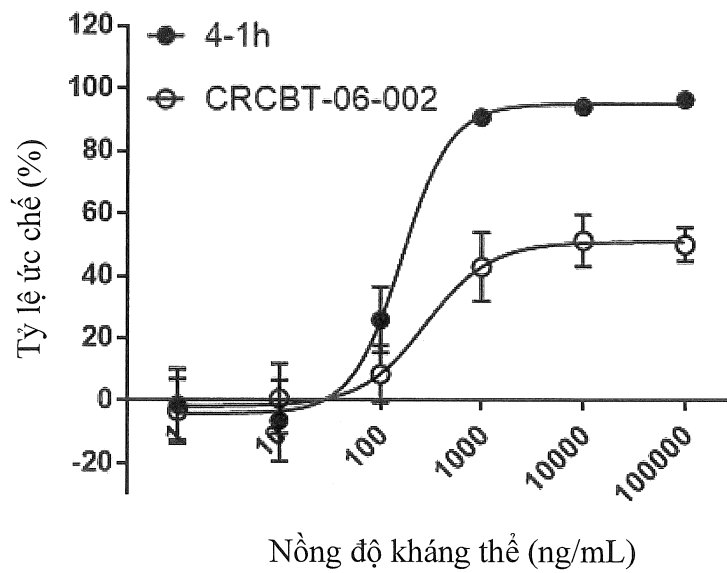
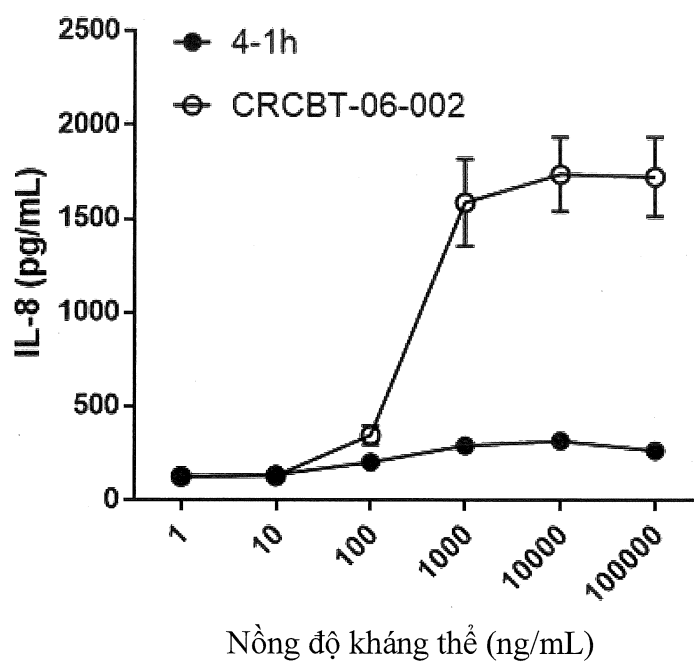


