



(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)



1-0049642

(51)^{2020.01} A61K 39/395; C07K 16/40; C07K
16/30; C07K 16/18; C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2021-03780

(22) 25/11/2019

(86) PCT/US2019/063091 25/11/2019

(87) WO2020/112687 04/06/2020

(30) 62/771,526 26/11/2018 US

(45) 25/08/2025 449

(43) 25/10/2021 403A

(73) Forty Seven, LLC (US)

333 Lakeside Drive, Foster City, California 94404, United States of America

(72) LIU, Jie (US); SOMPALLI, Kavitha (US).

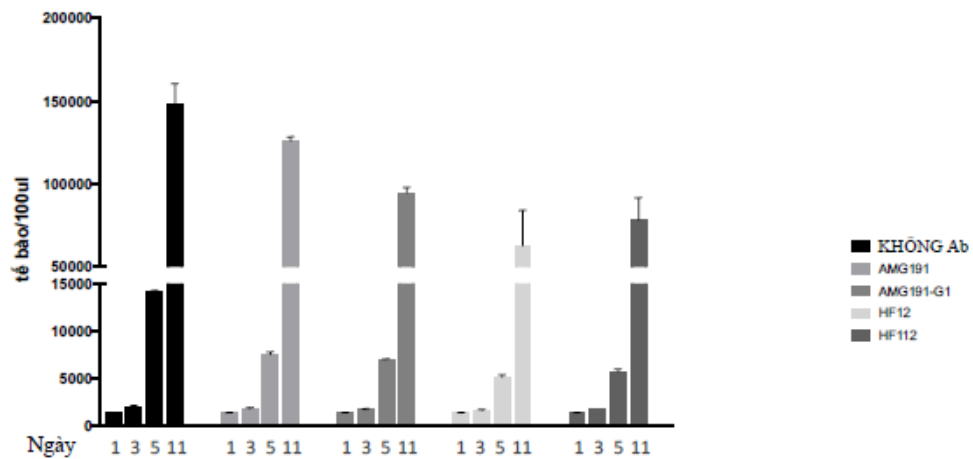
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI C-KIT CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2021-03780

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể liên kết đặc hiệu với c-Kit và phương pháp sử dụng kháng thể này trong việc thay thế tế bào gốc và điều trị ung thư.

Fig. 7 Sự tăng sinh HSPC in vitro



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết đặc hiệu với c-Kit và phương pháp sử dụng các kháng thể này trong liệu pháp thay thế tế bào gốc và điều trị bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

c-Kit (CD117) là thụ thể tyrosin kinaza typ III, liên kết với yếu tố tế bào gốc (SCF), chất gây ra kiểu tế bào nhất định để phát triển, còn được biết là "yếu tố Steel" hay "phôi tử c-Kit". Khi thụ thể này liên kết với yếu tố tế bào gốc, nó tạo ra dime làm hoạt hóa hoạt tính tyrosin kinaza bên trong của nó, dẫn đến phosphoryl hóa và hoạt hóa các phân tử truyền tín hiệu truyền đi tín hiệu trong tế bào. c-Kit là gen đánh dấu bề mặt tế bào được dùng để xác định kiểu HSPC nhất định trong tủy xương. Tế bào gốc tạo máu (HSC), tế bào tiền thân đa năng (MPP), và các tế bào tiền thân dòng tủy thông thường (CMP) biểu hiện c-Kit mức cao. Được đề xuất rằng kháng thể dựa trên c-Kit có thể được sử dụng để cắt bỏ các tế bào nội sinh trong liệu pháp thay thế tế bào gốc (WO2016033201, WO2008067115).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể liên kết đặc hiệu với c-Kit của người chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành gồm các CDR H1, H2 và H3 như được xác định bởi Kabat được nêu trong SEQ ID NO:2-4, theo thứ tự, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành gồm các CDR L1, L2 và L3 như được xác định bởi Kabat được nêu trong SEQ ID NO:6-8, theo thứ tự, ngoại trừ việc 1, 2, hoặc 3 thay thế gốc CDR có mặt được chọn từ N thành A ở vị trí 60 của chuỗi nặng, K thành Q ở vị trí 64 của chuỗi nặng và N thành Q ở vị trí 30 của chuỗi nhẹ, các vị trí được đánh số theo Kabat.

Tùy ý, các CDR H1, H2 và H3 như được xác định bởi Kabat lần lượt là SEQ ID NO:2-4, và các CDR L1, L2 và L3 như được xác định bởi Kabat lần lượt là SEQ ID NO:6-8 ngoại trừ là các thay thế K thành Q ở vị trí 64 của chuỗi nặng và N thành Q ở vị trí 30 của chuỗi nhẹ là có mặt.

Tùy ý, các CDR H1, H2 và H3 như được xác định bởi Kabat lần lượt là SEQ ID NO:2-4, và các CDR L1, L2 và L3 như được xác định bởi Kabat lần lượt là SEQ ID

NO:6-8 ngoại trừ là các thay thế N thành A ở vị trí 60 của chuỗi nặng, K thành Q ở vị trí 64 của chuỗi nặng và N thành Q ở vị trí 30 của chuỗi nhẹ là có mặt.

Tùy ý, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành thể hiện độ đồng nhất trình tự ít nhất 85, 90, 95, 98, hoặc 99% với SEQ ID NO:13, 17 hoặc 21 (AH2, AH3 hoặc AH4) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành thể hiện độ đồng nhất trình tự ít nhất 85, 90, 95, 98, 99 % với SEQ ID NO:53 (NL2) tạo ra dạng cải biến bất kỳ từ các SEQ ID NO đã chỉ ra là nằm ngoài các CDR.

Tùy ý, vị trí 1 của chuỗi nặng theo cách đánh số Kabat là E. Tùy ý, các vị trí sau đây của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành bị chiếm chỗ bởi các axit amin sau: Vị trí 9 bị chiếm chỗ bởi L, Vị trí 12 bị chiếm chỗ bởi P, Vị trí 14 bị chiếm chỗ bởi T, Vị trí 15 bị chiếm chỗ bởi P, Vị trí 18 bị chiếm chỗ bởi P, Vị trí 20 bị chiếm chỗ bởi S, Vị trí 22 bị chiếm chỗ bởi S, Vị trí 37 bị chiếm chỗ bởi L, Vị trí 43 bị chiếm chỗ bởi S, Vị trí 45 bị chiếm chỗ bởi Q, Vị trí 74 bị chiếm chỗ bởi K, Vị trí 77 bị chiếm chỗ bởi R, Vị trí 78 bị chiếm chỗ bởi V, Vị trí 79 bị chiếm chỗ bởi E, Vị trí 84 bị chiếm chỗ bởi G. Tùy ý, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 13, 17 hoặc 21 ngoại trừ là vị trí 1 có thể là E, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:53. Tùy ý, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng không đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng không đổi chuỗi nhẹ trưởng thành. Tùy ý, vùng không đổi chuỗi nặng là IgG1 của người. Tùy ý, kháng thể có liên kết với c-Kit của người được tăng cường so với AMG191. Tùy ý, kháng thể có ADCP được tăng cường so với AMG191-IgG1. Tùy ý, kháng thể có ADCC được tăng cường so với AMG191-IgG1.

Sáng còn đề xuất được phẩm chứa kháng thể như được mô tả ở trên và chất mang được dụng.

Sáng còn đề xuất phương pháp cắt bỏ HSPC nội sinh bao gồm bước sử dụng chế độ kháng thể hiệu quả như được mô tả ở trên cho đối tượng cần cắt bỏ.

Sáng còn đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư biểu hiện c-Kit bao gồm bước sử dụng chế độ kháng thể hiệu quả cho đối tượng mắc ung thư.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A và 1B thể hiện vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trưởng thành của

kháng thể kháng c-Kit của chuột được tạo ra bởi thể lai được ký gửi dưới tên HB-10716.

Fig. 2A và 2B thể hiện vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trưởng thành của năm vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng được làm cho giống của người theo sáng chế và hai vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nhẹ được làm cho giống của người so với trình tự thể nhận của chuột và của người. Khung vùng biến đổi của trình tự được làm cho giống của người là giống như của AMG191 nhưng các CDR khác nhau.

Fig. 2C so sánh liên kết của AMG191 với biến thể của nó có các thay thế CDR. Tất cả các biến thể được thế CDR đều thể hiện liên kết được tăng cường.

Fig. 2D so sánh liên kết của AMG191 với biến thể có các thay thế CDR khác. Các biến thể này thể hiện liên kết giảm.

Fig. 3A và 3B cung cấp trình tự của sáu vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng được làm cho giống của người và ba vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nhẹ được làm cho giống của người so với AMG191, trình tự của chuột và trình tự của người nhận. Trong các chuỗi được làm cho giống của người này, khung vùng biến đổi khác với khung vùng biến đổi trong kháng thể AMG191. Một vài trong số các chuỗi được làm cho giống của người cũng khác ở các CDR.

Fig. 3C so sánh liên kết của AMG191 với kháng thể được làm cho giống của người với cùng CDR nhưng khác khung vùng biến đổi (xuất hiện từ việc sử dụng trình tự của người nhận khác). Kháng thể có khung mới (NF) có ái lực cao hơn.

Fig. 3D so sánh liên kết của AMG191 với biến thể được làm cho giống của người khác dựa trên khung mới và cũng có các thay thế CDR so với AMG191. Cả ba trong số các kháng thể biến thể đều có ái lực cao hơn.

Fig. 4 so sánh liên kết của AMG191 với ba kháng thể được làm cho giống của người khác với AMG191 bởi sự có mặt của các thay thế CDR và khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ khác (khung vùng biến đổi chuỗi nặng là giống nhau). Cả ba trong số các kháng thể biến thể đều có ái lực cao hơn.

Fig. 5 so sánh hoạt tính thực bào của AMG191, biến thể của AMG191 có vùng không đổi IgG1 kiểu đại với năm kháng thể được làm cho giống của người mới theo sáng chế. Biến thể mới đặc biệt là HF12 và NF112 thể hiện sự thực bào tăng đặc biệt là ở các nồng độ thử nghiệm thấp.

Fig. 6 so sánh hoạt tính ADCC của AMG191 với hai biến thể được làm cho giống của người mới HF112 và HF12 và đối chứng không liên quan được bắt cặp isotyp. HF112 và HF12 có hoạt tính ADCC nhiều hơn.

Fig. 7 thể hiện sự ức chế tăng sinh HSPC do SCF gây ra bởi HF12 và HF112 so với AMG191, AMG191-IgG1 của người và đối chứng âm.

Fig. 8 so sánh sự tách hạt tế bào mast của kháng thể kháng c-Kit so với đối chứng dương A23187 và IgE + kháng IgE.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Kháng thể đơn dòng hoặc các thực thể sinh học khác thường được tạo ra ở dạng được phân lập. Điều này có nghĩa là kháng thể hoặc thực thể sinh học khác thường tinh khiết ít nhất 50% trọng lượng/trọng lượng của protein can thiệp và các tạp chất khác phát sinh từ quá trình sản xuất hoặc tinh sạch của nó nhưng không loại trừ khả năng rằng kháng thể đơn dòng được kết hợp với lượng dư (các) chất mang được dùng hoặc chất dẫn thuốc khác được nhằm để tạo thuận lợi cho việc sử dụng nó. Đôi khi, kháng thể đơn dòng tinh khiết ít nhất 60%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc 99% trọng lượng/trọng lượng của protein can thiệp và các tạp chất từ quá trình sản xuất hoặc tinh sạch. Thông thường, kháng thể đơn dòng hoặc thực thể sinh học khác được phân lập là loại phân tử lớn chiếm ưu thế còn lại sau khi tinh sạch.

Liên kết đặc hiệu cao hơn về độ lớn ở mức có thể thấy được và có thể phân biệt với liên kết không đặc hiệu xảy ra với ít nhất một đích không liên quan. Liên kết đặc hiệu có thể là kết quả của sự tạo thành liên kết giữa các nhóm chức cụ thể hoặc sự ăn khớp về mặt không gian cụ thể (ví dụ, kiểu ổ khóa và chìa khóa) trong khi đó liên kết không đặc hiệu thường là kết quả của lực van der Waals. Tuy nhiên, liên kết đặc hiệu không nhất thiết ám chỉ rằng kháng thể liên kết với một và chỉ một đích. Kháng thể theo sáng chế thường liên kết đặc hiệu với c-Kit với ái lực ít nhất là 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} hoặc 10^{12} M^{-1} .

Đơn vị cấu trúc của kháng thể cơ sở là tetrame của các tiểu đơn vị. Mỗi tetrame bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (khoảng 25 kDa) và một chuỗi "nặng" (khoảng 50-70 kDa). Phần đầu tận amino của mỗi chuỗi bao

gồm vùng biến đổi gồm khoảng 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn chịu trách nhiệm chính cho sự nhận diện kháng nguyên. Vùng biến đổi này được liên kết biểu hiện ban đầu với peptit tín hiệu cắt được. Vùng biến đổi không có peptit tín hiệu đôi khi được gọi là vùng biến đổi trưởng thành. Do đó, ví dụ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ không có peptit tín hiệu chuỗi nhẹ. Phần đầu tận carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng không đổi chịu trách nhiệm chính cho chức năng tác động.

Chuỗi nhẹ được phân loại thành kappa hoặc lambda. Chuỗi nặng được phân loại thành gamma, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, và xác định isotyp kháng thể lần lượt là IgG, IgM, IgA, IgD và IgE. Trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng biến đổi và vùng không đổi được kết hợp bởi vùng "J" gồm khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, với chuỗi nặng còn bao gồm vùng "D" gồm khoảng 10 axit amin hoặc nhiều hơn. Xem, *Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 (được kết hợp vào bản mô tả bằng cách viện dẫn).

