



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} C07K 16/28; A61P 37/00; A61P 35/00; (13) B
A61P 35/02



1-0052583

-
- (21) 1-2021-00729 (22) 15/07/2019
(86) PCT/EP2019/069028 15/07/2019 (87) WO 2020/012036 16/01/2020
(30) 62/697,730 13/07/2018 US; 62/848,874 16/05/2019 US
(45) 27/10/2025 451 (43) 27/09/2021 402A
(73) GENMAB A/S (DK)
Carl Jacobsens Vej 30, 2500 Valby, Denmark
(72) DE GOEIJ, Bart,E,C,G, (NL); ANDRINGA, Grietje (NL); BEURSKENS, Frank
(NL); SCHUURMAN, Janine (NL); SATIJN, David (NL); AHMADI, Tahamtan
(US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

- (54) BIẾN THỂ KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI CD38 CỦA NGƯỜI, AXIT NUCLEIC
MÃ HÓA BIẾN THỂ KHÁNG THỂ NÀY, VÀ VECTƠ BIỂU HIỆN HOẶC VẬT
TRUYỀN PHÂN PHỐI CHỨA AXIT NUCLEIC NÀY

(21) 1-2021-00729

(57) Biến thể kháng thể chứa một hoặc nhiều đột biến ở vùng Fc, cụ thể là kháng thể kháng CD38 chứa đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng với E430, E345 và S440 ở chuỗi nặng IgG1 của người, trong đó gốc axit amin này được đánh số theo chỉ số EU.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Các biến thể kháng thể chứa một hoặc nhiều đột biến ở vùng Fc, cụ thể là biến thể kháng thể kháng CD38.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD38 là glycoprotein màng chuyển loại II mà thường được tìm thấy trên tế bào tạo máu và với mức thấp ở mô rắn. Biểu hiện của CD38 ở tế bào tạo máu phụ thuộc vào trạng thái biệt hóa và hoạt hóa của tế bào. Tế bào tạo máu biệt hóa dòng biểu hiện protein, mặc dù nó bị làm mất bởi tế bào thành thực và lại được biểu hiện ở lympho bào được hoạt hóa. CD38 cũng được biểu hiện ở tế bào B, nhờ đó tương bào biểu hiện cụ thể là mức CD38 cao. Khoảng 80% tế bào NK không hoạt động tích cực và bạch cầu đơn nhân biểu hiện CD38 ở mức thấp, như các loại tế bào huyết học khác nhau, bao gồm nguyên bào lympho ở trung tâm mầm hạch bạch huyết, tế bào trong nang, tế bào đuôi gai, hồng cầu, và tiểu cầu (Lee and Aarhus 1993; Zocchi, Franco et al. 1993; Malavasi, Funaro et al. 1994; Ramaschi, Torti et al. 1996). Liên quan đến mô rắn, CD38 được biểu hiện trong ruột bởi tế bào trong biểu mô và lympho bào lớp đệm, bởi tế bào Purkinje và đám rối sợi thần kinh trong não, bởi tế bào biểu mô trong tuyến tiền liệt, tế bào β trong tuyến tụy, tế bào hủy xương trong xương, tế bào võng mạc ở mắt, và bệnh sa cơ trơn và cơ vân.

CD38 được biểu hiện ở số lượng lớn nhóm bệnh máu ác tính. Biểu hiện quan sát được cụ thể là trong tế bào ác tính của đa u tủy xương (MM) (Lin, Owens et al. 2004) và bệnh bạch cầu lympho mạn tính (CLL) (Damle 1999), và cũng được báo cáo ở macroglobulin huyết Waldenström (Konoplev, Medeiros et al. 2005), bệnh thoái hóa tinh bột hệ thống sơ cấp (Perfetti, Bellotti et al. 1994), u lympho tế bào vỏ (Parry-Jones, Matutes et al. 2007), bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (Keyhani, Huh et al. 2000), bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (Marinov, Koubek et al. 1993; Keyhani, Huh et al. 2000), bệnh bạch cầu tế bào NK (Suzuki, Suzumiya et al. 2004), ung thư hạch tế bào

T/NK (Wang, Wang et al. 2015) và bệnh bạch cầu tế bào huyết tương (van de Donk, Lokhorst et al. 2012).

Các bệnh khác, trong đó biểu hiện CD38 có thể liên quan đến, bao gồm, ví dụ ung thư biểu mô phế quản của phổi, ung thư vú (phát triển từ sự tăng sinh ác tính của lớp biểu mô trong ống dẫn và tiểu thùy của vú), u tuyến tụy, phát triển từ tế bào β (u tụy nội tiết), khối u phát triển từ biểu mô trong ruột (ví dụ ung thư biểu mô tuyến và ung thư biểu mô tế bào vảy), ung thư biểu mô trong tuyến tiền liệt, bán biểu mô trong tinh hoàn, ung thư buồng trứng và u nguyên bào thần kinh. Các bậc lộ khác cũng gợi ý vai trò của CD38 trong tự miễn dịch như bệnh Graves và viêm tuyến giáp (Antonelli, Fallahi et al. 2001), bệnh tiểu đường type 1 và 2 (Mallone and Perin 2006) và viêm tế bào cơ trơn đường thở khi hen suyễn (Deshpande, White et al. 2005). Ngoài ra, biểu hiện CD38 có liên quan đến nhiễm HIV (Kestens, Vanham et al. 1992; Ho, Hultin et al. 1993).

CD38 là protein đa chức năng. Chức năng được gán cho CD38 bao gồm cả thụ thể trung gian trong các sự kiện kết dính và tín hiệu và hoạt tính (ecto-) enzym. Là ectoenzym, CD38 sử dụng NAD^+ làm chất để tạo thành ADP-riboza vòng (cADPR) và ADPR, mà còn nicotinamid và axit nicotinic-adenin dinucleotit phosphat (NAADP). cADPR đã được thể hiện là hoạt động như gen đưa tin thứ hai để huy động Ca^{2+} từ lưới nội chất.

Một số kháng thể kháng CD38 được mô tả ở tài liệu sáng chế, ví dụ trong WO 2006/099875 A1, WO2008037257 A2, WO 2011/154453 A1, WO 2007/042309 A1, WO 2008/047242 A1, WO2012/092612 A1, Cotner, Hemler et al. 1981; Ausiello, Urbani et al. 2000; Lande, Urbani et al. 2002; de Weers, Tai et al. 2011; Deckert, Wetzels et al. 2014; Raab, Goldschmidt et al. 2015; Eissler, Filosto et al. 2018; Roepcke, Plock et al. 2018; và Schooten 2018.

Các kháng thể CD38 có thể ảnh hưởng đến tế bào khối u biểu hiện CD38 bằng một hoặc nhiều trong số các cơ chế hoạt động sau đây: độ gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC), gây độc tế bào do tế bào gây ra phụ thuộc vào kháng thể (ADCC), thực bào do tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), chết tế bào theo chương trình, trogocytosis, làm khuyết tế bào ức chế miễn dịch và điều biến hoạt tính enzym (van de Donk, Janmaat et al. 2016; Krejcik, Casneuf et al. 2016; Krejcik, Frerichs et al. 2017; Chatterjee,

Daenthanasanmak et al. 2018; van de Donk 2018). Tuy nhiên, vào năm 2014, được đề xuất rằng, không có kháng thể CD38 được mô tả mà có thể cảm ứng CDC, ADCC, ADCP hiệu quả cũng như ức chế hiệu quả hoạt tính enzym CD38 (Lammerts van Bueren, Jakobs et al. 2014).

Việc tối ưu hóa chức năng tác động có thể cải thiện hiệu quả của kháng thể điều trị để điều trị ung thư hoặc các bệnh khác, ví dụ, để cải thiện khả năng của kháng thể để gọi ra đáp ứng miễn dịch với tế bào biểu hiện kháng nguyên. Các nỗ lực này được mô tả ở, ví dụ, WO 2013/004842 A2; WO 2014/108198 A1; WO 2018/031258 A1; Dall'Acqua, Cook et al. 2006; Moore, Chen et al. 2010; Desjarlais and Lazar 2011; Kaneko and Niwa 2011; Song, Myojo et al. 2014; Brezski and Georgiou 2016; Sondermann and Szymkowski 2016; Zhang, Armstrong et al. 2017; Wang, Mathieu et al. 2018.