Fig. 2



2/5

Fig. 3

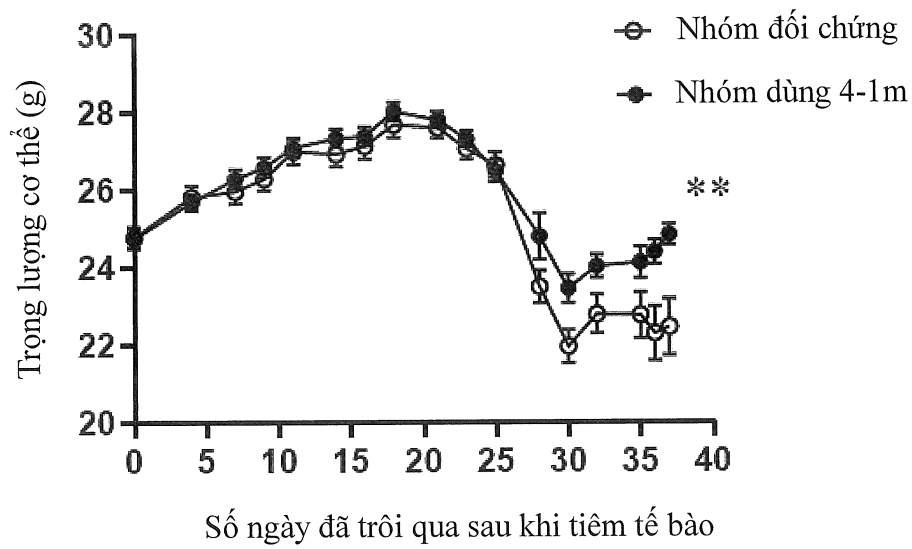
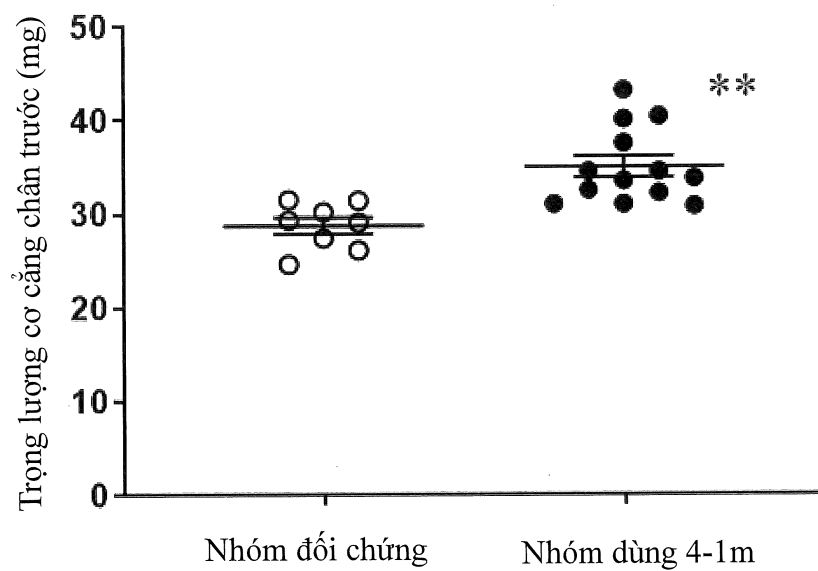
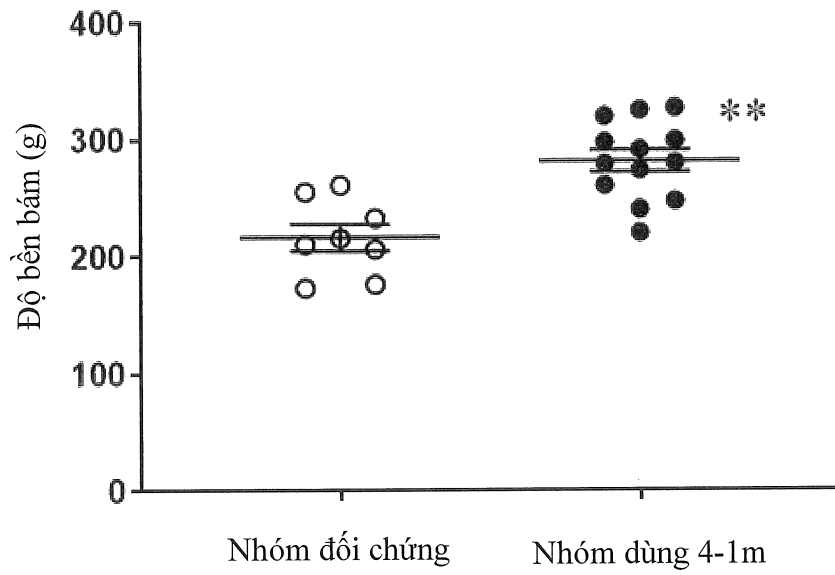