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng globulin miễn dịch (sau đây còn được gọi lần lượt là “miền biến đổi chuỗi nhẹ” (“miền VL”) hoặc “miền biến đổi chuỗi nặng” (“miền VH”)) gồm vùng “khung” được xen giữa bởi ba “vùng xác định tính hỗ trợ” hoặc “CDR”. Vùng khung đóng vai trò sắp thẳng các CDR để liên kết đặc hiệu với epitop của kháng nguyên. Các CDR bao gồm các gốc axit amin của kháng thể mà chịu trách nhiệm chính cho việc liên kết kháng nguyên. Từ đầu tận amino đến đầu tận carboxyl, cả hai miền VL và VH đều chứa khung (FR) và vùng CDR sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. CDR 1, 2, và 3 của miền VL trong bản mô tả còn được gọi là, theo thứ tự, CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3; các CDR 1, 2, và 3 của miền VH trong bản mô tả còn được gọi là CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3.

Việc gán các axit amin cho mỗi miền VL và VH là theo định nghĩa quy ước bất kỳ của các CDR. Các định nghĩa quy ước bao gồm, định nghĩa Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 và 1991), định nghĩa Chothia (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342:878-883, 1989); kết hợp CDR Chothia Kabat trong đó CDR-H1 là kết hợp các CDR theo Chothia và Kabat; định nghĩa AbM được sử dụng bởi phần mềm tạo mẫu kháng thể của Oxford Molecular; và, định nghĩa tiếp xúc của Martin et al. (www.bioinfo.org.uk/abs). Kabat cung cấp quy ước đánh số được sử dụng rộng rãi (đánh

số Kabat) trong đó các gốc tương ứng giữa các chuỗi nặng khác nhau hoặc giữa các chuỗi nhẹ khác nhau được gán cùng một số. Trừ khi được quy định khác, cách đánh số các vị trí trong vùng biến đổi của kháng thể là đánh số theo Kabat. Khi kháng thể được cho là chứa các CDR bởi định nghĩa nhất định về CDR (ví dụ, Kabat) định nghĩa này xác định số gốc CDR nhỏ nhất có mặt trong kháng thể (nghĩa là, CDR theo Kabat). Không loại trừ rằng các gốc khác nằm trong định nghĩa CDR theo quy ước nhưng nằm ngoài định nghĩa được chỉ rõ cũng có mặt. Ví dụ, kháng thể chứa các CDR được xác định bởi Kabat bao gồm, trong số các khả năng khác, kháng thể trong đó CDR chứa các gốc CDR Kabat và không có các gốc CDR khác, và kháng thể trong đó CDR H1 là CDR H1 kết hợp Chothia-Kabat và các CDR khác chứa các gốc CDR Kabat và không có các gốc CDR bổ sung dựa vào các định nghĩa khác.

Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm kháng thể nguyên vẹn và mảnh liên kết của nó. Cụ thể, các mảnh cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn mà từ đó chúng thu được đối với liên kết đặc hiệu với đích bao gồm các chuỗi nặng riêng biệt, chuỗi nhẹ Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, Dab, kháng thể nano (nanobody), và Fv. Các mảnh có thể được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng phương pháp tách nhờ enzym hoặc tách hóa học các globulin miễn dịch nguyên vẹn. Thuật ngữ “kháng thể” còn bao gồm kháng thể đặc hiệu kép và/hoặc kháng thể được làm cho giống của người. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể hai chức là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau và hai vị trí liên kết khác nhau (xem, ví dụ, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)).

Kháng thể đặc hiệu kép lấy ví dụ cũng có thể là: (1) kháng thể miền biến đổi kép (DVD-Ig), trong đó mỗi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng chứa hai miền biến đổi tiếp đôi thông qua liên kết peptit ngắn (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab, là thể dung hợp của hai kháng thể kép (diabody) chuỗi đơn dẫn đến kháng thể đặc hiệu kép hóa trị bốn có hai vị trí liên kết với mỗi trong số các kháng nguyên đích; (3) flexibody, là dạng kết hợp của các scFv với kháng thể kép dẫn đến phân tử đa hóa trị; (4) phân tử được gọi là phân tử "rãnh và chốt", dựa vào "dimer hóa và miền nối" trong Protein Kinase A, mà, khi được áp dụng cho các Fab, có thể tạo ra protein liên kết đặc hiệu kép hóa trị ba gồm hai mảnh Fab giống nhau liên kết với mảnh Fab khác; hoặc (5) phân tử được gọi là phân tử Scorpion, chứa, ví dụ, hai scFv

được dung hợp với cả hai đầu tận của vùng Fc của người. Ví dụ về nền tảng hữu ích để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép bao gồm BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab và Mab2 (F-star), IgG1 được xử lý Fc (Xencor) hoặc DuoBody (dựa vào sự trao đổi nhánh Fab, Genmab).

Thuật ngữ “epitop” chỉ vị trí trên kháng nguyên mà kháng thể liên kết với kháng nguyên này. Epitop có thể được tạo ra từ các axit amin liên tục hoặc các axit amin không liên tục được đặt cạnh nhau bởi nếp gấp bậc ba của một hoặc nhiều protein. Epitop được tạo ra từ các axit amin liên tục (còn được biết là epitop dạng thẳng) thường vẫn còn khi tiếp xúc với dung môi làm biến tính trong khi các epitop được tạo ra bởi nếp gấp bậc ba (còn được biết là epitop thể cấu tạo) thường bị mất đi khi xử lý với dung môi làm biến tính. Epitop thường bao gồm ít nhất 3, và thường nhiều hơn, ít nhất 5 hoặc 8-10 axit amin trong cấu tạo không gian đặc trưng. Phương pháp xác định cấu tạo không gian của các epitop bao gồm, ví dụ, tinh thể học tia x và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều. Xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Sự cạnh tranh giữa các kháng thể được xác định bởi thử nghiệm trong đó kháng thể trong thử nghiệm ức chế liên kết đặc hiệu của kháng thể tham chiếu với kháng nguyên chung (xem, ví dụ, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Kháng thể thử nghiệm cạnh tranh với kháng thể tham chiếu nếu lượng dư của kháng thể thử nghiệm (ví dụ, ít nhất 2x, 5x, 10x, 20x hoặc 100x) ức chế liên kết của kháng thể tham chiếu ít nhất 50% khi được đo trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh. Một số kháng thể thử nghiệm ức chế liên kết của các kháng thể tham chiếu ít nhất 75%, 90% hoặc 99%. Kháng thể được xác định bằng thử nghiệm cạnh tranh (kháng thể cạnh tranh) bao gồm kháng thể liên kết với cùng một epitop như kháng thể tham chiếu và kháng thể liên kết với epitop liền kề đủ gần với epitop được liên kết bởi kháng thể tham chiếu để trở ngại về mặt không gian xảy ra.

Thuật ngữ “được dụng” nghĩa là chất mang, chất pha loãng, tá dược, hoặc chất phụ trợ tương thích với các thành phần khác của chế phẩm và gần như không gây hại cho đối tượng nhận chúng và/hoặc chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất phụ trợ này được chấp thuận hoặc có thể chấp thuận bởi FDA để được bao gồm trong dược phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa cho người.

Thuật ngữ “đối tượng” bao gồm người và các đối tượng là động vật có vú khác nhận phương pháp điều trị phòng ngừa hoặc trị liệu.

Nhằm mục đích phân loại các thay thế axit amin thành bảo toàn hoặc không bảo toàn, các axit amin được chia nhóm như sau: Nhóm I (chuỗi bên kỵ nước): met, ala, val, leu, ile; Nhóm II (chuỗi bên ưa nước trung tính): cys, ser, thr; Nhóm III (chuỗi bên có tính axit): asp, glu; Nhóm IV (chuỗi bên có tính bazơ): asn, gln, his, lys, arg; Nhóm V (các gốc ảnh hưởng đến hướng chuỗi): gly, pro; và Nhóm VI (chuỗi bên thơm): trp, tyr, phe. Các thay thế bảo toàn bao gồm các thay thế giữa các axit amin trong cùng một lớp. Các thay thế không bảo toàn cấu thành sự trao đổi thành viên của một trong số các lớp này đối với thành viên của lớp khác.

Phần trăm độ đồng nhất trình tự được xác định với các trình tự kháng thể được sắp thẳng tối đa bởi quy ước đánh số Kabat. Sau khi sắp thẳng, nếu vùng kháng thể chủ thể (ví dụ, toàn bộ vùng biến đổi trưởng thành của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ) được so sánh với cùng một vùng của kháng thể tham chiếu, phần trăm độ đồng nhất trình tự giữa vùng kháng thể chủ thể và kháng thể tham chiếu là số vị trí bị chiếm chỗ bởi cùng một axit amin trong cả vùng kháng thể chủ thể và kháng thể tham chiếu chia cho tổng số tổng số vị trí được sắp thẳng của hai vùng, với khoảng trống không được tính, nhân với 100 để chuyển sang phần trăm.

Chế phẩm hoặc phương pháp “chứa” hoặc “bao gồm” một hoặc nhiều yếu tố được nêu có thể bao gồm các yếu tố khác không được nêu ra cụ thể. Ví dụ, chế phẩm mà “chứa” hoặc “bao gồm” kháng thể có thể chứa một mình kháng thể hoặc kết hợp với các thành phần khác.

Chỉ định khoảng giá trị bao gồm tất cả các số nguyên nằm trong hoặc xác định khoảng, và tất cả các khoảng con được xác định bởi các số nguyên nằm trong khoảng.

Trừ khi rõ ràng ngược lại từ bản mô tả, thuật ngữ “khoảng” bao gồm các biến đổi ít, như các giá trị nằm trong mép chuẩn của sai số của phép đo (ví dụ, SEM) của giá trị được nêu.

Ý nghĩa thống kê là $p < 0,05$.

Kháng thể được làm cho giống của người là kháng thể được xử lý di truyền trong đó các CDR từ kháng thể “thể cho” không phải người được ghép vào trình tự kháng thể

“thể nhận” của người (xem, ví dụ, Queen, US 5,530,101 và 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; và Foote, US 6,881,557). Trình tự kháng thể “thể nhận” có thể là, ví dụ, trình tự kháng thể trưởng thành của người, hỗn hợp các trình tự này, trình tự liên ứng của trình tự kháng thể của người, hoặc trình tự vùng dòng mầm. Do đó, kháng thể được làm cho giống của người là kháng thể có CDR toàn bộ hoặc về cơ bản là từ kháng thể thể cho và trình tự khung vùng biến đổi và vùng không đổi, nếu có mặt, toàn bộ hoặc về cơ bản là từ trình tự kháng thể của người. CDR trong kháng thể được làm cho giống của người về cơ bản là từ CDR tương ứng trong kháng thể không phải của người khi ít nhất 85%, 90%, 95% hoặc 100% của các gốc tương ứng (như được xác định bởi Kabat) là giống nhau giữa các CDR tương ứng. Trình tự khung vùng biến đổi của chuỗi kháng thể hoặc vùng không đổi của chuỗi kháng thể về cơ bản là từ trình tự khung vùng biến đổi của người hoặc vùng không đổi của người, theo thứ tự, khi ít nhất 85%, 90%, 95% hoặc 100% các gốc tương ứng được xác định bởi Kabat là giống với trình tự thể nhận của người.

Mô tả vắn tắt trình tự

SEQ ID NO:1-4 là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành và các CDR-H1, H2 và H3 của kháng thể của HB-10716.

SEQ ID NO:5-8 là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành và các CDR-L1, L2 và L3 của kháng thể của HB-10716.

SEQ ID NO:9-12 là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành và các CDR-H1, H2 và H3 của chuỗi nặng AH1 được làm cho giống của người.

SEQ ID NO:13-16 là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành và các CDR-H1, H2 và H3 của chuỗi nặng AH2 được làm cho giống của người.

SEQ ID NO:17-20 là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành và các CDR-H1, H2 và H3 của chuỗi nặng AH3 được làm cho giống của người.

SEQ ID NO:21-24 là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành và các CDR-H1, H2 và H3 của chuỗi nặng AH4 được làm cho giống của người.

SEQ ID NO:25-28 là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành và các CDR-H1, H2 và H3 của chuỗi nặng AH5 được làm cho giống của người.

SEQ ID NO:29 là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của AMG191.

SEQ ID NO:30 là trình tự vùng biến đổi của IGHV1-46*01.

SEQ ID NO:31-34 là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành và các CDR-L1, L2 và L3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ AL1 được làm cho giống của người.

SEQ ID NO:35-38 là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành và các CDR-L1, L2 và L3 của chuỗi nhẹ AL2 được làm cho giống của người.

SEQ ID NO:39 là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của AMG191.

SEQ ID NO:40-43 là trình tự vùng biến đổi và ba CDR-L1, L2 và L3, của IGKV4-1*01.

SEQ ID NO:44-50 là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của các chuỗi nặng được làm cho giống của người NH, NH1, NH2, NH3, NH4 và NH5 và IGHV3-23*01.

SEQ ID NO:51-54 là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của chuỗi nhẹ được làm cho giống của người NL, NL1, NL2, và IGKV2-28*01.

I. Tổng quát

Sáng chế đề xuất kháng thể liên kết đặc hiệu với c-Kit của người (Swiss Prot P10721). Kháng thể là dạng được làm cho giống của người của kháng thể kháng c-Kit của chuột đã được bộc lộ trước đó được tạo ra bởi thể lai được ký gửi dưới tên là HB-10716, mà có vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trưởng thành được nêu lần lượt trong SEQ ID NO:1 và 5. Kháng thể của chuột này trước đó đã được làm cho giống của người ở dạng AMG191 (xem US 7915391). CDR theo Kabat của AMG191 là giống với kháng thể của chuột từ đó nó được tạo ra. AMG191 có bán trên thị trường từ Creative Biolabs.