Bất chấp các nỗ lực này và các nỗ lực khác trong lĩnh vực, tuy nhiên, cần có kháng thể trị liệu CD38 với hiệu lực được điều biến.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế quan tâm đến biến thể của kháng thể CD38 C, cụ thể là biến thể có một hoặc nhiều đột biến ở vùng Fc. Ít nhất là một trong các đột biến ở gốc tương ứng với E430, E345 hoặc S440 trong chuỗi nặng IgG1 của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU.

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể gắn kết với CD38 của người, biến thể kháng thể chứa

- (a) vùng gắn kết kháng nguyên chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4, VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7, và
- (b) vùng Fc biến thể chứa đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440 ở chuỗi nặng IgG1 của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể gắn kết với CD38 của người, biến thể kháng thể này chứa

- (a) chuỗi nặng chứa vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng IgG1 CH của người với đột biến ở một hoặc nhiều trong số E430, E345 và S440, gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU;
- (b) chuỗi nhẹ chứa vùng VL chứa VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể gắn kết với CD38 của người, biến thể kháng thể này chứa

- (a) chuỗi nặng chứa vùng VH chứa SEQ ID NO:1 và vùng IgG1 CH của người với đột biến ở một hoặc nhiều trong số E430, E345 và S440, trong đó việc đánh số gốc axit amin theo chỉ số EU, và
- (b) chuỗi nhẹ chứa VL chứa SEQ ID NO:5.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic phân lập mã hóa biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vector biểu hiện chứa axit nucleic này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp mà sản xuất biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này, bao gồm nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp này trong môi trường nuôi cấy và trong điều kiện thích hợp để sản xuất biến thể kháng thể.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tăng chức năng tác động của kháng thể mẹ chứa vùng Fc và vùng gắn kết kháng nguyên gắn kết với CD38, phương pháp này bao gồm đưa vào vùng Fc đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin

được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345, và S440 ở vùng Fc của chuỗi nặng IgG1 của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU;

trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4, VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một số phương án của khía cạnh được mô tả trong bản mô tả này, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y và S440W, như, ví dụ, E430G.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất biến thể của kháng thể mẹ chứa vùng Fc và vùng gắn kết kháng nguyên gắn kết với CD38, biến thể có tác động chức năng tăng khi so sánh với kháng thể mẹ, phương pháp này bao gồm

(a) đưa vào vùng Fc đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345, và S440 ở vùng Fc của chuỗi nặng IgG1 của người để thu được biến thể kháng thể,

(b) lựa chọn biến thể kháng thể bất kỳ có chức năng tác động tăng khi so sánh với kháng thể mẹ, và

(c) sản xuất biến thể kháng thể này ở tế bào chủ tái tổ hợp,

trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4, VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể thu được hoặc có thể thu được bằng phương pháp này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa biến thể kháng thể như được xác định theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này, và chất mang được dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này để sử dụng làm thuốc.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này để sử dụng trong việc điều trị bệnh bao gồm tế bào biểu hiện CD38.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này để sử dụng trong việc cảm ứng đáp ứng CDC chống khối u chứa tế bào biểu hiện CD38.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này để sử dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư ở đối tượng chứa tế bào biểu hiện CD38 của người.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này để sử dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa viêm khớp dạng thấp.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh chứa tế bào biểu hiện CD38, bao gồm sử dụng biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này cho bệnh nhân cần điều trị, tùy ý là trong đó biến thể kháng thể hoặc được phẩm được sử dụng với lượng có hiệu quả điều trị và/hoặc trong thời gian đủ để điều trị bệnh.

Các khía cạnh và phương án này và các khía cạnh và phương án khác theo sáng chế được mô tả chi tiết hơn ở dưới.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện căn chỉnh trình tự axit amin sử dụng phần mềm Clustal 2.1 cho các đoạn IgG1m(a), IgG1m(f), IgG2, IgG3 và IgG4 Fc của người tương ứng với gốc P247 đến K447 ở chuỗi nặng IgG1 của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU như nêu trong Kabat. Trình tự axit amin được thể hiện tương ứng với gốc 130 đến 330 ở vùng hằng định chuỗi nặng của biến thể alen của IgG1m(za) chỉ định IgG1 của người (SEQ ID NO:64; truy nhập UniProt số P01857), IgG1m(f) (SEQ ID NO:65), IgG1m(z) (SEQ ID NO:66), IgG1m(a) (SEQ ID NO:67) và IgG1m(x) (SEQ ID NO:68); gốc 126 đến 326 của vùng hằng định chuỗi nặng IgG2 (SEQ ID NO:79; truy nhập UniProt số P01859); gốc 177 đến 377 của vùng hằng định chuỗi nặng IgG3 (SEQ ID

NO:80; truy nhập UniProt số P01860), và gốc 127 đến 327 của vùng hằng định chuỗi nặng IgG4 (SEQ ID NO:81; truy nhập UniProt số P01861).

Fig. 2 thể hiện sự gắn kết của biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G với tế bào NALM16 biểu hiện CD38 so với kháng thể CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C và kháng thể đối chứng isotyp. Chi tiết hơn, xem ví dụ 2.

Fig. 3 thể hiện sự gắn kết của biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G với CD38 được biểu hiện trên PBMC của khỉ cynomolgus (A) hoặc tế bào Daudi biểu hiện số lượng bản sao cao của CD38 của người (B) so với kháng thể đối chứng isotyp. Chi tiết hơn, xem ví dụ 2.

Fig. 4 thể hiện tỷ lệ phần trăm phân giải do biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G của dòng tế bào khối u Ramos (A), Daudi (B), Wien-133 (C), NALM-16 (D), REH (E), RS4;11 (F), U266 (G) và RC-K8 (H) gây ra ở thử nghiệm CDC khi so sánh với kháng thể CD38 IgG1-A, IgG1-B và IgG1-C. Chi tiết hơn, xem ví dụ 3.

Fig. 5 thể hiện hiệu quả của biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G với số lượng tế bào NK sống (A), tế bào T (B) và tế bào B (C) ở thử nghiệm CDC được tiến hành trên toàn bộ máu khi so sánh với kháng thể CD38 IgG1-A, IgG1-B và IgG1-C. Chi tiết hơn, xem ví dụ 3.

Fig. 6 thể hiện tỷ lệ phần trăm phân giải của tế bào Daudi do biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G gây ra ở thử nghiệm ADCC giải phóng crom khi so sánh với kháng thể CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C và kháng thể đối chứng isotyp. Chi tiết hơn, xem ví dụ 4.

Fig. 7 thể hiện liên kết ngang FcγRIIIa phụ thuộc vào liều lượng của biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G ở thử nghiệm chỉ thị ADCC khi so sánh với kháng thể CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C và kháng thể đối chứng isotyp. Chi tiết hơn, xem ví dụ 4.

Fig. 8 thể hiện hiệu quả của biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G lên tỷ lệ phần trăm của đại thực bào PKH-29^{pos}, CD14^{pos} và

CD19^{neg} ở thử nghiệm ADCP khi so sánh với kháng thể CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C và kháng thể đối chứng isotyp. Chi tiết hơn, xem ví dụ 5.

Fig. 9 thể hiện tỷ lệ phần trăm phân giải do biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G của dòng tế bào khối u Ramos (A), Daudi (B, C), Wien-133 (D, E) và NALM-16 (F, G) gây ra ở thử nghiệm chết theo chương trình được tiến hành với (C, E, G) hoặc không có kháng thể liên kết ngang Fc (A, B, D, F), khi so sánh với kháng thể CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C và kháng thể đối chứng isotyp. Chi tiết hơn, xem ví dụ 6.

Fig. 10 minh họa hoạt tính enzym của CD38.