Fig. 4



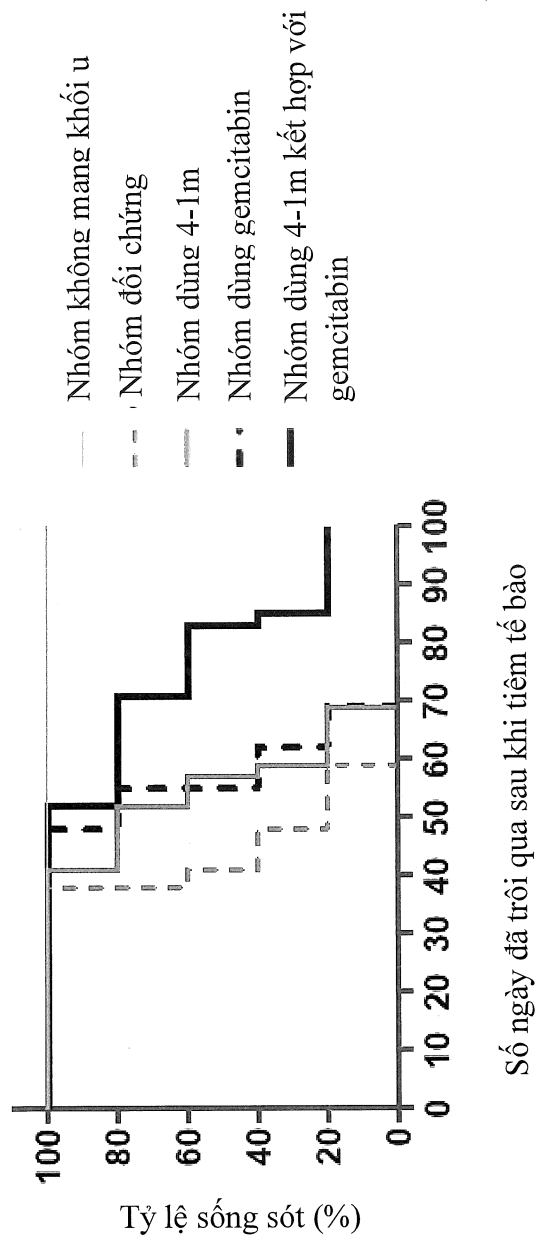
3/5

Fig. 5



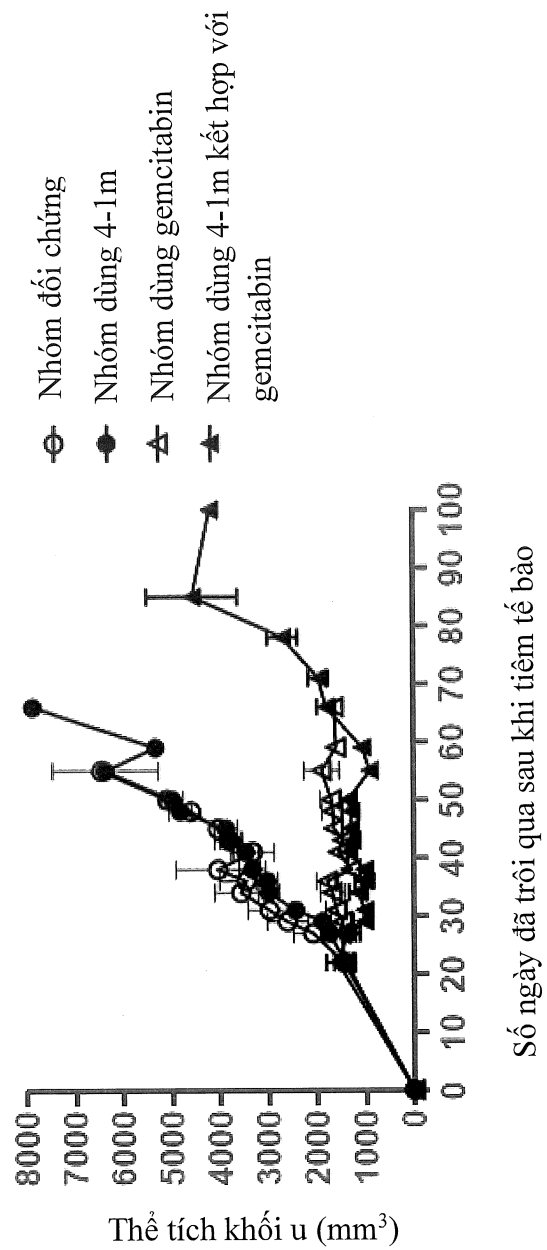
4/5

Fig. 6



5/5

Fig. 7



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Astellas Pharma Inc.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG Fn14 Ở NGƯỜI, POLYNUCLEOTIT, VECTO BIỂU HIỆN, TẾ BÀO CHỦ, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC PHẨM

<130> A19011A00

<150> JP 2018-205995

<151> 2018-10-31

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1365

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi H của kháng thể 4-1h

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1365)

<400> 1

cag	gtg	cag	cta	cag	cag	tg	ggc	gca	gga	ctg	ttg	aag	cct	tcg	gag		48
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu		
1				5					10					15			
acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	gct	gtc	tat	ggg	ggg	tcc	ttc	agt	ggg	tac		96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr		
			20					25					30				
tac	tg	agc	tg	atc	cgc	cag	ccc	cca	ggg	aag	ggg	ctg	gag	tg	att		144
Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile		
			35				40					45					
ggg	gaa	atc	aat	cat	cgt	gga	agc	acc	aac	tcc	aac	ccg	tcc	ctc	aag		192
Gly	Glu	Ile	Asn	His	Arg	Gly	Ser	Thr	Asn	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys		
			50			55					60						
agt	cga	gac	acc	ata	tca	gta	gac	acg	tcc	aag	aac	cag	ttc	tcc	ctg		240
Ser	Arg	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu		
65					70					75					80		

agg	ctg	agg	tct	gtg	acc	gcc	gcg	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	gcg	288
Arg	Leu	Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
			85						90					95		
cgc	gag	ggt	ata	agt	gga	agt	atg	ggg	atc	tac	gac	tac	agc	gga	atg	336
Arg	Glu	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	Met	Gly	Ile	Tyr	Asp	Tyr	Ser	Gly	Met	
			100					105						110		
gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcc	tcc	acc	384
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	
		115					120					125				
aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	432
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	
	130					135					140					
ggg	ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	480
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	
145					150					155					160	
ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	528
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	
				165				170						175		
acc	ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctt	agt	agc	576
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
			180					185					190			
gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	624
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
		195					200					205				
aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	gtt	gag	672
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	
	210					215					220					
ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	720
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
225					230					235					240	
gaa	gcc	gct	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	768
Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
				245					250					255		
gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	816
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
			260					265					270			
gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	864
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
		275					280					285				

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac	912
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
290 295 300	
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	960
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
305 310 315 320	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc	1008
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	
325 330 335	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga	1056
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
340 345 350	
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag	1104
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys	
355 360 365	
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac	1152
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
370 375 380	
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag	1200
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
385 390 395 400	
acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc	1248
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	
405 410 415	
aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca	1296
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	
420 425 430	
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc	1344
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
435 440 445	
ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa	1365
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
450 455	

<210> 2
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

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

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

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

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg Glu Gly Ile Ser Gly Ser Met Gly Ile Tyr Asp Tyr Ser Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140

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

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

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

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

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 3
<211> 660
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi L của kháng thể 4-1h

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(660)