Kháng thể theo sáng chế có CDR về cơ bản là từ kháng thể của chuột được ký gửi với tên là HB-10716 được ghép vào trình tự người nhận, tùy ý với các thay thế ở các vị trí nhất định như được mô tả thêm dưới đây.

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành gồm các CDR H1, H2 và H3 được nêu trong SEQ ID NO:1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành gồm các CDR L1, L2 và L3 được nêu trong SEQ ID NO:5 với điều kiện là có mặt ít nhất một thay thế gốc CDR. Các CDR H1, H2 và H3 tốt hơn là chứa các SEQ ID NO:2-4, lần lượt, và các CDR L1, L2 và L3 tốt hơn là chứa các SEQ ID NO:6-8 (nghĩa là, như được

xác định bởi Kabat) với điều kiện là có mặt ít nhất một thay thế CDR. Thay thế CDR tốt hơn là được chọn từ N thành A ở vị trí 60 của chuỗi nặng, K thành Q ở vị trí 64 của chuỗi nặng và N thành Q ở vị trí 30 của chuỗi nhẹ, các vị trí được đánh số theo Kabat. Một, hai hoặc cả ba trong số các thay thế này có thể có mặt. Một số kháng thể bao gồm các thay thế ở vị trí 64 của chuỗi nặng và vị trí 30 của chuỗi nhẹ. Một số kháng thể bao gồm các thay thế ở vị trí 60 của chuỗi nặng, vị trí 64 của chuỗi nặng và vị trí 30 của chuỗi nhẹ. Một số kháng thể bao gồm các thay thế ở vị trí 60 của chuỗi nặng và vị trí 30 của chuỗi nhẹ. Một số kháng thể bao gồm các thay thế ở vị trí 60 của chuỗi nặng và vị trí 64 của chuỗi nặng. Một số kháng thể không có thay thế nào của CDR Kabat ngoại trừ các thay thế ở vị trí 60 và 64 của chuỗi nặng và vị trí 30 của chuỗi nhẹ riêng lẻ hoặc ở dạng kết hợp đã nêu. Nếu các thay thế khác bất kỳ của CDR Kabat có mặt, ưu tiên có mặt không nhiều hơn 1, 2, 3, 4 hoặc 5, các thay thế khác này.

Một vài trong số các kháng thể theo sáng chế khác với AMG191 bởi sự có mặt của ít nhất một thay thế của gốc CDR so với gốc có mặt tại AMG191. Thay thế được ưu tiên là N thành A ở vị trí 60 của chuỗi nặng, K thành Q ở vị trí 64 của chuỗi nặng và N thành Q ở vị trí 30 của chuỗi nhẹ, các vị trí được đánh số theo Kabat. Một, hai hoặc cả ba trong số các thay thế này có thể có mặt. Một số kháng thể bao gồm các thay thế ở vị trí 64 của chuỗi nặng và vị trí 30 của chuỗi nhẹ. Một số kháng thể bao gồm các thay thế ở vị trí 60 của chuỗi nặng, vị trí 64 của chuỗi nặng và vị trí 30 của chuỗi nhẹ. Một số kháng thể bao gồm các thay thế ở vị trí 60 của chuỗi nặng và vị trí 30 của chuỗi nhẹ. Một số kháng thể bao gồm các thay thế ở vị trí 60 của chuỗi nặng và vị trí 64 của chuỗi nặng. Một số kháng thể không có thay thế so với CDR Kabat của AMG191 ngoại trừ các thay thế ở vị trí 60 và 64 của chuỗi nặng và vị trí 30 của chuỗi nhẹ riêng lẻ hoặc ở dạng kết hợp đã nêu. Nếu các thay thế khác bất kỳ của CDR Kabat có mặt, ưu tiên có mặt không nhiều hơn 1, 2, 3, 4 hoặc 5 thay thế khác này.

Các thay thế CDR ở vị trí 60 và 64 của chuỗi nặng và vị trí 30 của chuỗi nhẹ riêng lẻ và ở dạng kết hợp có thể đem lại ái lực liên kết tăng đối với c-Kit của người. Các thay thế còn là sự thay thế gốc của chuột bằng gốc dòng mầm của người về vị trí, do đó các thứ khác làm tăng ngang bằng đặc điểm con người của kháng thể được làm cho giống của người. Bảng 1 dưới đây so sánh các gốc chiếm vị trí 60 và 64 của chuỗi nặng và vị trí 30 của chuỗi nhẹ trong kháng thể của chuột được ký gửi với tên là HB-10716, AMG191 và ba trong số kháng thể được làm cho giống của người này:

Bảng 1

Gốc	HB-10716	AMG191	HF11	HF12	HF112
H60	N	N	A	N	A
H64	K	K	K	Q	Q
L30	N	N	Q	Q	Q

Ngoài ra hoặc theo cách khác, một vài trong số các kháng thể được làm cho giống của người theo sáng chế khác các kháng thể của AMG191 bởi sự có mặt của các trình tự khung vùng biến đổi khác nhau. AMG191 thu được bằng cách ghép trình tự CDR của chuột vào khung dòng mầm của IGHV1-46*01 IGKV4-1*01 đối với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, lần lượt. Phần bộc lộ này đề xuất việc ghép các CDR vào khung vùng biến đổi chuỗi nặng của IGH3-23*01 và khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ của IGKV2-28*01. Được thấy là các khung này đem lại ái lực liên kết cao hơn so với ái lực liên kết của AMG191. Một số kháng thể ưu tiên theo sáng chế bao gồm khung vùng biến đổi chuỗi nặng dựa trên IGHV1-46*01 kết hợp với cùng các đột biến ngược như trong vùng biến đổi chuỗi nặng của AMG191 và khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ dựa trên IGKV2-28*01. Sự kết hợp các khung này sẽ kết hợp các ưu điểm của ái lực được cải thiện so với AMG191 với sự biểu hiện được cải thiện so với kháng thể có sự kết hợp của khung vùng biến đổi chuỗi nặng của IGH3-23*01 và khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ của IGKV2-28*01.

Vì vậy, một số kháng thể ưu tiên theo sáng chế có vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự của bất kỳ trong số các chuỗi được chỉ định SEQ ID NO:13, 17 hoặc 21 tương ứng với AH2, AH3, và AH4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:53 tương ứng với NL2. Các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng khác nhau bởi việc có các thay thế CDR chỉ ở vị trí 60 của chuỗi nặng, chỉ ở vị trí 64 của chuỗi nặng, hoặc vị trí 60 và 64 của chuỗi nặng, đều theo cách đánh số Kabat. Khác với các thay thế CDR, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng là giống với vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của AMG191. Trình tự chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:13, 17 và 21 bao gồm thay thế khung vùng biến đổi (nghĩa là, gốc của người nhận với thể cho là chuột) ở vị trí Kabat 71 (R thành A), 73 (T thành K) và 78 (V thành

A). Có thay thế bổ sung ở vị trí 69 từ M thành I.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được nêu trong SEQ ID NO:53 có thay thế CDR ở vị trí 30. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được nêu trong SEQ ID NO:53 cũng khác với vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của AMG191 ở một vài vị trí trong khung vùng biến đổi như sau do sự lựa chọn thể nhận khác nhau:

Vị trí 9 bị chiếm chỗ bởi L

Vị trí 12 bị chiếm chỗ bởi P

Vị trí 14 bị chiếm chỗ bởi T

Vị trí 15 bị chiếm chỗ bởi P

Vị trí 18 bị chiếm chỗ bởi P

Vị trí 20 bị chiếm chỗ bởi S

Vị trí 22 bị chiếm chỗ bởi S

Vị trí 37 bị chiếm chỗ bởi L

Vị trí 43 bị chiếm chỗ bởi S

Vị trí 45 bị chiếm chỗ bởi Q

Vị trí 74 bị chiếm chỗ bởi K

Vị trí 77 bị chiếm chỗ bởi R

Vị trí 78 bị chiếm chỗ bởi V

Vị trí 79 bị chiếm chỗ bởi E

Vị trí 84 bị chiếm chỗ bởi G.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được nêu trong SEQ ID NO:53 không chứa bất kỳ đột biến ngược nào của khung vùng biến đổi với các gốc của chuột từ dòng mầm của người.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là biến thể của trình tự được lấy làm ví dụ. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có độ đồng nhất ít nhất 85%, 90%, 95%, 98 hoặc 99% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự được nêu trong SEQ ID NO:13, 17 hoặc 21 và vùng

biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85%, 90%, 95%, 98% hoặc 99% với SEQ ID NO:53. Sự thay đổi bất kỳ từ các trình tự đã chỉ định tốt hơn là nằm ngoài các CDR như được xác định bởi Kabat. Sự thay đổi cũng tốt hơn là không nằm ở vị trí khung vùng biến đổi của các đột biến ngược trong trình tự quy định (vị trí 71, 73 và 78 theo cách đánh số Kabat). Ở một số kháng thể, thay thế bất kỳ không phải ở vị trí 69 của chuỗi nặng theo cách đánh số Kabat. Ở một số kháng thể, biến đổi nằm ở vị trí khung vùng biến đổi khác các vị trí tại đó SEQ ID NO:53 khác với vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của AMG191. Ở các kháng thể khác, thay đổi nằm ở vị trí khung vùng biến đổi tại đó SEQ ID NO:53 khác với vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của AMG191, tùy ý kết hợp với (các) vị trí khác trong khung vùng biến đổi. Ở một số kháng thể, ít nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15 trong số các gốc khung vùng biến đổi tại đó SEQ ID NO:53 khác với khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của AMG191 vẫn còn. Ở một số kháng thể, sự thay đổi là bởi các thay thế bảo toàn. Ở một số kháng thể, Q ở vị trí 1 của chuỗi nặng có thể được thay thế bằng E làm giảm khả năng chuyển hóa pyroglutamat (Liu, et al., 2011, J. Biol. Chem., 286: 11211–11217). Sự chuyển hóa axit glutamic (E) thành pyroglutamat (pE) xảy ra chậm hơn so với từ glutamin (Q). Do sự mất amin bậc một trong sự chuyển hóa glutamin thành pE, kháng thể có tính axit hơn. Sự chuyển hóa không hoàn toàn tạo ra tính không đồng nhất trong kháng thể mà có thể được quan sát dưới dạng các pic sử dụng phương pháp phân tích dựa vào điện tích. Các khác biệt về tính đồng nhất có thể chỉ ra việc thiếu sự kiểm soát quy trình.

Kháng thể có thể được kiểm tra ái lực liên kết với c-Kit của người, ADCP, ADCC và sự ức chế tăng sinh HSPC do SCF gây ra sử dụng các thử nghiệm được cung cấp trong các ví dụ. Kháng thể cũng có thể được sàng lọc trong các mẫu động vật, như được mô tả trong WO2016033201. Kháng thể ưu tiên theo sáng chế có ái lực liên kết với c-Kit của người được tăng cường, ADCP được tăng cường và/hoặc ADCC được tăng cường và/hoặc sự ức chế tăng sinh HSPC do SCF gây ra được tăng cường được đo bằng cách sử dụng các thử nghiệm này đối với AMG191 hoặc dạng IgG1 của người của nó. Kháng thể ưu tiên còn ức chế sự liên kết của c-Kit của người với phối tử yếu tố tế bào gốc của người của nó.

Sáng chế còn đề xuất công cụ tăng cường liên kết với c-Kit của người và/hoặc ADCP và/hoặc ADCC dựa vào tế bào biểu hiện c-Kit của người so với AMG191 hoặc

dạng IgG1 của người của nó, trong đó sự tăng cường được đo như trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Công cụ lấy ví dụ là kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự bất kỳ trong số các trình tự được nêu trong SEQ ID NO:13, 17 hoặc 21 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được nêu trong SEQ ID NO:53 với vùng không đổi chuỗi nặng IgG1 của người và vùng không đổi chuỗi nhẹ kappa của người. Thay thế so với AMG191 trong các CDR là từ N thành A ở vị trí 60 của chuỗi nặng, K thành Q ở vị trí 64 của chuỗi nặng và/hoặc N thành Q ở vị trí 30 của chuỗi nhẹ góp phần tăng cường các tính chất của phương thức lấy làm ví dụ này. Công cụ này có thể được kết hợp vào được phẩm với chất mang được tính.

Kháng thể có thể là hoặc không phải là đối tượng cải biến sau dịch mã, như glycosyl hóa, phụ thuộc vào các điều kiện biểu hiện hoặc sự lựa chọn vùng không đổi trong số các yếu tố khác.

II. Lựa chọn vùng không đổi

Vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mô tả ở trên có thể được liên kết với ít nhất một phần vùng không đổi của người. Việc lựa chọn vùng không đổi phụ thuộc, một phần, vào việc liệu độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, sự thực bào phụ thuộc kháng thể và/hoặc độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể có là mong muốn hay không. Ví dụ, các isotyp IgG1 và IgG3 của người có độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể và các isotyp IgG2 và IgG4 của người thì không. IgG1 và IgG3 của người cũng gây ra chức năng tác động qua trung gian tế bào mạnh hơn so với IgG2 và IgG4 của người. IgG1 của người được ưu tiên với kháng thể theo sáng chế. Vùng không đổi chuỗi nhẹ có thể là lambda hoặc kappa.