Fig. 11 thể hiện hiệu lực của biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G với hoạt tính xyclaza của HisCD38 (A), tế bào Daudi (B) và tế bào Wien-133 (C) được phản ánh bởi chuyển đổi % NDG theo thời gian, so với kháng thể CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C và kháng thể đối chứng isotyp.

Fig. 12 thể hiện hiệu lực của biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G với biểu hiện CD38 trên tế bào Daudi sau 45 phút đồng nuôi cấy với đại thực bào so với kháng thể CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C và kháng thể đối chứng isotyp. Đại thực bào từ thể cho A (A, B) hoặc thể cho B (B, D) và tế bào opsonin hóa kháng thể được thử nghiệm cho biểu hiện CD38 (A, B) hoặc nhuộm IgG của người (C, D).

Fig. 13 thể hiện hiệu lực của biến thể kháng thể CD38 IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G với biểu hiện CD38 trên tế bào điều hòa T có hoặc không có PBMC, so với IgG1-B.

Fig. 14 thể hiện tỷ lệ phần trăm phân giải do biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G (hình tam giác đặc), IgG1-B-E430G (hình tròn đặc) và IgG1-C-E430G (hình vuông đặc) của các dòng tế bào khối u tế bào B khác nhau gây ra ở thử nghiệm CDC khi so sánh với kháng thể CD38 IgG1-B (hình tròn rỗng) và kháng thể đối chứng isotyp (hình kim cương rỗng). Chi tiết hơn, xem ví dụ 3.

Fig. 15 thể hiện tóm tắt một số giá trị EC₅₀ mô tả trong bảng 4. Giá trị EC₅₀ của CDC do kháng thể IgG1-B, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G gây ra trên 20 dòng tế

bào khối u tế bào B khác nhau được thể hiện. Mỗi hình vuông, hình tam giác hay hình tròn là dòng tế bào khối u tế bào B khác nhau. Giá trị EC50 thu được với dòng tế bào AML không được bao gồm vì IgG1-B-E430G không được thử nghiệm trên dòng tế bào AML.

Fig. 16 thể hiện tỷ lệ phần trăm phân giải do biến thể kháng thể CD38 IgG1-C-E430G (hình tròn đặc) gây ra của các dòng tế bào khối u AML khác nhau trong thử nghiệm CDC khi so sánh với kháng thể CD38 IgG1-B (hình tròn rỗng) và kháng thể đối chứng isotyp (hình vuông đặc). Chi tiết hơn, xem ví dụ 3.

Fig. 17 thể hiện tỷ lệ phần trăm phân giải do biến thể kháng thể CD38 IgG1-B-E430G (hình tròn đặc) và IgG1-C-E430G (hình vuông đặc) gây ra của tế bào điều hòa T trong thử nghiệm CDC khi so sánh với kháng thể CD38 IgG1-B (hình tròn rỗng). Chi tiết hơn, xem ví dụ 3.

Fig. 18 thể hiện tỷ lệ phần trăm phân giải của tế bào Daudi, Wien-133, Granta 519 và MEC-2 do biến thể kháng thể CD38 IgG1-B-E430G, IgG1-C-E430G gây ra trong thử nghiệm ADCC giải phóng crom khi so sánh với kháng thể CD38 IgG-B, IgG1-C và IgG1-b12-E430G. Chi tiết hơn, xem ví dụ 4.

Fig. 19 thể hiện liên kết ngang FcγRIIIa phụ thuộc vào liều lượng của biến thể kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G ở thử nghiệm chỉ thị ADCC với tế bào điều hòa T khi so sánh với kháng thể CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C và kháng thể đối chứng isotyp. Chi tiết hơn, xem ví dụ 4.

Fig. 20 thể hiện kích cỡ khối u (mm^3) ở chuột được điều trị bằng biến thể kháng thể CD38 IgG1-C-E430G hoặc PBS (đối chứng âm). Chi tiết hơn xem ví dụ 9.

Fig. 21 minh họa thiết lập thử nghiệm để đo trogocytosis. 1) Tế bào Daudi được được gắn nhãn bằng PKH-26 (nhuộm màng) và tế bào vết tím (nhuộm bào tương) và opsonin hóa với kháng thể CD38. 2) Tế bào Daudi được gắn nhãn và đại thực bào được ủ trong 2h ở 37°C để cho phép gắn đại thực bào. 3) Chuyển màng tế bào hoặc trogocytosis từ tế bào Daudi sang đại thực bào. 4) Tách rời tương tác giữa đại thực bào-Daudi và suy thoái màng tế bào Daudi trong đại thực bào. Chi tiết hơn xem ví dụ 8.

Fig. 22 thể hiện tính gây độc tế bào qua trung gian bổ thể bởi IgG1-C-E430G hoặc Darzalex® trong tế bào đơn nhân tủy xương từ 3 bệnh nhân MM mới được chẩn đoán (A, B và D) và 1 bệnh nhân MM tái phát/kháng (C).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong việc mô tả các phương án sáng chế, thuật ngữ sẽ được sử dụng để làm rõ ràng hơn. Tuy nhiên, sáng chế không được dự định giới hạn ở thuật ngữ cụ thể được lựa chọn, và chắc chắn rằng mỗi thuật ngữ cụ thể bao gồm tất cả các tương đương kỹ thuật hoạt động theo cách tương tự để hoàn thành mục đích tương tự.

Định nghĩa

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “CD38” nói chung là dùng để chỉ CD38 của người (UniProtKB - P28907 (CD38_HUMAN)) có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:38, mà còn có thể, trừ khi bị mâu thuẫn bởi ngữ cảnh, để chỉ các biến thể, đồng dạng và các gen trực giao của nó. Các biến thể của CD38 của người có đột biến S274, Q272R, T237A hoặc D202G được mô tả trong WO 2006/099875 A1 và WO 2011/154453 A1.

Thuật ngữ “globulin miễn dịch” dùng để chỉ lớp glycoprotein liên quan về cấu trúc gồm hai cặp chuỗi polypeptit, một cặp chuỗi khối lượng phân tử nhẹ (L) và một cặp chuỗi nặng (H), tất cả bốn chuỗi đều liên kết với nhau bằng liên kết disulfua. Cấu trúc của globulin miễn dịch đã được đặc trưng. Xem ví dụ Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Nói một cách ngắn gọn, mỗi chuỗi nặng thông thường gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng hằng định chuỗi nặng (CH). Thông thường vùng CH gồm ba miền, CH1, CH2, và CH3. Các chuỗi nặng được kết nối với nhau thông thường thông qua liên kết disulfua trong cái gọi là “vùng bản lề”. Mỗi chuỗi nhẹ thông thường gồm vùng thay đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng hằng định chuỗi nhẹ, thông thường cái sau gồm một miền, CL. Vùng VH và VL còn có thể được chia thành các vùng có tính siêu biến (hoặc các vùng siêu biến có thể siêu biến trong trình tự và/hoặc dạng của các vòng lặp được xác định cấu trúc), còn được gọi là vùng xác định tính hỗ trợ (CDR), xen kẽ với các vùng được bảo tồn nhiều hơn, được gọi là vùng khung (FR). Mỗi vùng VH và VL thông thường gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận amino đến đầu tận carboxy theo thứ tự sau đây: FR1, CDR1, FR2,

CDR2, FR3, CDR3, FR4 (xem thêm Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)).

Trừ khi được nêu khác hoặc mâu thuẫn với ngữ cảnh, trình tự CDR trong bản mô tả này được xác định theo quy tắc IMGT sử dụng DomainGapAlign (Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999; 27: 209-212 và Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P. Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010); xem thêm địa chỉ internet <http://www.imgt.org/>.