<400> 3
gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agg cag agt att tta tat agt 96
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Arg Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
20 25 30
tcc aac aat aag aac tac tta act tgg tac cag cag aaa cca gga cag 144
Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
cct cct aag ttg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc 192
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc 240
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65	70	75	80	
atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa				288
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln	85	90	95	
tat tat agt act cct tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc				336
Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile	100	105	110	
aaa cgg act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat				384
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	115	120	125	
gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac				432
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn	130	135	140	
ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc				480
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu	145	150	155	160
caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac				528
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp	165	170	175	
agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac				576
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	180	185	190	
gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc				624
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser	195	200	205	
tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt				660
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210	215	220	

<210> 4
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Arg Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210	215	220	
<210>	5		
<211>	1368		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Chuỗi H của kháng thể 4-1m		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(1)..(1368)		
<400>	5		
gat gtt cag ctg caa gag tct ggc cct ggc ctg gtc aag cct tct cag			48
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln			
1 5 10 15			
tct ctg tct ctg acc tgc gct gtg tac ggc ggc tct ttc tct ggc tac			96
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr			
20 25 30			
tac tgg tcc tgg atc cgg cag ttc cct ggc aac aag ctg gaa tgg atg			144
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met			
35 40 45			
ggc gag atc aac cac cgg ggc tcc acc aac tct aac ccc agc ctg aag			192
Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys			
50 55 60			
tcc cgg atc tcc atc acc gtg gac acc tcc aag aac cag ttc ttt ctg			240
Ser Arg Ile Ser Ile Thr Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu			
65 70 75 80			
cag ctc aac tcc gtg aca acc gag gac acc gcc acc tac tac tgt gcc			288
Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala			
85 90 95			
aga gag ggc atc tct ggc tcc atg ggc atc tac gac tac tcc ggc atg			336
Arg Glu Gly Ile Ser Gly Ser Met Gly Ile Tyr Asp Tyr Ser Gly Met			
100 105 110			
gat gtg tgg ggc cag ggc aca ctg gtt acc gtg tct gcc gct aag acc			384
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr			
115 120 125			
acc gct cct tcc gtg tat cct ctg gca cct gtg tgt ggc gac acc acc			432
Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr			

130	135	140	
gga agt tct gtg acc ctg gga tgt ctg gtc aag ggc tac ttc ccc gag			480
Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu			
145	150	155	160
cct gtg aca ctg acc tgg aac tct ggc tct ctg tcc tct ggc gtg cac			528
Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His			
	165	170	175
acc ttt cca gcc gtg ctg cag tct gac ctg tac acc ctg tct agc tcc			576
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser			
	180	185	190
gtg acc gtg acc tcc tct acc tgg cct agc cag tcc atc acc tgt aac			624
Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn			
	195	200	205
gtg gcc cat cct gcc tcc agc acc aag gtg gac aag aag atc gag cct			672
Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro			
	210	215	220
cgg ggc cct acc atc aag cct tgt cct cca tgc aag tgc ccc gct cct			720
Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro			
	225	230	235
aat ctg ctc gga ggc ccc tcc gtg ttc atc ttc cca cct aag atc aag			768
Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys			
	245	250	255
gac gtg ctg atg atc tcc ctg tct cct atc gtg acc tgc gtg gtg gtg			816
Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val			
	260	265	270
gcc gtg tcc gag gat gat cct gac gtg cag atc agt tgg ttc gtg aac			864
Ala Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn			
	275	280	285
aac gtg gaa gtg cac acc gct cag acc cag aca cac aga gag gac tac			912
Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr			
	290	295	300
aac agc acc ctg aga gtg gtg tct gcc ctg cct atc cag cat cag gat			960
Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp			
	305	310	315
tgg atg tcc ggc aaa gag ttc aag tgc aaa gtg aac aac aag gac ctg			1008
Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu			
	325	330	335
cct gct cca atc gag cgg acc atc tct aag cct aag ggc tct gtc agg			1056

Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg		
			340					345					350				
gcc	cct	cag	gtg	tac	gtt	ttg	cct	cca	cct	gag	gaa	gag	atg	acc	aag		1104
Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
		355					360					365					
aaa	caa	gtg	acc	ctg	aca	tgc	atg	gtc	acc	gac	ttc	atg	ccc	gag	gac		1152
Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp		
		370				375					380						
atc	tac	gtg	gaa	tgg	acc	aac	aac	ggc	aag	acc	gag	ctg	aac	tac	aag		1200
Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys		
385					390					395					400		
aac	acc	gag	cca	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	tac	ttc	atg	tac	tcc		1248
Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser		
				405					410					415			
aag	ctg	cgc	gtc	gag	aag	aag	aac	tgg	gtc	gag	aga	aac	tcc	tac	tcc		1296
Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser		
			420					425					430				
tgc	tcc	gtg	gtg	cac	gag	ggc	ctg	cac	aat	cac	cac	acc	acc	aag	tcc		1344
Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser		
			435				440					445					
ttc	tct	cgg	acc	cct	ggc	aag	tga										1368
Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys											
		450				455											

<210> 6
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6

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

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

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

35	40	45															
Gly	Glu	Ile	Asn	His	Arg	Gly	Ser	Thr	Asn	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys		
50						55					60						
Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu		
65					70					75					80		
Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala		
				85					90					95			
Arg	Glu	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	Met	Gly	Ile	Tyr	Asp	Tyr	Ser	Gly	Met		
			100					105					110				
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Lys	Thr		
		115					120					125					
Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Cys	Gly	Asp	Thr	Thr		
						135					140						
Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu		
145					150					155					160		
Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His		
				165					170					175			
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser		
			180					185					190				
Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn		
			195				200					205					
Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro		
			210			215					220						
Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro		
225					230					235					240		

Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
245 250 255

Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Ala Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
275 280 285

Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
325 330 335

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

Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365

Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
370 375 380

Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
420 425 430

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
435 440 445

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450 455

<210> 7
<211> 663
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi L của kháng thể 4-1m

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(663)

<400> 7
gac atc gtg atg tct cag agc cct tcc tct ctg gcc gtg tcc gtg gga 48
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15
gag aaa gtg acc atg tcc tgc aag tcc cgg cag tcc atc ctg tac tcc 96
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Arg Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
20 25 30
tcc aac aac aag aac tac ctg acc tgg tat cag cag aag ccc ggc cag 144
Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
tct cct aag ctg ctg atc tac tgg gcc tcc acc aga gaa tct ggc gtg 192
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
ccc gat aga ttc acc ggc tct ggc tct ggc acc gac ttt acc ctg acc 240
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
atc tcc tcc gtg aag gcc gag gat ctg gct gtg tac tac tgc cag cag 288
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
tac tac agc acc cct tac acc ttt ggc tcc ggc acc aag ctg gaa atc 336
Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
aag aga gct gac gcc gct cct acc gtg tct atc ttc cca cct agc tcc 384
Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
115 120 125

gag cag ctg acc tct ggc gga gct tct gtc gtg tgc ttc ctg aac aac 432
 Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
 130 135 140

 ttc tac ccc aag gac atc aac gtg aag tgg aag atc gac ggc tcc gag 480
 Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
 145 150 155 160

 aga cag aac ggc gtg ctg aac tct tgg acc gac cag gac tcc aag gac 528
 Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

 agc acc tac tcc atg tcc tcc aca ctg acc ctg aca aag gac gag tac 576
 Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
 180 185 190

 gag cgg cac aac tcc tat acc tgc gag gct acc cac aag acc tcc acc 624
 Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
 195 200 205

 tct cca atc gtg aag tcc ttc aac cgg aac gag tgc tga 663
 Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215 220

<210> 8
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Arg Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
115 120 125

Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
145 150 155 160

Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
180 185 190

Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
195 200 205

Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215 220

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9

Ile Glu Gly Arg Met Asp Gly Gly Gly
1 5