Một hoặc một vài axit amin ở đầu tận amino hoặc carboxy của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng, như lysin đầu tận C của chuỗi nặng, có thể bị thiếu hoặc được tạo dẫn xuất trong một phần hoặc tất cả các phân tử. Thay thế có thể được tạo ra trong vùng không đổi để giảm hoặc tăng chức năng tác động như độc tính tế bào qua trung gian bổ thể hoặc ADCC hoặc loại bỏ vị trí glycosyl hóa (xem, ví dụ, Winter et al., Patent Mỹ số 5,624,821; Tso et al., Patent Mỹ số 5,834,597; và Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), hoặc để kéo dài chu kỳ bán rã ở người (xem, ví dụ, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Các thay thế lấy ví dụ bao gồm Gln ở vị trí 250 và/hoặc Leu ở vị trí 428 (đánh số EU được sử dụng trong đoạn này đối với vùng không đổi) để

tăng chu kỳ bán rã của kháng thể. M252Y/S254T/T256E cũng làm tăng chu kỳ bán rã như thay thế N434A hoặc S, T250Q, và V3089P ở bất kỳ hoặc tất cả các vị trí 234, 235, 236 và/hoặc 237 làm giảm ái lực đối với thụ thể Fc γ , đặc biệt là thụ thể Fc γ RI (xem, ví dụ, US 6,624,821). Bất kỳ trong số các thay thế sau đây làm tăng chức năng tác động: F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, S298A/E333A/K334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, và S298A/E333A/K334A.

Vùng không đổi của người thể hiện biến đổi dị kiểu (allotyp) và biến đổi isoallotyp giữa các cá thể khác nhau, tức là, vùng không đổi có thể khác ở các cá thể khác nhau ở một hoặc nhiều vị trí đa hình. Isoallotyp khác allotyp ở chỗ huyết thanh nhận diện isoallotyp liên kết với vùng không đa hình của một hoặc nhiều isotyp khác.

III. Biểu hiện của kháng thể tái tổ hợp

Kháng thể được làm cho giống của người thường được tạo ra bởi sự biểu hiện tái tổ hợp. Cấu trúc polynucleotit tái tổ hợp thường bao gồm trình tự điều khiển sự biểu hiện được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa của chuỗi kháng thể, bao gồm yếu tố điều khiển sự biểu hiện kết hợp tự nhiên hoặc khác loại, như trình tự khởi đầu. Trình tự điều khiển sự biểu hiện có thể là hệ trình tự khởi đầu trong các vector có khả năng biến nạp hoặc chuyển nhiễm vào tế bào chủ nhân chuẩn hoặc nhân sơ. Khi vector được kết hợp vào vật chủ thích hợp, vật chủ này được giữ ở các điều kiện thích hợp để biểu hiện trình tự nucleotit mức độ cao và gom và tinh sạch kháng thể phản ứng chéo.

Các vector biểu hiện này thường có thể sao chép trong sinh vật chủ hoặc ở dạng episom hoặc ở dạng phần nguyên của ADN nhiễm sắc thể vật chủ. Thông thường, vector biểu hiện chứa gen đánh dấu chọn lọc, ví dụ, kháng ampicilin hoặc kháng hygromycin, để cho phép phát hiện các tế bào được biến nạp với trình tự ADN mong muốn.

E. coli là một vật chủ kiểu tế bào nhân sơ hữu ích để biểu hiện kháng thể, đặc biệt là các mảnh kháng thể. Các vi sinh vật, như nấm men, cũng hữu ích để biểu hiện. *Saccharomyces* là vật chủ nấm men có vector thích hợp có trình tự điều khiển sự biểu hiện, nguồn gốc sao chép, trình tự kết thúc, và tương tự khi mong muốn. Trình tự khởi đầu điển hình bao gồm 3-phosphoglyxerat kinaza và các enzym phân hủy đường khác. Trình tự khởi đầu ở nấm men có khả năng cảm ứng bao gồm, trong số các trình tự khác, trình tự khởi đầu từ dehydrogenaza rượu, isoxytocrom C, và các enzym chịu trách nhiệm

cho việc sử dụng maltoza và galactoza.

Các tế bào của động vật có vú có thể được sử dụng để biểu hiện các mảnh nucleotit mã hóa globulin miễn dịch hoặc các mảnh của nó. Xem Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Nhiều dòng tế bào chủ thích hợp có khả năng tiết protein khác loại nguyên vẹn đã được phát triển, và bao gồm dòng tế bào CHO, các loại dòng tế bào COS khác nhau, tế bào HeLa, tế bào HEK293, tế bào L, và u tủy không sinh kháng thể bao gồm Sp2/0 và NS0. Các tế bào có thể không phải của người. Vectơ biểu hiện đối với các tế bào này có thể bao gồm trình tự điều khiển sự biểu hiện, như nguồn gốc sao chép, trình tự khởi đầu, gen tăng cường (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), và các vị trí thông tin xử lý cần thiết, như vị trí liên kết ribosom, vị trí nối ARN, vị trí polyadenyl hóa, và trình tự kết thúc phiên mã. Trình tự điều khiển sự biểu hiện có thể bao gồm trình tự khởi đầu có nguồn gốc từ gen nội sinh, cytomegalovirut, SV40, adenovirut, virut u nhú ở bò, và tương tự. Xem Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Theo cách khác, trình tự mã hóa kháng thể có thể được kết hợp vào các gen chuyển để đưa vào bộ gen của động vật chuyển gen và sau đó biểu hiện trong sữa của động vật chuyển gen (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,741,957; Patent Mỹ số 5,304,489; và Patent Mỹ số 5,849,992). Gen chuyển thích hợp bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng được liên kết có điều khiển với trình tự khởi đầu và gen tăng cường từ gen cụ thể của tuyến vú, như casein hoặc beta lactoglobulin.

Vectơ chứa mảnh ADN quan tâm có thể được chuyển vào tế bào chủ bằng nhiều phương pháp phụ thuộc vào loại vật chủ tế bào. Ví dụ, sự chuyển nhiễm canxi clorua thường được sử dụng cho tế bào nhân sơ, trong khi xử lý canxi phosphat, xung điện, bao trong liposom, vi tiêm, hoặc chuyển nhiễm dựa vào virut có thể được sử dụng cho các vật chủ tế bào khác. Các phương pháp khác được dùng để biến nạp tế bào động vật có vú bao gồm sử dụng polybren, dung hợp thể nguyên sinh, liposom, xung điện, và vi tiêm. Để tạo ra động vật chuyển gen, gen chuyển có thể được vi tiêm vào noãn bào được thụ tinh hoặc có thể được kết hợp vào bộ gen của tế bào gốc trong phôi, và nhân của các tế bào này được chuyển vào noãn bào đã khoét nhân.

Khi đưa vectơ mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể vào canh trường tế bào, các nhóm tế bào có thể được sàng lọc về năng suất tăng trưởng và chất lượng sản

phẩm trong môi trường không có huyết thanh. Các nhóm tế bào tạo ra ở phía trên sau đó có thể được đưa đi tách dòng tế bào đơn dựa vào FACS để tạo ra dòng đơn dòng. Sản lượng cụ thể trên 50 pg hoặc 100 pg mỗi tế bào một ngày, mà tương ứng với chuẩn độ sản phẩm lớn hơn 7,5 g/L canh trường, có thể được sử dụng. Kháng thể được tạo ra bởi các dòng tế bào đơn có thể được thử nghiệm độ đục, tính chất lọc, PAGE, IEF, quét UV, HP-SEC, bản đồ cacbohydrat-oligosacarit, khối phổ, và thử nghiệm liên kết, như ELISA hoặc Biacore. Dòng được chọn sau đó có thể được chất vào nhiều lọ và bảo quản cấp đông để sử dụng cho lần sau.

Khi được biểu hiện, kháng thể có thể được tinh sạch theo quy trình chuẩn trong lĩnh vực, bao gồm bắt giữ protein A, tinh sạch HPLC, sắc ký cột, điện di gel và tương tự (xem, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Phương pháp để sản xuất thương mại kháng thể có thể được sử dụng, bao gồm tối ưu hóa codon, lựa chọn trình tự khởi đầu, lựa chọn yếu tố phiên mã, lựa chọn trình tự kết thúc, tách dòng tế bào đơn không chứa huyết thanh, chất đông tế bào, sử dụng gen đánh dấu chọn lọc để khuếch đại số lượng bản sao, trình tự kết thúc CHO, hoặc cải thiện chuẩn độ protein (xem, ví dụ, US 5,786,464; US 6,114,148; US 6,063,598; US 7,569,339; W02004/050884; W02008/012142; W02008/012142; W02005/019442; W02008/107388; W02009/027471; và US 5,888,809).

IV. Axit nucleic

Sáng còn đề xuất axit nucleic mã hóa bất kỳ trong số chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mô tả ở trên. Tùy ý, các axit nucleic này còn mã hóa peptit tín hiệu và có thể được biểu hiện với peptit tín hiệu liên kết với trình tự mã hóa vùng không đổi của axit nucleic có thể được liên kết có điều khiển với trình tự điều hòa để đảm bảo sự biểu hiện của trình tự mã hóa, như trình tự khởi đầu, gen tăng cường, vị trí liên kết ribosom, tín hiệu kết thúc phiên mã, và tương tự. Axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể xuất hiện ở dạng được phân lập hoặc có thể được tách dòng vào một hoặc nhiều vector. Axit nucleic có thể được tổng hợp bằng, ví dụ, tổng hợp pha rắn hoặc PCR các oligonucleotit xếp chồng. Axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được kết hợp thành một axit nucleic liên tục, ví dụ, trong vector biểu hiện, hoặc có thể tách rời, ví dụ, mỗi axit được tách dòng vào vector biểu hiện riêng của nó.

V. Kháng thể liên hợp

Kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp vào các gốc gây độc tế bào hoặc kìm hãm tế bào để tạo ra cơ chế bổ sung độc tính tế bào.

Một số kháng thể này có thể được cải biến để đóng vai trò làm độc tố miễn dịch. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,194,594. Ví dụ, rixin, độc tố tế bào có nguồn gốc từ thực vật, có thể được kết hợp với kháng thể bằng cách sử dụng chất phản ứng hai chức S-axetylmercaptosuxinic anhydrit đối với kháng thể và suxinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat đối với rixin. Xem Pietersz et al., *Cancer Res.* 48(16):4469-4476 (1998). Sự kết hợp này dẫn đến sự mất hoạt tính liên kết chuỗi B của rixin, trong khi không ảnh hưởng đến khả năng gây độc của chuỗi A của rixin cũng như hoạt tính của kháng thể. Tương tự, saporin, chất ức chế cụm ribosom, có thể được kết hợp với kháng thể thông qua liên kết disulfua giữa các nhóm sulfhydryl được cài xen bằng phương pháp hóa học. Xem Polito et al., *Leukemia* 18:1215-1222 (2004).

Một số kháng thể như vậy có thể được liên kết với chất đồng vị phóng xạ. Ví dụ về các chất đồng vị phóng xạ bao gồm, ví dụ, yttri90 (90Y), indi111 (111In), 131I, 99mTc, bạc phóng xạ-111, bạc phóng xạ-199, và Bismut213. Liên kết của các chất đồng vị phóng xạ với kháng thể có thể được thực hiện với các chelat hai chức năng thông thường. Đối với liên kết của bạc phóng xạ-111 và bạc phóng xạ-199, thành phần liên kết gốc lưu huỳnh có thể được sử dụng. Xem Hazra et al., *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Liên kết của các chất đồng vị phóng xạ bạc có thể liên quan đến việc làm giảm globulin miễn dịch với axit ascorbic. Đối với các chất đồng vị phóng xạ như 111In và 90Y, ibritumomab tiuxetan có thể được sử dụng và sẽ phản ứng với các chất đồng vị này để tạo ra lần lượt 111In-ibritumomab tiuxetan và 90Y-ibritumomab tiuxetan. Xem Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

Một số kháng thể như vậy có thể được liên hợp với thuốc hóa trị liệu có độc tính như maytansin, geldanamycin, chất ức chế tubulin như chất liên kết tubulin (ví dụ, auristatin), hoặc chất liên kết rãnh nhỏ như calicheamixin.

VI. Ứng dụng trị liệu

Kháng thể theo sáng chế hoặc được phẩm kết hợp kháng thể này có thể được sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh khác nhau. Ví dụ, các kháng thể này có thể được sử dụng để cắt bỏ các tế bào gốc tạo máu và tế bào tiền thân (HSPC) nội sinh ở đối tượng có nhu cầu. Cắt bỏ HSPC nội sinh là bước đầu trong liệu pháp thay tế bào gốc. Liệu

pháp thay tế bào gốc thường bao gồm việc giảm hoặc loại bỏ HSPC nội sinh, mà bị khiếm khuyết ở khía cạnh nào đó, và thay thế chúng bằng HSPC thay thế. HSPC thay thế có thể là tự rụng, ngoại sinh hoặc ghép khác loại. HSPC nội sinh có thể bị khiếm khuyết do sự đột biến di truyền làm suy giảm chức năng hoặc sự biểu hiện (ví dụ, bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm hoặc bệnh thiếu máu địa trung hải), do ung thư máu, hoặc do sự tổn thương từ phép hóa trị liệu dùng trong điều trị bệnh ung thư. HSPC nội sinh cũng có thể được thay thế kết hợp với sự ghép cơ quan vì HSPC nội sinh sẽ dẫn đến sự tấn công miễn dịch của mô ghép.

Kháng thể kháng c-Kit cũng có thể được sử dụng trong điều trị các bệnh ung thư biểu hiện c-Kit. Các bệnh ung thư này bao gồm ung thư máu, như AML và các khối u rắn, như ung thư tế bào mast, ung thư thể đệm tinh hoàn, ung thư thể đệm dạ dày ruột, u melamin, ung thư vú và phổi. Sự biểu hiện của c-Kit tốt hơn là ở mức cao hơn so với mô được kết hợp với tế bào kiểm soát thông thường như được xác định bởi thử nghiệm hóa mô miễn dịch.

Kháng thể được sử dụng trong chế độ hiệu quả nghĩa là liều dùng, đường dùng và tần suất sử dụng mà đạt được mục đích mong muốn, như giảm HSPC nội sinh hoặc tế bào ung thư biểu hiện c-Kit. Trong một số trường hợp, hiệu quả có thể được quan sát ở từng bệnh nhân so với các đối chứng lịch sử hoặc trải nghiệm trong quá khứ ở cùng một bệnh nhân. Trong các trường hợp khác, hiệu quả có thể được chứng minh trong thử nghiệm tiền lâm sàng hoặc lâm sàng trong quần thể bệnh nhân được điều trị so với quần thể đối chứng gồm các bệnh nhân không được điều trị.