Trừ khi được nêu khác hoặc mâu thuẫn với ngữ cảnh, tham chiếu tới vị trí axit amin trong vùng CH hoặc Fc/miền Fc theo sáng chế là theo cách đánh số EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci US A. 1969 May; 63 (1): 78-85; Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - 1991 NIH Publication No. 91-3242). Gốc axit amin trong CH của isotyp khác với IgG1 của người có thể, tuy nhiên, theo cách khác được chỉ bởi vị trí axit amin tương ứng trong chuỗi nặng IgG1 kiểu đại của người trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU. Cụ thể là, vị trí axit amin tương ứng có thể được xác định như được minh họa trên Fig. 1, tức là, bằng cách (a) căn chỉnh trình tự axit amin của vùng hằng định không phải IgG1 (hoặc mảnh của nó) với trình tự axit amin của chuỗi nặng IgG1 của người (hoặc mảnh của nó) trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU, và (b) xác định vị trí axit amin nào trong chuỗi nặng IgG1 gốc axit amin thẳng hàng với. Theo đó, trong bản mô tả này vị trí của gốc axit amin này có thể được gọi là “gốc axit amin ở vị trí tương ứng với”, theo sau là vị trí axit amin trong chuỗi nặng IgG1 kiểu đại của người được đánh số theo chỉ số EU. Khi dùng để chỉ một hoặc nhiều số vị trí axit amin khác nhau, trong bản mô tả này nó có thể được gọi là “đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin ở vị trí được chọn từ nhóm gồm vị trí tương ứng với”, “đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin ở vị trí tương ứng với” hoặc đơn giản là “đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với”, theo sau là hai hoặc nhiều vị trí axit amin (ví dụ, E430, E345 và S440) trong chuỗi nặng IgG1 kiểu đại của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU.

Thuật ngữ “vùng bản lề” như được sử dụng trong bản mô tả này là dự tính để chỉ vùng bản lề của chuỗi nặng globulin miễn dịch. Do đó, ví dụ vùng bản lề của kháng thể IgG1 của người tương ứng với axit amin 216-230 theo cách đánh số EU.

Thuật ngữ “vùng CH2” hoặc “miền CH2” như được sử dụng trong bản mô tả này là dự tính để chỉ vùng CH2 của chuỗi nặng globulin miễn dịch. Vì vậy, ví dụ vùng CH2 của kháng thể IgG1 của người tương ứng với axit amin 231-340 theo cách đánh số EU. Tuy nhiên, vùng CH2 cũng có thể là bất kỳ trong số các kiểu phụ khác như được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “vùng CH3” hoặc “miền CH3” như được sử dụng trong bản mô tả này là dự tính để chỉ vùng CH3 của chuỗi nặng globulin miễn dịch. Vì vậy, ví dụ vùng CH3 của kháng thể IgG1 của người tương ứng với axit amin 341-447 theo cách đánh số EU. Tuy nhiên, vùng CH3 cũng có thể là bất kỳ trong số các kiểu phụ khác như được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “kháng thể” (Ab) theo ngữ cảnh của sáng chế dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch, mảnh của phân tử globulin miễn dịch, hoặc dẫn xuất của một trong hai, có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên. Kháng thể theo sáng chế chứa miền Fc của globulin miễn dịch và vùng gắn kết kháng nguyên. Kháng thể thường chứa hai vùng CH2-CH3 và vùng kết nối, ví dụ, vùng bản lề, ví dụ ít nhất là miền Fc. Vì vậy, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng Fc và vùng gắn kết kháng nguyên. Các vùng biến đổi của nặng chuỗi và nhẹ của globulin miễn dịch phân tử chứa một miền liên kết tương tác với một kháng nguyên. Các vùng định nghĩa hoặc “Fc” của kháng thể có thể làm trung gian cho sự gắn kết của globulin miễn dịch để lưu trữ mô hoặc các yếu tố, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ thống miễn dịch (như tế bào tác động) và các thành phần của hệ thống bổ sung như C1q, thành phần thứ nhất trong con đường cổ điển của hoạt động bổ sung. Như được sử dụng trong bản mô tả này, trừ khi có mâu thuẫn với ngữ cảnh, vùng Fc của globulin miễn dịch thông thường chứa ít nhất là miền CH2 và miền CH3 của CH globulin miễn dịch, và có thể chứa vùng kết nối, ví dụ, vùng bản lề. Vùng Fc thông thường ở dạng dime hóa thông qua, ví dụ, các cầu nối disulfua kết nối hai vùng bản lề và/hoặc các tương tác không cộng hóa trị giữa hai vùng CH3. Dime có thể là dime cùng loại (trong đó hai trình tự axit amin monome vùng Fc giống nhau) hoặc dime khác loại (trong đó hai trình tự axit amin monome vùng Fc khác biệt ở một hoặc nhiều axit amin). Tốt hơn là, dime là dime cùng loại. Mảnh vùng Fc của kháng thể chiều dài đầy đủ, ví dụ, được tạo ra bằng cách phân tích kháng thể chiều dài đầy đủ với papain, là đã biết ở lĩnh vực này. Kháng thể như được định nghĩa trong bản mô tả này có thể,

ngoài vùng Fc và vùng gắn kết kháng nguyên, còn chứa một hoặc cả hai vùng CH1 globulin miễn dịch và vùng CL. Kháng thể cũng có thể là kháng thể đa đặc hiệu, như kháng thể đặc hiệu kép hoặc phân tử tương tự. Thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu kép” dùng để chỉ kháng thể có tính đặc hiệu cho ít nhất là hai epitop khác nhau, thông thường không chồng chéo. Các epitop này có thể nằm trên cùng một đích hoặc các đích khác nhau. Nếu epitop nằm trên các đích khác nhau, các đích này có thể nằm trên cùng một tế bào hoặc các tế bào hoặc các loại tế bào khác nhau. Như được chỉ ra ở trên, trừ khi có quy định khác hoặc trái rõ ràng với ngữ cảnh, thuật ngữ kháng thể trong bản mô tả này bao gồm mảnh của kháng thể mà chứa ít nhất là một phần của vùng Fc và giữ lại khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Các mảnh này có thể được cung cấp bởi kỹ thuật đã biết bất kỳ, như phân tách enzym, tổng hợp peptit và kỹ thuật biểu hiện tái tổ hợp. Được thể hiện rằng chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi mảnh kháng thể chiều dài đầy đủ. Ví dụ về các mảnh gắn kết được bao gồm trong thuật ngữ “Ab” hoặc “kháng thể” bao gồm, không giới hạn, kháng thể đơn giá (được mô tả trong WO2007059782 bởi Genmab); kháng thể chuỗi nặng, chỉ gồm hai chuỗi nặng và có trong tự nhiên ví dụ ở lạc đà (ví dụ, Hamers-Casterman (1993) Nature 363: 446); ThioMabs (Roche, WO2011069104), miền được thiết kế trao đổi chuỗi (SEED hoặc Seed-body) không đối xứng và phân tử giống kháng thể đặc hiệu kép (Merck, WO2007110205); Triomab (Pharma/Fresenius Biotech, Lindhofer et al. 1995 J Immunol 155: 219; WO2002020039); FcΔAdp (Regeneron, WO2010151792), Azymetric Scaffold (Zymeworks/Merck, WO2012/058768), mAb-Fv (Xencor, WO2011/028952), Xmab (Xencor), globulin miễn dịch miền biến đổi kép (Abbott, DVD-Ig, patent Mỹ số 7,612,181); kháng thể hai đầu miền kép (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), Di-diabody (ImClone/Eli Lilly), định dạng kháng thể Knobs vào lỗ (Genentech, WO9850431); DuoBody (Genmab, WO 2011/131746); IgG1 và IgG2 đặc hiệu kép (Pfizer/Rinat, WO11143545), DuetMab (MedImmune, US2014/0348839), định dạng kháng thể điều khiển tĩnh điện (Amgen, EP1870459 và WO 2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304A2); IgG1 và IgG2 đặc hiệu kép (Rinat neurosciences Corporation, WO11143545), CrossMAbs (Roche, WO2011117329), LUZ-Y (Genentech), Biclonic (Merus, WO2013157953), kháng thể miền nhắm đích kép (GSK/Domantis), kháng thể hai trong một hoặc Fabs