Liều lấy ví dụ là ít nhất 0,05 mg/kg và lên đến 10 mg/kg ví dụ, khoảng 0,05-10 mg/kg, hoặc 0,1 đến 5 mg/kg hoặc 5-750 mg dưới dạng liều cố định. Liều dùng phụ thuộc vào tình trạng bệnh của bệnh nhân và đáp ứng với lần điều trị trước, nếu có, liệu việc điều trị là phòng ngừa hay trị liệu và liệu rối loạn là cấp tính hay mạn tính, trong số các yếu tố khác.

Việc sử dụng có thể là ngoài đường tiêu hóa, trong tĩnh mạch, đường miệng, dưới da, trong động mạch, trong sọ, trong vỏ, trong màng bụng, khu trú, trong mũi hoặc trong cơ. Một số kháng thể có thể được đưa vào hệ tuần hoàn bằng cách dùng trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Việc dùng trong tĩnh mạch có thể là, ví dụ, bằng cách truyền trong khoảng thời gian như 30-90 phút.

Kháng thể có thể được sử dụng một lần hoặc nhiều lần. Nếu nhiều lần, khoảng cách giữa các lần có thể là ví dụ, hàng ngày, hàng tuần, hai tuần một, mỗi tháng hoặc mỗi quý.

VI. Dược phẩm và phương pháp sử dụng

Dược phẩm kết hợp kháng thể theo sáng chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể là vô trùng và gần như đẳng trương (250-350 mOsm/kg nước) và được sản xuất trong điều kiện GMP. Dược phẩm có thể được tạo ra ở dạng liều đơn vị (nghĩa là, liều cho một lần dùng). Dược phẩm có thể được bào chế sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất phụ trợ dược dụng. Dạng bào chế phụ thuộc vào đường dùng được chọn. Để tiêm, kháng thể có thể được bào chế trong dung dịch nước, ví dụ, trong đệm tương thích sinh lý như dung dịch Hank, dung dịch Ringer, hoặc nước muối sinh lý hoặc đệm axetat (để làm giảm sự không thoải mái ở vị trí tiêm). Dung dịch có thể chứa chất công thức như chất tạo huyền phù, chất ổn định và/hoặc chất phân tán. Theo cách khác, kháng thể có thể ở dạng đông khô để tạo cấu trúc với chất dẫn thuốc thích hợp, ví dụ, nước vô trùng không chứa pyrogen, trước khi sử dụng.

Các chế độ dùng có thể được sử dụng kết hợp với chất khác có hiệu quả trong điều trị tình trạng bệnh đang được điều trị (ví dụ, chất hóa trị liệu hoặc chất sinh học để điều trị ung thư).

Sau khi điều trị, tình trạng của đối tượng được điều trị có thể được giám sát đối với các thay đổi đáp ứng với việc điều trị (ví dụ, số lượng HSPC nội sinh giảm) hoặc số lượng tế bào ung thư biểu hiện c-Kit giảm.

VII. Sử dụng khác

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện c-Kit bằng thử nghiệm miễn dịch, như ELISA, thẩm tách Western, hoặc hóa mô miễn dịch. Thử nghiệm này có thể hữu ích trong việc xác định xem ung thư biểu hiện c-Kit có làm cho nó có thể phù hợp để điều trị với phương pháp theo sáng chế hay không. Kháng thể cũng có thể được sử dụng để làm giàu HSPC biểu hiện c-Kit bằng sắc ký ái lực.

Ví dụ thực hiện sáng chế

1. Nguyên liệu và phương pháp

Tách dòng kháng thể V và đọc trình tự. Dòng tế bào thể lai kháng c-Kit của người

được mua từ ATCC (HB-10716). Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và chuỗi nhẹ (VL) được tách dòng và đọc trình tự bằng Genscript.

Làm cho kháng thể giống của người và thể CDR. Việc làm cho HB-10716 giống của người được thực hiện bằng cách cài các gốc CDR từ kháng thể của chuột lên trên khung dòng mầm của người (FR). Tóm lại, VH của chuột được làm cho giống của người bằng cách bổ sung một cách thận trọng các gốc CDR tương ứng và vài gốc khung (FR) vào IGHV1-46*01 hoặc IGHV3-23*01 của người. VL của chuột được làm cho giống của người bằng cách bổ sung một cách thận trọng các gốc CDR tương ứng và vài gốc khung (FR) vào IGKV4-1*01 hoặc IGKV2-28*01 của người. Các khác biệt giữa các gốc FR của chuột và của người được tạo mẫu riêng để kiểm tra ảnh hưởng có thể có của chúng đến sự cấu thành CDR. Để làm cho kháng thể giống của người hơn nữa và tăng ái lực liên kết của kháng thể được làm cho giống của người, các gốc trong CDR được chọn và gây đột biến thành các gốc CDR tương ứng của trình tự dòng mầm của người.

Chuyển nhiễm tế bào. Các tế bào 293F được nuôi cấy trong môi trường biểu hiện 293 FreeStyle™ (Invitrogen). Sự chuyển nhiễm tạm thời được thực hiện bằng cách đồng chuyển nhiễm vector biểu hiện mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể sử dụng chất chuyển nhiễm 293fectin (Invitrogen), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Bốn đến năm ngày sau, chất nổi bề mặt từ các tế bào chuyển nhiễm được thu hoạch và kiểm tra sự tiết kháng thể bằng ELISA. Tóm lại, đĩa 96 giếng (Nunc, Roskilde, Denmark) được phủ 1 $\mu\text{g/ml}$ kháng thể của dê kháng Fc gamma của người trong nước muối được đệm phosphat (PBS) trong 16 giờ ở 4°C. Sau khi phong bế trong 1 giờ với BSA 0,4% trong PBS ở nhiệt độ trong phòng, chất nổi bề mặt phân lập được bổ sung vào 1/3 dung dịch pha loãng liên tiếp, và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa sau đó được rửa ba lần và được ủ với kháng thể của dê đặc hiệu kháng kappa của người được liên hợp với HRP trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa, các đĩa được phát triển với TMB. Phản ứng được dừng bằng H_2SO_4 2M, và OD được đo ở 450 nM.

Tinh sạch và mô tả kháng thể. Chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được sử dụng cho cột protein A Sepharose (GE Healthcare). Cột này được rửa bằng PBS, và sau đó protein được rửa giải bằng đệm rửa giải (đệm natri xitrat 0,1 M, pH=3,0). Các phần đã gom được trung hòa bằng Tris 1M pH=9,0. Cuối cùng, các mẫu đã tinh sạch được thẩm tách dựa vào PBS. Độ tinh khiết của phân đoạn kháng thể đã rửa giải được phân tích

bằng điện di gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit (SDS-PAGE) trên 10% gel ở các điều kiện khử hoặc không khử. Các vạch được hiển thị bằng cách nhuộm xanh Coomassie.

Đo hoạt tính liên kết kháng nguyên bằng ELISA. Đĩa 96 giếng (Nunc, Roskilde, Denmark) được phủ 1 $\mu\text{g/ml}$ protein dung hợp c-Kit của người-Fc trong nước muối được đệm phosphat (PBS) trong 16 giờ ở 4°C. Sau khi phong bế trong 1 giờ bằng BSA 0,4% trong PBS ở nhiệt độ trong phòng, kháng thể kháng c-Kit được bổ sung vào 1/3 dịch pha loãng liên tiếp, và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa sau đó được rửa ba lần và được ủ với kháng thể của dê đặc hiệu kháng kappa của người được liên hợp với HRP trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa, các đĩa được phát triển với TMB. Phản ứng được dừng bằng H_2SO_4 2M, và OD được đo ở 450 nM.

Thử nghiệm thực bào in vitro. Tế bào ung thư MHC-1 được rửa và đếm, sau đó 25 μL chứa 1×10^5 tế bào trong IMDM không chứa huyết thanh được bổ sung vào mỗi giếng. Việc xử lý kháng thể (trong 25 μL) với nồng độ cuối bằng 10 $\mu\text{g/mL}$ được thêm vào các giếng và được ủ ở 37°C trong 30 phút. Tại thời điểm 30 phút, các đại thực bào đã thu hoạch trước đó với TrypLE được đếm và được cấy đĩa với 5×10^4 tế bào trong 50 μL IMDM không chứa huyết thanh. Các đĩa được ủ ở 37°C trong 2 giờ (chất tác động:đích = 1:2). Phần trăm thực bào được tính bằng phân tích đếm dòng tế bào tìm kiếm các đại thực bào GFP+.

Thử nghiệm ADCC. Tế bào giết tự nhiên được phân lập từ PBMC của người sử dụng kit chọn lọc dương tính CD56 của người EasySep từ Stemcell Technologies (Vancouver, British Columbia, Canada, catalog #17855). Các tế bào đã phân lập được nuôi cấy qua đêm trong môi trường RPMI 1640 có bổ sung FBS 10% và 100 U/mL IL-2 tái tổ hợp của người (PeproTech, Rocky Hill, NJ, catalog #200-02). Các tế bào GIST-T1 được dán nhãn 5 μM Calcein-AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, catalog #C3100MP) trong 10 phút ở 37°C, sau đó được rửa hai lần. Kháng thể kháng c-Kit hoặc đối chứng isotyp được pha loãng liên tiếp 10 lần từ 0,0003 đến 30 $\mu\text{g/mL}$ và được chuyển vào đĩa thử nghiệm đáy chữ V. Các tế bào GIST-T1 đã được dán nhãn được bổ sung vào đĩa thử nghiệm, sau đó là các tế bào giết tự nhiên hoạt hóa cho tỷ lệ cuối đích:chất tác động là 1:5. Sau 2 giờ ủ, chất nổi bề mặt được gom và được chuyển vào đĩa trong đáy phẳng. Đĩa được đọc trên đầu đọc đĩa phát huỳnh quang SpectraMax M3 với bước sóng

kích thích 490 nm, bước sóng phát 520 nm, và ngưỡng là 515 nm, bằng phần mềm SoftMax Pro 7.0. Phần trăm dung giải cụ thể được tính dựa trên đơn vị phát huỳnh quang tương đối (RFU) với công thức sau: $[(\text{RFU thử nghiệm} - \text{RFU nền trung bình})/(\text{RFU tối đa trung bình} - \text{RFU nền trung bình})] \times 100$, trong đó nền là tế bào tác động + tế bào đích không có kháng thể, và tỷ lệ dung giải tối đa là tế bào tác động + tế bào đích có đệm dung giải. Dữ liệu được phân tích bằng GraphPad Prism 7.05. Phần trăm dung giải phụ thuộc kháng thể cụ thể được vẽ đồ thị dựa trên nồng độ kháng thể.

Thử nghiệm tăng sinh HSPC. Tế bào gốc/tế bào tiền thân CD34+ máu cuống rốn đông lạnh (ALLCELLS Catalog# CB005F) được tái tạo huyền phù trong môi trường lưu HSC, StemSpan SFEMII (STEMCELL technologies Catalog# 09605) được bổ sung 20 ng/ml SCF tái tổ hợp của người (STEMCELL technologies Cat# 78062), 20 ng/ml Flt3 tái tổ hợp của người-phôi tử (Peprotech Catalog# 300-19) và 20 ng/ml TPO tái tổ hợp của người (Peprotech Catalog# 300-18). Khoảng 3000 tế bào gốc được cấy đĩa vào mỗi giếng trên ba đĩa 96 giếng COSTAR Ultra low cluster (Corning Catalog# 7007). Các đĩa được ly tâm ở 1250 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút và tế bào được tái tạo huyền phù trong 200 μ l môi trường lưu HSC có hoặc không có kháng thể kháng c-Kit trong ba bản sao. Bốn kháng thể kháng c-Kit, AMG191, AMG191-G1, HF12 và HF112 được kiểm tra ở các nồng độ 0,1, 1, 10 và 50 μ g/ml. Sự tăng sinh tế bào được kiểm tra sử dụng hạt đếm tuyệt đối Countbright absolute Counting beads (Invitrogen™ Catalog# C36950) vào ngày 1, 3, 5, và 11. AMG191 có đột biến N thành E của vị trí 297 tạo ra chức năng tác động giảm không được glycosyl hóa. AMG191-G1 hoặc -IgG1 có vùng không đổi IgG1 kiểu đại của người.

2. Kết quả

(a) Tách dòng và đọc trình tự vùng biến đổi thể lai kháng c-Kit

Dòng tế bào thể lai kháng c-Kit của người được mua từ ATCC (HB-10716). Tính đặc hiệu của dòng thể lai HB-10716 được kiểm tra bằng liên kết ELISA với c-Kit của người. Vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của HB-10716 được tách dòng từ thể lai sử dụng đoạn mỗi kháng thể toàn bộ. Nhiều dòng đơn tính của mỗi sản phẩm gen V được đọc trình tự để giám sát lỗi do PCR gây ra. Trình tự nucleotit của VH và VL của HB-10716 được xác định, và trình tự axit amin suy ra được thể hiện lần lượt trên Fig. 1A và B.

(b) Làm cho kháng thể giống của người và thể CDR

Để lựa chọn khung kháng thể của người (FR) cần được dùng để làm khuôn để ghép CDR, vùng VL và VH HB-10716 của chuột được so sánh với vùng này của trình tự dòng mầm của người. FR của vùng VL HB-10716 của chuột được thấy là có tính đồng nhất cao hơn so với nhóm phụ IGKV4-1, và FR của vùng VH thể hiện tính đồng nhất cao hơn so với nhóm phụ IGHV1-46 của người. Các FR từ IGKV4-1 và IGHV1-46 của người do đó được sử dụng làm cơ sở để thiết kế HB-10716 được làm cho giống của người. Vị trí axit amin trong vùng FR mà khác nhau giữa các trình tự HB-10716 và IGKV4-1/IGHV1-46 và có thể có ảnh hưởng đến liên kết kháng nguyên được xác định thông qua sự tạo mẫu phân tử. Các gốc giống nhau trong các FR được giữ lại và các gốc không giống nhau hoặc là được giữ lại hoặc được thay thế dựa vào chương trình tạo mẫu phân tử. Ngoài ra, các gốc trong vùng CDR của VH và VL được xác định thông qua sự tạo mẫu phân tử. Các thay thế CDR được thực hiện bằng sự gây đột biến nhằm vị trí.