hoạt tính kép nhận diện hai đích (Genentech, NovImmune, Adimab), Mabs liên kết chéo (Karmanos Cancer Center), mAbs dung hợp cộng hóa trị (AIMM), CovX-body (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen ilag), DutaMab (Dutalys/Roche), iMab (MedImmune), đặc hiệu kép giống IgG (ImClone/Eli Lilly, Shen, J., et al. J Immunol Methods, 2007. 318 (1-2): p. 65-74), TIG-body, DIG-body và PIG-body (Pharmabcine), phân tử tái nhắm đích ái lực kép (Fc-DART hoặc Ig-DART, bởi MacroGenics, WO/2008/157379, WO/2010/080538), BEAT (Glenmark), Zybodies (Zyngenia), phương pháp tiếp cận với chuỗi nhẹ chung (Crucell/Merus, US7262028) hoặc chuỗi nặng chung ((κλBodies by NovImmune, WO2012023053), cũng như protein dung hợp chứa trình tự polypeptit được dung hợp với mảnh kháng thể chứa vùng Fc giống thể dung hợp scFv, như BsAb của ZymoGenetics/BMS, HERCULES của Biogen Idec (US007951918), SCORPIONS của Agricultural BioSolutions/Trubion và Zymogenetics/BMS, Ts2Ab (MedImmune/AZ (Dimasi, N., et al. J Mol Biol, 2009. 393 (3): p. 672-92), thể dung hợp scFv của Genentech/Roche, thể dung hợp scFv của Novartis, thể dung hợp scFv của Immunomedics, thể dung hợp scFv của Changzhou Adam Biotech Inc (CN 102250246), TvAb của Roche (WO 2012025525, WO 2012025530), mAb² của f-Star (WO2008/003116), và thể dung hợp scFv kép. Cần hiểu rằng thuật ngữ kháng thể, trừ khi được chỉ định khác, bao gồm kháng thể đơn dòng (như kháng thể đơn dòng của người), kháng thể đa dòng, kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể đơn đặc hiệu (như kháng thể đơn đặc hiệu hóa trị hai), kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể của isotyp và/hoặc allotyp bất kỳ; hỗn hợp kháng thể (đa dòng tái tổ hợp) ví dụ được tạo ra bởi công nghệ do Symphogen và Merus khai thác (Oligoclomics), protein Fc dạng multimer như được mô tả trong WO2015/158867, và protein dung hợp như được mô tả trong WO2014/031646. Trong khi các mảnh và dạng kháng thể khác nhau này thường được bao gồm trong nghĩa của kháng thể, chúng nói chung và mỗi độc lập là đặc tính riêng biệt của sáng chế, thể hiện các đặc tính sinh học và tiện ích khác nhau.

“Kháng thể CD38” hoặc “kháng thể kháng CD38” như được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên CD38.

Thuật ngữ “kháng thể của người”, như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự tính bao gồm kháng thể có vùng biến đổi và hằng định bắt nguồn từ trình tự globulin

miễn dịch dòng mầm của người. Kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, biến, chèn hoặc làm khuyết được đưa ra bởi đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí in vitro hoặc bởi đột biến soma in vivo). Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể của người”, như được sử dụng trong bản mô tả này, không dự tính bao gồm kháng thể, trong đó các trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác, như chuột, được ghép vào trình tự khung của người.

Các thuật ngữ “kháng thể đơn dòng”, “Ab đơn dòng”, “hợp phần kháng thể đơn dòng”, “mAb”, hoặc tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ chế phẩm của phân tử Ab của hợp phần đơn phân tử. Chế phẩm kháng thể đơn dòng hiển thị tính đặc hiệu liên kết đơn và ái lực cho epitop cụ thể. Theo đó, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng của người” dùng để chỉ Ab hiển thị một đặc hiệu gắn kết mà có vùng biến đổi và hằng định có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. mAb của người có thể được tạo ra bởi tế bào lai bao gồm tế bào B thu được từ động vật không phải người chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể, như chuột chuyển gen, có bộ gen chứa danh mục chuyển gen chuỗi nặng của người và danh mục chuyển gen chuỗi nhẹ, sắp xếp lại để tạo ra kháng thể chức năng của người và hợp nhất thành tế bào bất tử.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “isotyp” để chỉ đến lớp miễn dịch globulin được mã hóa bởi các gen phân vùng liên tục chuỗi, bao gồm, ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE và IgM, cũng như bất kỳ loại gen nào của chúng như IgG1m (z), IgG1m (a), IgG1m (x), IgG1m (f) và các hợp tử kết hợp của chúng như IgG1m (za), IgG1m (zax), IgG1m (fa), v.v. (ví dụ, xem, de Lange, *Experimental and Clinical Immunogenetics* 1989;6(1):7–17).

Ngoài ra, mỗi isotyp chuỗi nặng có thể được kết hợp với chuỗi nhẹ kappa (κ) hoặc lambda (λ). Thuật ngữ “isotyp hỗn hợp” được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ vùng Fc của globulin miễn dịch được tạo ra bằng cách kết hợp các đặc tính cấu trúc của một isotyp với vùng tương tự từ isotyp khác nhờ đó tạo ra isotyp lai. Isotyp hỗn hợp có thể chứa vùng Fc có trình tự gồm hai hoặc nhiều isotyp được chọn từ trình tự sau IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE hoặc IgM do đó tạo ra kết hợp như ví dụ IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4 hoặc IgG1/IgA.

Thuật ngữ “kháng thể chiều dài đầy đủ” khi được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ kháng thể (ví dụ, kháng thể mẹ hoặc biến thể) chứa tất cả các miền hằng định và biến đổi chuỗi nặng và nhẹ tương ứng với miền thường được tìm thấy ở kháng thể kiểu đại của isotyp đang nghiên cứu.

“Kháng thể đơn dòng đơn đặc hiệu, hóa trị hai chiều dài đầy đủ” khi được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ kháng thể hóa trị hai, đơn đặc hiệu (ví dụ, kháng thể mẹ hoặc biến thể) được tạo ra bởi cặp HC tương đồng và cặp LC tương đồng, với miền hằng định và biến đổi tương ứng với các miền thường được tìm thấy trong kháng thể của isotyp cụ thể đang nghiên cứu.

Thuật ngữ “vùng gắn kết với kháng nguyên”, “vùng gắn kết kháng nguyên”, “vùng gắn kết” hoặc miền gắn kết kháng nguyên, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ vùng của kháng thể mà có khả năng gắn kết với kháng nguyên. Vùng gắn kết này thông thường được xác định bằng miền VH và VL của kháng thể mà có thể còn được chia nhỏ thành vùng có tính siêu biến (hoặc vùng siêu biến có thể được siêu biến ở trình tự và/hoặc dạng của vòng lặp được xác định cấu trúc), còn được gọi là vùng xác định bổ thể (CDR), xen kẽ với vùng được bảo toàn hơn, được gọi là vùng khung (FR). Kháng nguyên có thể là phân tử bất kỳ, như polypeptit, ví dụ có mặt ở tế bào.

Thuật ngữ “đích”, như được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ phân tử mà vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể ràng buộc. Đích bao gồm kháng nguyên bất kỳ mà kháng thể được nâng lên hướng tới. Thuật ngữ “kháng nguyên” và “đích” có thể liên quan đến kháng thể có thể được sử dụng thay thế cho nhau và tạo nên cùng một ý nghĩa và đích đối với bất kỳ cạnh hoặc phương án nào của sáng chế.

Thuật ngữ “epitop” có nghĩa là một yếu tố quyết định protein có khả năng của công cụ có thể gắn kết với một miền biến đổi kháng thể. Epitop thường gồm nhóm bề mặt của phân tử như axit amin, chuỗi bên đường hoặc kết hợp của chúng và thường có đặc điểm cấu trúc ba chiều, cũng như đặc điểm tích điện cụ thể. Các epitop cấu hình và không cấu hình được phân biệt ở việc gắn kết với epitop trước nhưng không với epitop sau bị mất khi có mặt dung môi biến tính. Epitop có thể chứa gốc axit amin liên quan trực tiếp với liên kết (còn được gọi là thành phần có tính trội miễn dịch của epitop) và các gốc axit amin khác, không liên quan trực tiếp với liên kết.

“Biến thể” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ protein hoặc trình tự polypeptit mà khác một hoặc nhiều gốc axit amin với trình tự mẹ hoặc tham chiếu. Biến thể có thể, ví dụ, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 80%, như 90%, hoặc 95%, hoặc 97%, hoặc 98%, hoặc 99%, với trình tự mẹ hoặc tham chiếu. Ngoài ra hoặc thay thế, biến thể có thể khác với trình tự mẹ hoặc tham chiếu khoảng 12 đột biến hoặc ít hơn, như 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 như thế, chèn hoặc xóa gốc axit amin. Theo đó, “kháng thể biến thể” hoặc “biến thể kháng thể”, được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này, dùng để chỉ kháng thể khác biệt ở một hoặc nhiều gốc axit amin khi so sánh với kháng thể mẹ hoặc tham chiếu, ví dụ, ở vùng gắn kết kháng nguyên, vùng Fc hoặc cả hai. Tương tự như vậy, “vùng Fc biến thể” hoặc “biến thể vùng Fc” dùng để chỉ vùng Fc khác biệt ở một hoặc nhiều gốc axit amin khi so sánh với vùng Fc mẹ hoặc tham chiếu, tùy ý là khác biệt với trình tự axit amin vùng Fc mẹ hoặc tham chiếu khoảng 12 đột biến hoặc ít hơn, như 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 như thế, chèn hoặc xóa gốc axit amin. Vùng Fc mẹ hoặc tham chiếu thông thường là vùng Fc của kháng thể kiểu đại của người, tùy thuộc vào ngữ cảnh, có thể là isotyp cụ thể. Vùng Fc biến thể, ở dạng dime hóa, có thể là dime cùng loại hoặc dime khác loại, ví dụ, trong đó một trong các trình tự axit amin của vùng Fc được dime hóa bao gồm đột biến trong khi các trình tự khác giống với trình tự axit amin kiểu đại của mẹ hoặc tham chiếu. Ví dụ của trình tự axit amin vùng hằng định IgG biến thể và IgG CH kiểu đại (thông thường là trình tự mẹ hoặc tham chiếu), bao gồm trình tự axit amin vùng Fc, được nêu trong bảng 1.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, thể bảo toàn có thể được xác định là thể trong nhóm axit amin sau đây:

- Gốc axit: Asp (D) và Glu (E)
- Gốc bazơ: Lys (K), Arg (R), và His (H)
- Gốc không tích điện ưa nước: Ser (S), Thr (T), Asn (N), và Gln (Q)
- Gốc không tích điện béo: Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), và Ile (I)
- Gốc không tích điện không phân cực: Cys (C), Met (M), và Pro (P)
- Gốc thơm: Phe (F), Tyr (Y), và Trp (W)

Nhóm thể gốc axit amin bảo toàn thay thế:

1. A S T
2. D E
3. N Q
4. R K
5. I L M
6. F Y W

Phân loại vật lý và chức năng thay thế của gốc axit amin:

- Gốc chứa nhóm rượu: S và T
- Gốc béo: I, L, V, và M
- Gốc có liên quan đến xycloalkenyl: F, H, W, và Y
- Gốc kỵ nước: A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, và Y
- Gốc tích điện âm: D và E
- Gốc phân cực: C, D, E, H, K, N, Q, R, S, và T
- Gốc tích điện dương: H, K, và R
- Gốc nhỏ: A, C, D, G, N, P, S, T, và V
- Gốc rất nhỏ: A, G, và S
- Gốc liên quan đến sự tạo thành lần lượt: A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, và T
- Gốc linh hoạt: Q, T, K, S, G, N, D, E, và R

“Độ tương đồng trình tự” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ phần trăm độ tương đồng giữa hai trình tự là hàm của số lượng vị trí giống nhau có chung bởi các trình tự (tức là, phần trăm độ tương đồng = # vị trí giống nhau / tổng # vị trí x 100), xem xét số lượng khoảng trống, và chiều dài của mỗi khoảng trống, cần được đưa cho hàng tối ưu của hai trình tự. Phần trăm độ tương đồng giữa hai nucleotit hoặc trình tự axit amin ví dụ có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988) đã được kết hợp vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0), sử dụng bảng gốc khối lượng PAM 120, hình phạt khoảng cách chiều dài là 12 và hình phạt khoảng cách là 4. Ngoài ra, phần trăm độ tương đồng giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970). Các công cụ khác để căn chỉnh trình tự sẵn

có công khai trên internet và bao gồm, không giới hạn, Clustal Omega and EMBOSS Needle trên trang web EMBL-EBI www.ebi.ac.uk. Thông thường, các thiết lập mặc định có thể được sử dụng.

Trong ngữ cảnh của sáng chế các ký hiệu sau đây, trừ khi được chỉ định khác, được sử dụng để mô tả biến; tên axit amin bị đột biến, theo sau là số lượng vị trí bị đột biến, tiếp theo là biến bao gồm. Do đó nếu đột biến là phần tử thế, tên của axit amin thay thế axit amin được bao gồm, nếu axit amin được làm khuyết thì nó được biểu thị bằng dấu “*”, nếu đột biến là axit amin bổ sung được bổ sung được bao gồm sau axit amin ban đầu. Tên axit amin có thể là mã một hoặc ba chữ cái. Do đó, ví dụ; thế của axit glutamic ở vị trí 430 bằng glyxin được gọi là E430G, thế của axit glutamic ở vị trí 430 bằng axit amin bất kỳ được gọi là E430X, việc loại bỏ axit glutamic ở vị trí 430 được gọi là E430 * và ngoài ra axit glutamic sau prolin ở vị trí E430 được gọi là E430EP.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “tế bào ức chế miễn dịch” dùng để chỉ tế bào miễn dịch có thể ức chế đáp ứng miễn dịch ở đối tượng, như bằng cách ức chế hoạt tính của tế bào T tác động và/hoặc ức chế sự tăng sinh tế bào T. Ví dụ về tế bào ức chế miễn dịch này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào T điều hòa (Treg), tế bào B điều hòa (Breg) và tế bào ức chế gốc tủy bào (MDSC). Ngoài ra còn có tế bào NK ức chế miễn dịch, tế bào NKT, đại thực bào và tế bào trình diện kháng nguyên (APC). Ví dụ về kiểu hình cho tế bào NK ức chế miễn dịch là CD56^{bright}CD16⁻.

“Tế bào T điều hòa” hoặc “các Treg” hoặc “Treg” dùng để chỉ lympho bào T mà điều hòa hoạt tính của (các) tế bào T khác và/hoặc các tế bào miễn dịch khác, thường bằng cách ức chế hoạt tính của chúng. Ví dụ về kiểu hình Treg là CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}. Treg ngoài ra có thể biểu hiện Foxp3. Được đánh giá cao rằng Treg có thể không bị giới hạn hoàn toàn đối với kiểu hình này.

“Tế bào T tác động” hoặc “các Teff” hoặc “Teff” dùng để chỉ lympho bào T thực hiện chức năng của đáp ứng miễn dịch, như diệt tế bào khối u và/hoặc hoạt hóa đáp ứng miễn dịch kháng khối u mà có thể dẫn đến việc thanh thải tế bào khối u khỏi cơ thể. Ví dụ các kiểu hình Teff bao gồm CD3⁺CD4⁺ và CD3⁺CD8⁺. Các Teff có thể tiết ra, chứa hoặc đánh dấu biểu hiện như IFN γ , granzym B và ICOS. Được đánh giá cao rằng các Teff có thể không bị giới hạn hoàn toàn đối với các kiểu hình này.