Bảng 2 tổng kết kháng thể được làm cho giống của người mới được tạo ra và các thành phần vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của chúng. Tóm lại, kháng thể được chỉ định AF có cùng khung vùng biến đổi là AMG191. Kháng thể được chỉ định NF có khung vùng biến đổi khác so với AMG191. Kháng thể được chỉ định HF có cùng khung vùng biến đổi chuỗi nặng là AMG191 và khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ khác. Các số 2-1, 11, 12, 112 và 3 chỉ ra sự có mặt của các thay thế CDR lần lượt ở các vị trí H54/L30, H60/L30, H64/L30, H60/H64/L30, H95/L30.

Bảng 2

Kháng thể được làm cho giống của người	VH	VL
AF-2-1	AH1	AL2
AF11	AH2	AL2
AF12	AH3	AL2
AF112	AH4	AL2
AF-3	AH5	AL2
AF-1-1	AH4	AL1

NF	NH	NL
NF-2-1	NH1	NL2
NF11	NH2	NL2
NF12	NH3	NL2
NF112	NH4	NL2
NF-3	NH5	NL2
HF11	AH3	NL2
HF12	AH2	NL2
HF112	AH4	NL2

Các thay thế CDR ở H60, H64, và L30 làm tăng liên kết đơn lẻ hoặc qua sự kết hợp (AF11, AF12, và AF112, Bảng 2, Fig. 2A-C). Quan trọng nhất là, các gốc ở H60 và H64 được gây đột biến ngược thành các trình tự dòng mầm của người, làm tăng tính người của kháng thể kháng c-Kit được làm cho giống của người của AF11, AF12, và AF112. Hơn nữa, sự thay thế CDR axit amin đơn ở H54, H95, hoặc L27 (Bảng 2, Fig. 2A-B) làm giảm liên kết của kháng thể kháng c-Kit được làm cho giống của người của AF-2-1, AF-3, và AF-1-1 (Fig. 2D).

Kháng thể kháng c-Kit được làm cho giống của người, NF, được tạo ra bằng cách ghép CDR sử dụng trình tự dòng mầm khác của người của IGHV3-23*01 và IGKV2-28*01 làm khung (Bảng 2, Fig. 3A-B). Kháng thể NF thể hiện hoạt tính liên kết tăng so với AMG191 (Fig. 3C). Sau đó, cùng các thay thế CDR ở H54, H60, H64, H95, L27, và L30 được áp dụng cho NF (Bảng 2, Fig. 3A-B). Các thay thế CDR ở H60, H64, và L30 không chỉ hoạt động với kháng thể có khung IGKV4-1/IGHV1-46 mà còn hoạt động với kháng thể có khung IGHV3-23*01/IGKV2-28*01. Các thay thế CDR ở H60, H64, và L30 một mình hoặc trong hỗn hợp làm tăng hoặc giữ nguyên hoạt tính liên kết của NF11, NF12, và NF112 (Fig. 3D).

HF11, HF12, và HF112 được làm cho giống của người được tạo cấu trúc bằng cách kết hợp các VH và VL khác nhau như được thể hiện trong Bảng 2, và chúng đều

thể hiện hoạt tính liên kết tăng, so với AMG191 (Fig. 4).

(c) Kháng thể kháng c-Kit được làm cho giống của người thúc đẩy sự thực bào qua trung gian đại thực bào

Tiếp theo, các tác giả sáng chế nghiên cứu khả năng của kháng thể kháng c-Kit được làm cho giống của người trong việc hoạt hóa sự thực bào của các tế bào ung thư của người bởi các đại thực bào thu được từ máu ngoại vi của người. Vì AMG191 có Fc bị câm, các tác giả sáng chế đã tạo ra AMG191-G1 có cùng các trình tự như AMG191, ngoại trừ rằng AMG191-G1 có vùng không đổi Fc IgG1 có hoạt tính của người. AMG191 không cảm ứng sự thực bào so với đối chứng PBS; tuy nhiên, AMG191-G1 cảm ứng hoạt tính thực bào cao hơn mong đợi vì nó có giàn IgG1 có hoạt tính của người (Fig. 5). AMG191-G1 cảm ứng mức hoạt tính thực bào tương tự ở 0,1, 1, và 10 ug/ml. Ngược lại với AMG191-G1, AF12, AF112, HF12, HF112, và NF112 được làm cho giống của người có hiệu lực hơn ở nồng độ thấp hơn và cảm ứng hoạt tính thực bào cao hơn so với của AMG191-G1 ở 0,1, 1, hoặc thậm chí ở 10 ug/ml, gợi ý liều trị liệu thấp hơn cần cho AF12, AF112, HF12, HF112, và NF112 được làm cho giống của người (Fig. 5). Dữ liệu chỉ ra rằng trong khi AMG191-G1, AF12, AF112, HF12, HF112, và NF112 đều là kháng thể được định dạng IgG1 của người, AF12, AF112, HF12, HF112, và NF112 có hiệu lực hơn. Điều này có thể là do ái lực liên kết cao hơn của AF12, AF112, HF12, HF112, và NF112 là thuộc tính của khung và/hoặc các thay thế CDR.

(d) Kháng thể kháng c-Kit được làm cho giống của người cảm ứng ADCC hiệu lực

Khả năng của kháng thể kháng c-Kit được làm cho giống của người trong việc cảm ứng hoạt tính ADCC được kiểm tra dựa trên các tế bào GIST. AMG191 không cảm ứng ADCC ở bất kỳ nồng độ thử nghiệm nào. HF12 và HF112 điều tiết ADCC theo cách phụ thuộc liều (Fig. 6).

(e) Kháng thể kháng c-Kit được làm cho giống của người ức chế sự tăng sinh tế bào gốc tạo máu/tế bào tiền thân (HSPC)

Các tế bào tạo máu trưởng thành phát triển từ tế bào gốc tạo máu (HSC) thông qua quy trình được tổ chức phân cấp mà tạo ra các tế bào bị giới hạn dòng tăng dần theo khả năng tự tạo mới giảm dần. c-Kit protein bề mặt tế bào tyrosin kinaza, tương tác với phối tử cùng họ của nó, yếu tố tế bào gốc (SCF), để điều chỉnh sự tự tạo mới. Bằng cách phong bế sự tương tác c-Kit với SCF, các tác giả sáng chế đã kiểm tra xem kháng thể

kháng c-Kit được làm cho giống của người có thể ức chế sự tăng sinh HSPC được không. Như được thể hiện trên Fig. 7, SCF cảm ứng sự tăng sinh HSPC khi không có phép điều trị kháng thể bất kỳ. Tuy nhiên, AMG191, AMG191-G1, HF12, và HF112 ức chế sự tăng sinh HSPC (Fig. 7). Hơn nữa, HF12 và HF112 có hiệu lực hơn trong việc ức chế sự tăng sinh HSPC so với của AMG191 và AMG191-G1 (Fig. 7). Điều này có thể là do ái lực liên kết cao hơn của HF12 và HF112 là thuộc tính của khung và/hoặc các thay thế CDR.

(f) kháng c-kit được làm cho giống của người không cảm ứng sự tách hạt tế bào mast đáng kể

cKIT được biểu hiện trên tế bào gốc tạo máu và tế bào mast trưởng thành. Các tế bào mast có nguồn gốc từ tế bào tiền thân tạo máu CD34+ trong tủy xương. Khi di chuyển đến các mô ngoại vi khác nhau, các tế bào tiền thân này biệt hóa thành các tế bào mast trưởng thành biểu hiện cKIT cùng với thụ thể IgE ái lực cao, FcεRI. Liên kết của kháng nguyên với IgE được mỗi FcεRI trên tế bào mast khơi mào sự tách hạt và giải phóng các chất trung gian hóa học như histamin và tryptaza cùng với các xytokin, leukotrien và proteaza. Sự giải phóng các chất trung gian hóa học gây ra các triệu chứng dị ứng thông thường. Trong sử dụng lâm sàng, có thể mong muốn rằng kháng thể kháng cKIT làm giảm tế bào gốc tạo máu mà không cảm ứng sự tách hạt tế bào mast.

Tế bào mast trưởng thành có kiểu hình (CD34-, FcεRIα+, cKIT+) được biệt hóa tạo thành máu toàn phần ngoại vi của người cho khỏe mạnh được ủ với các nồng độ khác nhau của kháng thể kháng c-Kit được làm cho giống của người HF12 và HF12 (10, 1, 0,1 & 0,01 μg/ml) trong 7 giờ. A23187 (10 μM) và IgE, cộng với kháng IgE (10 ug/ml mỗi loại) được sử dụng làm đối chứng dương. Sự tách hạt được định lượng bằng cách đo mức giải phóng β-hexosaminidaza sử dụng phương pháp hấp thụ như được mô tả trong các phương pháp.

Tế bào mast sơ cấp của người được biệt hóa in vitro và thể hiện kiểu hình CD34-, FcεRIα+, và cKIT+ ở cuối tuần 9, mà phù hợp với đặc điểm kiểu hình của tế bào mast trưởng thành. Sau đó, các tế bào được kích thích bằng canxi ionophore A23187 hoặc IgE kết hợp với kháng IgE. A23187 và IgE + kháng IgE cảm ứng hiệu quả sự tách hạt tế bào mast khi được đo bằng mức giải phóng β – hexosaminidaza.

Việc xử lý trực tiếp các tế bào với kháng thể kháng c-Kit hoặc liên kết chéo kháng

thể kháng c-Kit bởi kháng thể kháng IgG không cảm ứng sự tách hạt tế bào mast đáng kể so với xử lý A23187 và kháng IgE (Fig. 8). Việc cố định kháng thể kháng c-Kit trên đĩa cũng có ít tác động đến sự tách hạt tế bào mast. Việc ủ đồng thời tế bào mast và tế bào NK khi có mặt các nồng độ khác nhau của kháng thể kháng c-Kit cũng không cảm ứng sự tách hạt tế bào mast ở tất cả các nồng độ thử nghiệm.

Kết luận lại, kháng thể kháng c-Kit HF12 và HF112 có rất ít tác động đến sự tách hạt của tế bào mast sơ cấp của người *in vitro*, so với tác động của việc xử lý canxi ionophore A23187 hoặc IgE kết hợp với kháng IgE.

Tất cả các đơn nộp sáng chế, trang web, các công bố khác, các số truy cập và tương tự trích dẫn ở trên hoặc dưới đây được kết hợp bằng cách viện dẫn với toàn bộ nội dung của chúng cho tất cả các mục đích ở cùng một mức độ như thể mỗi tài liệu được chỉ rõ một cách cụ thể và riêng rẽ là được kết hợp bằng cách viện dẫn. Nếu các phiên bản khác nhau của trình tự được kết hợp với số truy cập ở các thời điểm khác nhau, có nghĩa là phiên bản này được kết hợp với số truy cập ở ngày nộp đơn có hiệu lực của đơn. Ngày nộp đơn có hiệu lực nghĩa là ngày sớm hơn ngày nộp đơn thực sự hoặc ngày nộp đơn của đơn ưu tiên liên quan đến số truy cập nếu có. Tương tự, nếu các phiên bản khác nhau của công bố, trang web hoặc tương tự được công bố ở các thời điểm khác nhau, nghĩa là phiên bản được công bố gần nhất ở ngày nộp đơn có hiệu lực của đơn trừ khi được chỉ định khác. Dấu hiệu, bước, thành phần, phương án hoặc khía cạnh bất kỳ của phần bộc lộ này có thể được sử dụng kết hợp với bất kỳ dấu hiệu, bước, thành phần, phương án hoặc khía cạnh bất kỳ khác trừ khi được chỉ định khác. Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết ở mức nhất định bằng các minh họa và ví dụ nhằm mục đích làm rõ và hiểu, rõ ràng là các thay đổi và cải biến nhất định có thể được thực hiện trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ nộp kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể liên kết đặc hiệu với c-Kit của người chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành gồm các CDR H1, H2 và H3 như được xác định bởi Kabat được nêu lần lượt trong các SEQ ID NO:14-16, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành gồm các CDR L1, L2 và L3 như được xác định bởi Kabat được nêu lần lượt trong các SEQ ID NO:36-38.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành thể hiện độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với SEQ ID NO:13 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành thể hiện độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với SEQ ID NO:53, trong đó sự thay đổi bất kỳ so với các SEQ ID NO: 13 và 53 là nằm ngoài các CDR như được xác định bởi Kabat.
3. Kháng thể theo điểm 2, trong đó vị trí 1 của chuỗi nặng theo cách đánh số Kabat là E.
4. Kháng thể theo điểm 2, trong đó các vị trí sau đây của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành theo cách đánh số Kabat bị chiếm chỗ bởi các axit amin như sau:
 - vị trí 9 bị chiếm chỗ bởi L;
 - vị trí 12 bị chiếm chỗ bởi P;
 - vị trí 14 bị chiếm chỗ bởi T;
 - vị trí 15 bị chiếm chỗ bởi P;
 - vị trí 18 bị chiếm chỗ bởi P;
 - vị trí 20 bị chiếm chỗ bởi S;
 - vị trí 22 bị chiếm chỗ bởi S;
 - vị trí 37 bị chiếm chỗ bởi L;
 - vị trí 43 bị chiếm chỗ bởi S;
 - vị trí 45 bị chiếm chỗ bởi Q;
 - vị trí 74 bị chiếm chỗ bởi K;
 - vị trí 77 bị chiếm chỗ bởi R;
 - vị trí 78 bị chiếm chỗ bởi V;
 - vị trí 79 bị chiếm chỗ bởi E; và

vị trí 84 bị chiếm chỗ bởi G.