“Tế bào ức chế gốc tủy” hoặc “các MDSC” hoặc “MDSC” dùng để chỉ quần thể cụ thể của tế bào của dòng tạo máu biểu hiện gen đánh dấu đại thực bào/bạch cầu đơn nhân CD11b và gen đánh dấu bạch cầu hạt Gr-1/Ly- 6G. Ví dụ về kiểu hình MDSC là CD11b⁺HLA-DR⁻CD14⁻CD33⁺CD15⁺. MDSC thông thường cũng thể hiện biểu hiện thấp hoặc không thể phát hiện của gen đánh dấu tế bào trình diện kháng nguyên thành thực MHC Class II và F480. MDSC là tế bào chưa thành thực của dòng tủy và có thể còn biệt hóa thành các loại tế bào khác, như đại thực bào, bạch cầu trung tính, tế bào đuôi gai, bạch cầu đơn nhân hoặc bạch cầu hạt. MDSC có thể được tìm thấy một cách tự nhiên trong tủy xương người lớn bình thường của người và động vật hoặc ở vị trí tạo máu thông thường, như lá lách.

“Tế bào B điều hòa” hoặc “Breg” hoặc “các Breg” dùng để chỉ lympho bào B ức chế đáp ứng miễn dịch. Ví dụ của kiểu hình Breg là CD19⁺CD24⁺CD38⁺. Breg có thể ức chế đáp ứng miễn dịch bằng cách ức chế sự tăng sinh tế bào T qua trung gian IL-10 được tiết ra bởi Breg. Được đánh giá cao việc tồn tại các tập con Breg khác và được mô tả ví dụ ở Ding et al., (2015) Human Immunology 76: 615-621.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào tác động” dùng để chỉ tế bào miễn dịch mà liên quan đến pha tác động của đáp ứng miễn dịch. Tế bào miễn dịch làm ví dụ bao gồm tế bào có nguồn gốc tủy hoặc bạch huyết, ví dụ lympho bào (như tế bào B và tế bào T bao gồm tế bào T tiêu tế bào (CTL)), tế bào diệt, tế bào diệt tự nhiên, đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu ái toan, tế bào đa nhân, như bạch cầu trung tính, bạch cầu hạt, tế bào lớn và bạch cầu ái kiềm. Một số tế bào tác động biểu hiện thụ thể Fc (FcR) hoặc thụ thể bổ trợ và thực hiện chức năng miễn dịch cụ thể. Theo một số phương án, tế bào tác động, như tế bào diệt tự nhiên, có khả năng gây ra ADCC. Ví dụ, bạch cầu đơn nhân to, đại thực bào, bạch cầu trung tính, tế bào đuôi gai và tế bào Kupffer mà biểu hiện FcR, liên quan đến việc diệt đặc hiệu tế bào đích và/hoặc kháng nguyên trình diện với các thành phần khác của hệ miễn dịch, hoặc gắn kết với tế bào trình diện kháng nguyên. Theo một số phương pháp, ADCC có thể còn được tăng cường bởi kháng thể được điều khiển hoạt tính bổ thể cổ điển dẫn đến lắng đọng mảnh C3 hoạt hóa được trên tế bào đích. Sản phẩm phân cắt C3 là phối tử cho thụ thể bổ trợ (CR), như CR3, được biểu hiện trên tế bào tủy bào. Việc CR nhận biết mảnh bổ thể trên tế bào tác động có thể thúc đẩy ADCC được trung gian tăng cường Fc thụ thể. Theo một số phương

pháp kháng thể được điều khiển hoạt tính bổ thể cổ điển dẫn đến mảnh C3 trên tế bào đích. Các sản phẩm phân tách C3 này có thể thúc đẩy sự bổ sung trực tiếp-phụ thuộc tế bào gây độc cho tế bào (CDCC). Theo một số phương án, tế bào tác động có thể thực bào hóa kháng nguyên đích, hạt đích hoặc tế bào đích mà có thể phụ thuộc vào gắn kết kháng thể và trung gian bởi Fc γ R được biểu hiện bởi tế bào tác động. Biểu hiện của FcR cụ thể hoặc thụ thể hỗ trợ trên tế bào tác động có thể được điều chỉnh bởi yếu tố thể dịch như xytokin. Ví dụ, biểu hiện của Fc γ RI đã được tìm thấy để được điều chỉnh bởi interferon γ (IFN γ) và/hoặc G CSF. Biểu hiện được tăng cường này làm tăng hoạt tính gây độc tế bào của tế bào mang Fc γ RI chống lại đích. Tế bào tác động có thể thực bào hóa kháng nguyên đích hoặc thực bào hoặc dung giải tế bào đích. Theo một số phương pháp kháng thể bổ sung cổ điển được điều khiển hoạt động bổ sung dẫn đến các đoạn C3 trên ô đích. Các sản phẩm phân tách C3 này có thể thúc đẩy thực bào trực tiếp bằng tế bào tác động hoặc gián tiếp bằng cách tăng cường thực bào qua trung gian kháng thể.

Thuật ngữ “chức năng tác động Fc,” như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự tính để chỉ chức năng mà là hiệu quả của sự gắn kết polypeptit hoặc kháng thể với đích của nó, như kháng nguyên, trên màng tế bào trong đó chức năng tác động Fc được quy vào vùng Fc của polypeptit hoặc kháng thể. Ví dụ của chức năng tác động Fc bao gồm (i) gắn kết với C1q, (ii) hoạt hóa bổ thể, (iii) tính gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC), (iv) tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC), (v) gắn kết thụ thể Fc-gamma, (vi) thực bào tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP), (vii) tính gây độc tế bào tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDCC), (viii) tính gây độc tế bào được tăng cường bổ thể, (ix) gắn kết với thụ thể bổ thể của kháng thể opsonin hóa được trung gian bởi kháng thể, (x) opsonin hóa, (xi) trogocytosis và (xii) kết hợp của bất kỳ trong số (i) đến (xi).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hoạt hóa bổ thể” dùng để chỉ hoạt hóa con đường bổ thể cổ điển, được bắt đầu bởi phức hợp đại phân tử lớn được gọi là C1 gắn kết với phức hợp kháng thể-kháng nguyên trên bề mặt. C1 là phức hợp, gồm 6 protein nhận dạng C1q và hetero-tetrame của serin proteaza, C1r2C1s2. C1 là phức hợp protein thứ nhất trong các sự kiện ban đầu của chuỗi bổ thể cổ điển bao gồm một loạt các phản ứng phân cắt bắt đầu bằng sự phân cắt C4 thành C4a và C4b và C2 thành C2a và C2b. C4b được nộp lưu và tạo ra cùng với C2a convertaza hoạt tính enzym gọi

là C3 convertaza, phân cắt thành phần bổ thể C3 thành C3b và C3a, tạo thành C5 convertaza. Convertaza C5 này phân tách C5 thành C5a và C5b và thành phần cuối cùng được nộp lưu trên màng và điều đó lần lượt kích hoạt các sự kiện hoạt hóa bổ thể muộn trong đó các thành phần bổ thể đầu cuối C5b, C6, C7, C8 và C9 tập hợp thành phức hợp tấn công màng (MAC). Sự phân tầng bổ thể dẫn đến việc tạo ra các lỗ rỗng trong màng tế bào mà gây ra sự phân giải tế bào, còn được biết đến là độ gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC). Hoạt hóa bổ thể có thể được đánh giá bằng cách sử dụng hiệu quả C1q, thử nghiệm CDC được động học CDC (như được mô tả trong WO2013/004842, WO2014/108198) hoặc bằng phương pháp *Cellular deposition of C3b and C4b* được mô tả trong Beurskens et al., J Immunol April 1, 2012 vol. 188 no. 7, 3532-3541.