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:13 ngoại trừ là vị trí 1 có thể là E, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:53.
6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng không đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng không đổi chuỗi nhẹ trưởng thành.
7. Kháng thể theo điểm 6, trong đó vùng không đổi chuỗi nặng là IgG1 của người.
8. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành thể hiện độ đồng nhất trình tự ít nhất 98% với SEQ ID NO:13 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành thể hiện độ đồng nhất trình tự ít nhất 98% với SEQ ID NO:53, trong đó sự thay đổi bất kỳ so với SEQ ID NO:13 và 53 là nằm ngoài các CDR như được xác định bởi Kabat.
9. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành thể hiện độ đồng nhất trình tự ít nhất 99% với SEQ ID NO:13 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành thể hiện ít nhất 99% độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO:53, trong đó sự thay đổi bất kỳ so với SEQ ID NO:13 và 53 là nằm ngoài các CDR như được xác định bởi Kabat.
10. Kháng thể liên kết đặc hiệu với c-Kit của người chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:13 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:53, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng không đổi chuỗi nặng của isotyp IgG1 của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng không đổi chuỗi nhẹ trưởng thành.
11. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, được biểu hiện ở tế bào CHO.
12. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11 và chất mang dược dụng.

CDR1
QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNIMHWVKQTPGQGL

CDR2
EWIGVIYSGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQINSLTSEDSAVY

CDR3
YCARERDTRFGNWGGQGLTVSA

CDR1
 NIVLTQSPASLAVSLGLRATISCRASESDIYGNSFMHWYQQKPGQPPK
 CDR2
 LLILASNLSEGVPARFSGSGSRDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDP
 CDR3
 YTFGGGGTKLEIK

Fig. 2A Sự sắp thẳng trình tự VH của kháng thể kháng c-Kit được làm giống của người

	1	2	3	4	5	a
HB-10716	123456789012345678901234567890123456789012345678901223456789					
AH1	<u>QVQLQQPGAE</u> LVKPGA SVKMS CKASGYTFTS YNMHWVKQTPGQGLEWIGVI YSGNGDTSY					
AH2	<u>QVQLVQSGAEV</u> KKPGA SVKVS CKASGYTFTS YNMHWVRQAPGQGLEWMGVI YSGQGDTSY					
AH3	<u>QVQLVQSGAEV</u> KKPGA SVKVS CKASGYTFTS YNMHWVRQAPGQGLEWMGVI YSGNGDTSY					
AH4	<u>QVQLVQSGAEV</u> KKPGA SVKVS CKASGYTFTS YNMHWVRQAPGQGLEWMGVI YSGNGDTSY					
AH5	<u>QVQLVQSGAEV</u> KKPGA SVKVS CKASGYTFTS YNMHWVRQAPGQGLEWMGVI YSGNGDTSY					
AMG191	<u>QVQLVQSGAEV</u> KKPGA SVKVS CKASGYTFTS YNMHWVRQAPGQGLEWMGVI YSGNGDTSY					
IGHV1-46*01	<u>QVQLVQSGAEV</u> KKPGA SVKVS CKASGYTFTS YNMHWVRQAPGQGLEWMGII NP SGGSTSY					
HB-10716						
AH1	6012345678901234567890122223456789012345678901234567890123					
AH2	<u>NQKFKG</u> KA TLTADKSS STAYMQINSLTSEDS AVYYCARERDTRFGNWGQGT LVTVSA					
AH3	<u>NQKFKG</u> RV TITADKST STAYMEL SSLRSEDT AVYYCARERDTRFGNWGQGT LVTVSS					
AH4	<u>AQKFKG</u> RV TITADKST STAYMEL SSLRSEDT AVYYCARERDTRFGNWGQGT LVTVSS					
AH5	<u>NQKFKG</u> RV TITADKST STAYMEL SSLRSEDT AVYYCARERDTRFGNWGQGT LVTVSS					
AMG191	<u>NQKFKG</u> RV TITADKST STAYMEL SSLRSEDT AVYYCARERDTRFGNWGQGT LVTVSS					
IGHV1-46*01	<u>AQKFKG</u> RV TMT RDTST STVYMEL SSLRSEDT AVYYCAR					

Fig. 2B Sự sắp thẳng trình tự VL của kháng thể kháng c-Kit được làm giống của người

	1	2	abcd	3	4	5
HB-10716	12345678901234567890123456777778901234	5678901234567890123456				
AL1	NIVLTQSPASLAVSLGIRATISCRASESVDIYGN SFMH--WYQQKPGQPKLLIYLASNLES					
AL2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASDSVDIYGN SFMH--WYQQKPGQPKLLIYLASNLES					
AMG191	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDIYGN SFMH--WYQQKPGQPKLLIYLASNLES					
IGKV4-1*01	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQKPGQPKLLIYWASTRES					
HB-10716						
AL1	789012345678901234567890123456789012345678901234567					
AL2	GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQNNEDPYTFGGTKLEIK					
AMG191	GVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNNEDPYTFGGTKVEIK					
IGKV4-1*01	GVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNNEDPYTFGGTKVEIK					

Fig. 2C Liên kết ELISA

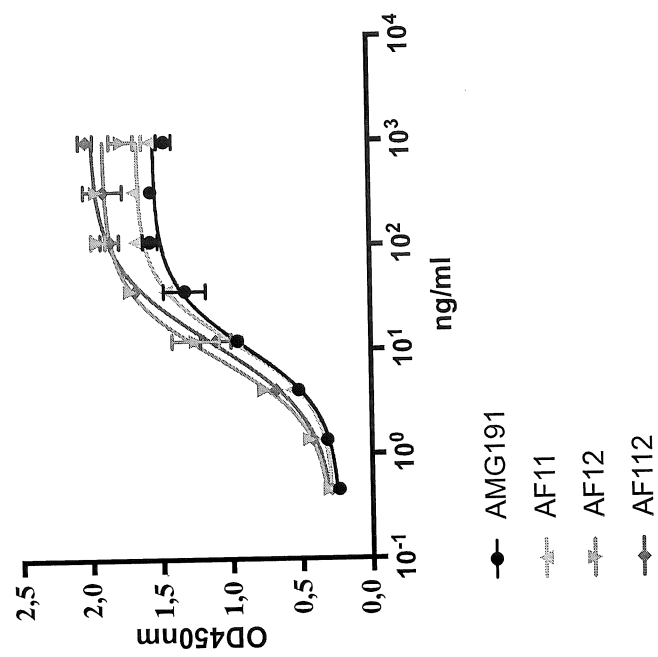


Fig. 2D Liên kết ELISA

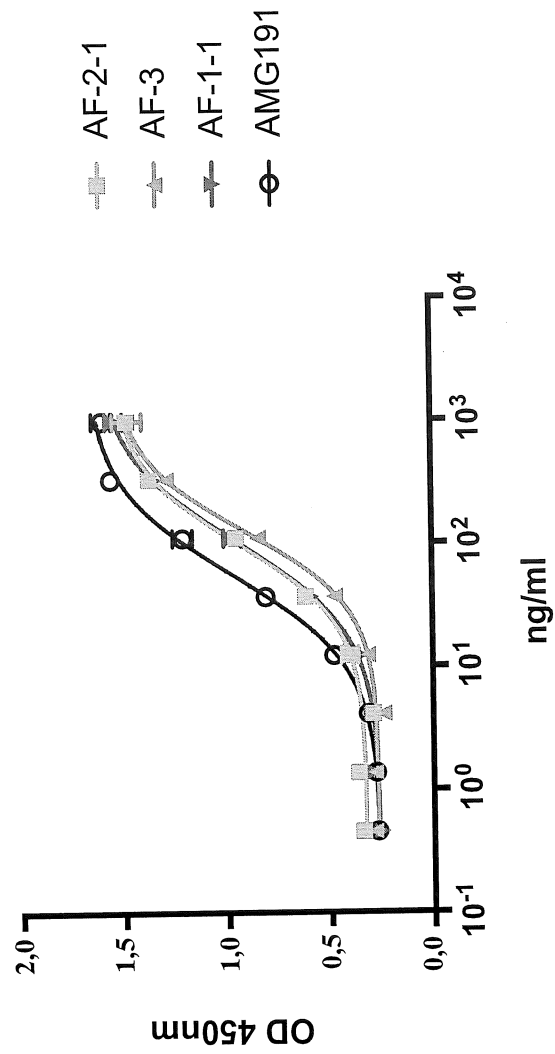


Fig. 3A Sự sắp thẳng trình tự VH của kháng thể kháng c-Kit được làm giống của người

	1	2	3	4	5	a
HB-10716	123456789012345678901234567890123456789012345678901223456789					
NH	QVQLQQPGAEELVKPGASVKMSCKASGYTFSTYNMHWVKQTPGQGLEWIGVIYSNGGDTSY					
NH1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYNMHWVRQAPGKGLIEWVGVIYSNGGDTSY					
NH2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYNMHWVRQAPGKGLIEWVGVIYSNGGDTSY					
NH3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYNMHWVRQAPGKGLIEWVGVIYSNGGDTSY					
NH4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYNMHWVRQAPGKGLIEWVGVIYSNGGDTSY					
NH5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYNMHWVRQAPGKGLIEWVGVIYSNGGDTSY					
AMG191	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYNMHWVRQAPGQGLEWMGVIYSNGGDTSY					
IGHV3-23*01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLIEWSAISGSGGSTYY					
	6	7	8	abc	9	10
	012345678901234567890122223456789012345678901234567890123					11
HB-10716	NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQINSLTSEDSAVYYCARERDTRFGNWGQGTLVTVSA					
NH	NQKFKGRFTISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARERDTRFGNWGQGTLVTVSS					
NH1	NQKFKGRFTISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARERDTRFGNWGQGTLVTVSS					
NH2	AQKFKGRFTISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARERDTRFGNWGQGTLVTVSS					
NH3	NQKFKGRFTISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARERDTRFGNWGQGTLVTVSS					
NH4	AQKFKGRFTISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARERDTRFGNWGQGTLVTVSS					
NH5	NQKFKGRFTISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARERDTRFGNWGQGTLVTVSS					
AMG191	NQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARERDTRFGNWGQGTLVTVSS					
IGHV3-23*01	ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK					

8/15

	6	7	8	9	10
HB-10716	789012345678901234567890123456789012345678901234567				
NL	GVP ARF SG SGR T DFT LT IDP VE ADD AA TTY CQ QNNED PYT FG GGT KLE IK				
NL1	GVP DRF SG SGR T DFT LK ISR VE AED VG VVY CQ QNNED PYT FG GGT KVE IK				
NL2	GVP DRF SG SGR T DFT LK ISR VE AED VG VVY CQ QNNED PYT FG GGT KVE IK				
AMG 191	GVP DRF SG SGR T DFT LK ISR VE AED VG VVY CQ QNNED PYT FG GGT KVE IK				
IGK V2-28*01	GVP DRF SG SGR T DFT LT ISS LQ AED VA VVY CQ QNNED PYT FG GGT KVE IK				
	GVP DRF SG SGR T DFT LK ISR VE AED VG VVY CQ QAL QTP				

Fig. 3C Hoạt tính liên kết ELISA

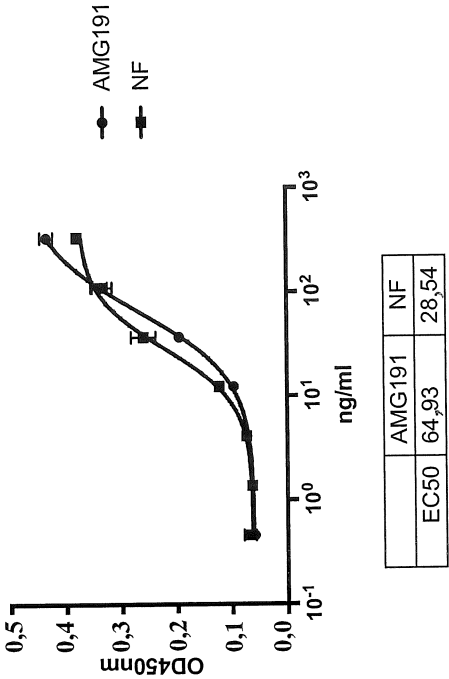


Fig. 3D Hoạt tính liên kết ELISA

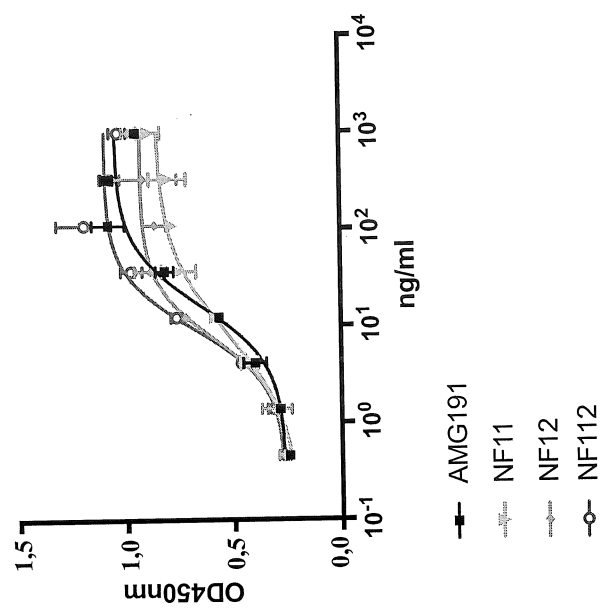


Fig. 4 Liên kết ELISA

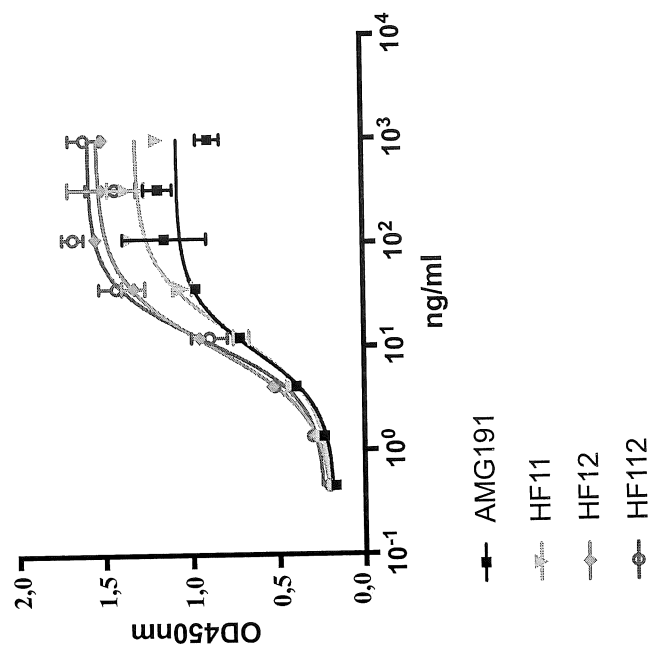


Fig. 5 Hoạt tính thực bào in vitro

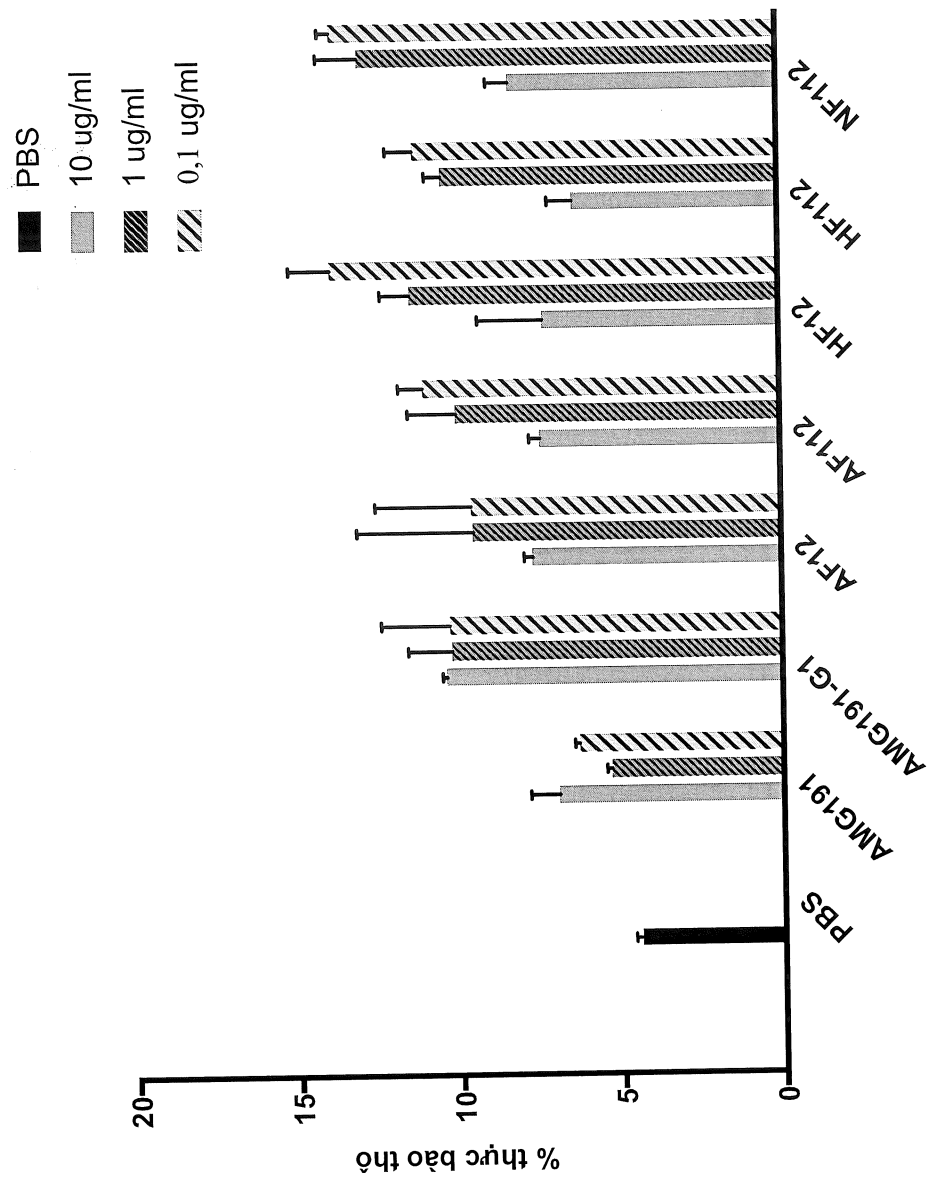


Fig. 6 Hoạt tính ADCC in vitro

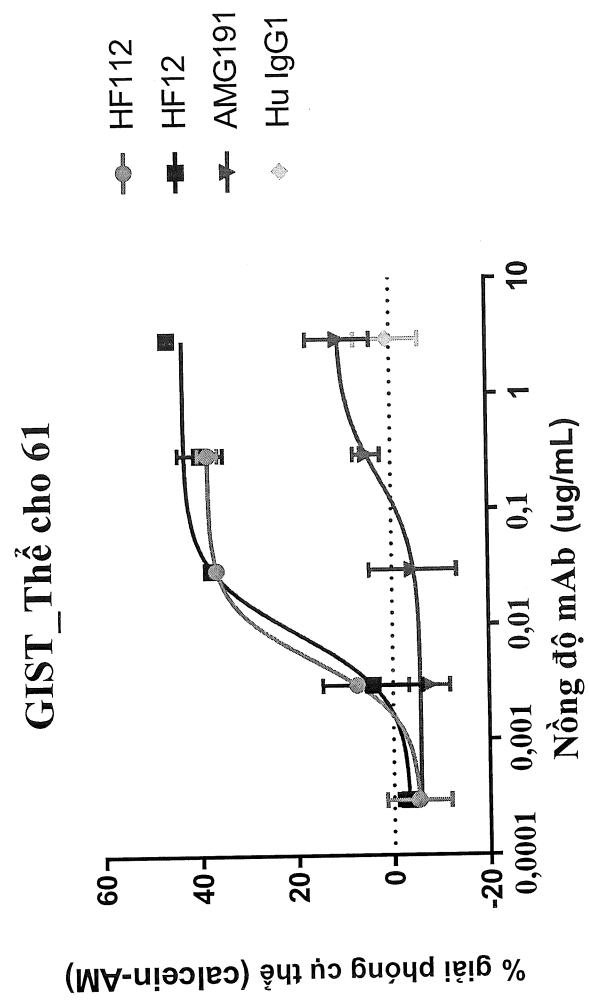


Fig. 7 Sự tăng sinh HSPC in vitro

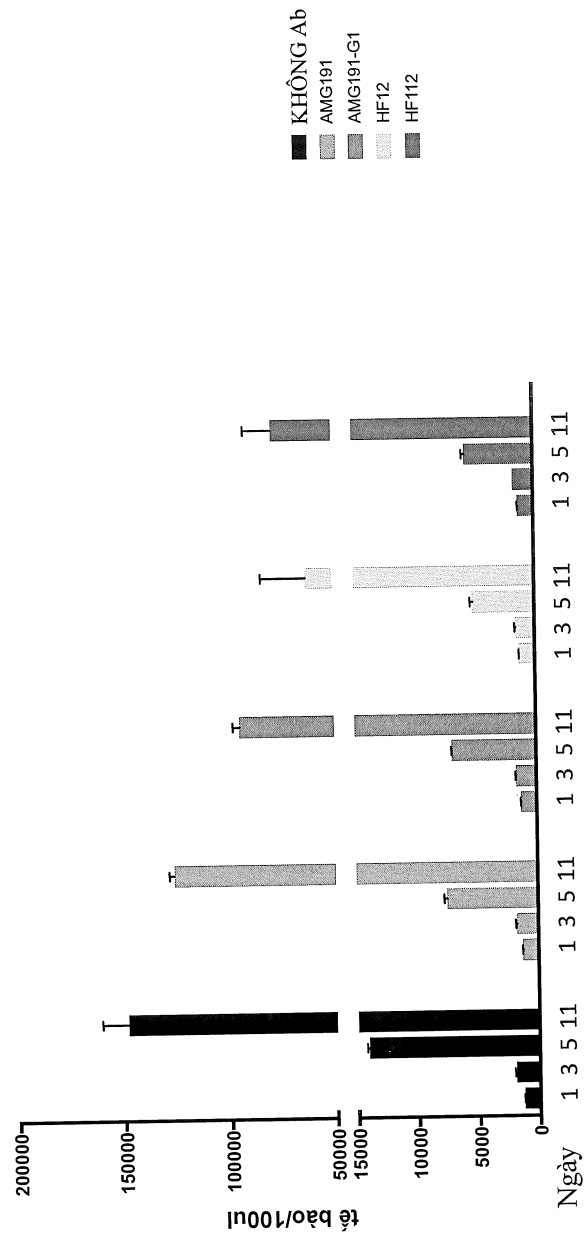
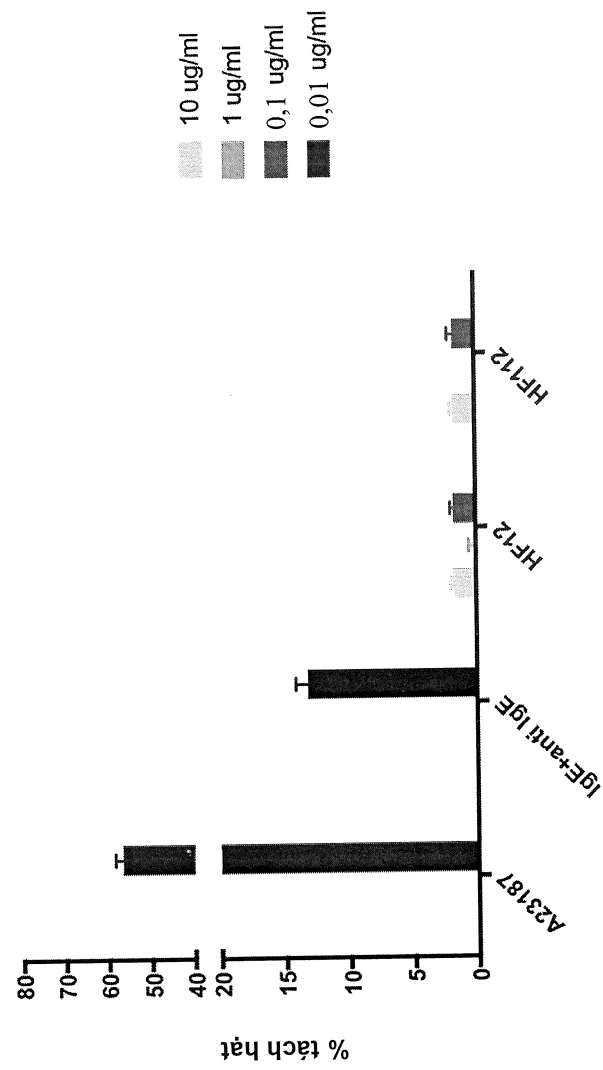


Fig. 8



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> FORTY SEVEN, INC.
LIU, JIE
SOMPALLI, KAVITHA

<120> KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI C-KIT CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA
KHÁNG THỂ NÀY

<130> 063673-540687

<150> 62/771,526

<151> 2018-11-26

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 1

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

Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		

Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			

Gly	Val	Ile	Tyr	Ser	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

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

Ala	Arg	Glu	Arg	Asp	Thr	Arg	Phe	Gly	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
								105					110		

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 2

Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 3

Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

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

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 4

Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn
1 5

<210> 5
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 5

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

Leu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

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

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 6

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 7

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 8

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 9

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ser Gly Gln Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 10

Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 11

Val Ile Tyr Ser Gly Gln Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 12

Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn
1 5

<210> 13
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 13

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 14

Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 15

Val	Ile	Tyr	Ser	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 16

Glu	Arg	Asp	Thr	Arg	Phe	Gly	Asn
1				5			

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 17

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

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

Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			

Gly	Val	Ile	Tyr	Ser	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

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

Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 18

Ser Tyr Asn Met His
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 19

Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

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

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 20

Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn
1 5

<210> 21
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 21

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 22

Ser Tyr Asn Met His
 1 5

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 23

Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 24

Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn
 1 5

<210> 25
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 25

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 26

Ser Tyr Asn Met His
 1 5

<210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 27

Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 28

Asp Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn

1

5

<210> 29

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 29

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 30

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 31

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 31

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 Arg Ala Ser Asp Ser Val Asp Ile Tyr
 20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 32

Arg Ala Ser Asp Ser Val Asp Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 33

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 34

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 35

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 35

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 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
 20 25 30

Gly Gln Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 36

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr Gly Gln Ser Phe Met His
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 37

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 38

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 39

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 39

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 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 40
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40

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 Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala 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
 100

<210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 42

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro
 1 5

<210> 44
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 44

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 18

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 45

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ser Gly Gln Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 46
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 46

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 47

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 47

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 48
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 48

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
21

100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 49
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 49
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 50
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 50

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys

<210> 51
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 51

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65 70 75 80

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 52

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 52

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Asp Ser Val Asp Ile Tyr
20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65 70 75 80

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 53

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 53

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr
 20 25 30

Gly Gln Ser Phe Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
 65 70 75 80

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 54

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro
100