Thuật ngữ “tính gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể” (CDC), như được sử dụng trong bản mô tả này, dự định dùng để chỉ quy trình hoạt hóa bổ thể qua trung gian kháng thể dẫn đến phân giải tế bào mà kháng thể được gắn kết, mà, không bị ràng buộc bởi lý thuyết được cho là kết quả của lỗ rỗng trong màng được tạo ra bởi tổ hợp của cái gọi là phức hợp tấn công màng (MAC). Thử nghiệm thích hợp để đánh giá CDC đã biết trong lĩnh vực và bao gồm, ví dụ, thử nghiệm *in vitro*, trong đó huyết thanh của người bình thường được sử dụng làm nguồn bổ thể, như được mô tả trong ví dụ 3. Ví dụ không giới hạn của thử nghiệm để xác định phân giải tối đa tế bào biểu hiện CD38 như được trung gian bởi kháng thể CD38, hoặc giá trị EC50, có thể bao gồm các bước:

- (a) dàn mỏng khoảng 100000 tế bào biểu hiện CD38 trong 40 μ L môi trường nuôi cấy được bổ sung 0,2% BSA mỗi lỗ ở đĩa nhiều lỗ;
- (b) ủ sơ bộ tế bào trong 20 phút với 40 μ L kháng thể CD38 được pha loãng định kỳ (0,0002-10 μ g/mL);
- (c) ủ mỗi lỗ trong 45 phút ở 37°C với 20 phần trăm huyết thanh của người thông thường được tụ huyết;
- (d) bổ sung thuốc nhuộm có khả năng thực hiện và đo tỷ lệ phần trăm phân giải tế bào trên máy đo đếm tế bào theo dòng chảy;
- (e) xác định phân giải tối đa và/hoặc tính giá trị EC50 sử dụng phi tuyến hồi quy.

Thuật ngữ “gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể” (“ADCC”) như được sử dụng trong bản mô tả này, là dự tính dùng để chỉ cơ chế tiêu diệt tế bào đích được bao kháng thể bằng tế bào biểu hiện thụ thể Fc mà nhận ra vùng hằng định của kháng thể được gắn kết. Thử nghiệm thích hợp để đánh giá ADCC đã biết trong lĩnh vực và bao gồm, ví dụ, thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 4. Ví dụ không giới hạn của thử nghiệm để xác định ADCC của tế bào biểu hiện CD38 như qua trung gian kháng thể CD38 có thể chứa các bước của thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr hoặc thử nghiệm chỉ thị được nêu ở dưới.

ADCC với thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr

- (a) dàn mỏng khoảng 5000 ^{51}Cr được dán nhãn tế bào biểu hiện CD38 (ví dụ, tế bào Daudi) trong môi trường nuôi cấy 50 μL được bổ sung BSA 0,2% mỗi lỗ trong đĩa nhiều lỗ;
- (b) ủ sơ bộ tế bào trong 15 phút với 50 μL kháng thể CD38 được pha loãng định kỳ (0,0002-10 $\mu\text{g/mL}$);
- (c) ủ mỗi lỗ trong 4 giờ ở 37°C với 500000 tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) phân lập mới trên mỗi lỗ;
- (d) đo lượng ^{51}Cr giải phóng ở 75 μL dịch nổi bề mặt trên máy đếm gamma;
- (e) tính tỷ lệ phần trăm phân giải tế bào dưới dạng (mẫu cpm - phân giải tự phát cpm)/(phân giải tối đa cpm - phân giải tự phát cpm) trong đó cpm được tính mỗi phút.

ADCC với thử nghiệm chỉ thị

- (a) dàn mỏng khoảng 5000 tế bào biểu hiện CD38 (ví dụ, tế bào Daudi) trong 10 μL ở đĩa loại nhiều lỗ thích hợp để đọc quang (ví dụ, OptiPlates 384 lỗ từ PerkinElmer Inc.) trong môi trường tiêu chuẩn (ví dụ, RPMI 1640) được bổ sung huyết thanh IgG thấp 25%;
- (b) ủ mỗi lỗ trong 6 giờ ở 37°C với 10 μL tế bào Jurkat được thiết kế biểu hiện ổn định thụ thể $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$, biến thể V158 (ái lực cao), và phần tử đáp ứng NFAT điều khiển biểu hiện của luciferaza đom đóm là tế bào tác động và 10 μL kháng thể CD38 được pha loãng định kỳ (0,0002-10 $\mu\text{g/mL}$);
- (c) ủ mỗi lỗ 5 phút ở RT với 30 μL chất nền luciferaza và đo độ phát quang.

Thuật ngữ “thực bào tế bào phụ thuộc vào kháng thể” (“ADCP”) như được sử dụng trong bản mô tả này là dự tính để chỉ đến một cơ chế loại bỏ tế bào có thể bọc kháng thể bằng cách thực bào bên trong hóa. Tế bào đích được phủ kháng thể bên trong được chứa trong túi gọi là phagosome, sau đó kết hợp với một hoặc nhiều lysosome để tạo thành phagolysosome. Thử nghiệm thích hợp để đánh giá ADCP đã biết trong lĩnh vực và bao gồm, ví dụ, thử nghiệm gây độc cho tế bào in vitro với đại thực bào là tế bào tác động và kính hiển vi video như được mô tả bởi van Bij et al. in *Journal of Hepatology* Volume 53, Issue 4, October 2010, Pages 677–685, và thử nghiệm gây độc tế bào in vitro được mô tả trong ví dụ 5. Ví dụ không giới hạn của thử nghiệm để xác định ADCP của tế bào biểu hiện CD38 như được trung gian bởi kháng thể CD38 có thể bao gồm các bước:

- (a) biệt hóa bạch cầu đơn nhân mới phân lập thành đại thực bào với 5 ngày ủ trong môi trường chứa GM-CSF;
- (b) dàn mỏng khoảng 100000 đại thực bào mỗi lỗ ở đĩa loại nhiều lỗ trong môi trường tế bào tua với GM-CSF;
- (c) bổ sung 20000 tế bào biểu hiện CD38 opsonin hóa kháng thể CD38 (ví dụ, tế bào Daudi), được dán nhãn bằng thuốc nhuộm màng huỳnh quang chung, mỗi lỗ trong 45 phút ở 37°C;
- (d) đo tỷ lệ phần trăm đại thực bào dương tính với CD14, âm tính với CD19, dương tính với thuốc nhuộm màng trên máy đo đếm tế bào theo dòng chảy.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “trogocytosis” để chỉ đến quy trình được đặc trưng bởi việc chuyển các phân tử bề mặt tế bào từ một tế bào cho đến một tế bào nhận, như tế bào tác động. Tế bào nhận thường bao gồm tế bào T và B, bạch cầu đơn nhân to/đại thực bào, tế bào đuôi gai, bạch cầu trung tính và tế bào NK. Việc chuyển nhiễm phân tử bề mặt tế bào qua trung gian trogocytosis như, ví dụ, CD38, từ tế bào cho đến tế bào nhận cũng có thể dẫn đến việc chuyển nhiễm phức hợp kháng thể kháng nguyên từ tế bào cho sang tế bào nhận, tức là, phức hợp kháng thể kháng nguyên trong đó kháng thể được gắn vào phân tử bề mặt tế bào. Cụ thể là, dạng trogocytosis chuyên biệt có thể xảy ra khi tế bào nhận là tế bào tác động biểu hiện thụ thể Fc-gamma (FcγR); các tế bào nhận này có thể tiếp nhận và nội hóa phức hợp miễn dịch có liên quan đến tế bào cho gồm kháng thể đặc hiệu được gắn kết với kháng nguyên đích trên tế bào cho,

thông thường sau khi gắn kết Fc γ R vào vùng Fc của kháng thể. Thử nghiệm thích hợp để đánh giá trogocytosis đã biết trong lĩnh vực và bao gồm, ví dụ, thử nghiệm trong ví dụ 8. Ví dụ không giới hạn của thử nghiệm để xác định trogocytosis của tế bào biểu hiện CD38 như được trung gian bởi kháng thể CD38 bao gồm các thử nghiệm sau:

Trogocytosis (tế bào Daudi):

- (a') biệt hóa mới phân lập đơn nhân bạch cầu thành đại thực bào với 5 ngày GM-CSF;
- (b') dàn mỏng khoảng 100000 đại thực bào mỗi lỗ trong môi trường tế bào đuôi gai với GM-CSF;
- (c') bổ sung khoảng 20000 tế bào Daudi opsonin hóa kháng thể CD38, được dán nhãn bằng chất nhuộm màng huỳnh quang chung, mỗi lỗ trong 45 phút ở 37°C;
- (d') đo biểu hiện CD38 trên tế bào Daudi ở máy đếm tế bào theo dòng chảy, trong đó CD38 giảm ở tế bào Daudi opsonin hóa kháng thể CD38 khi so sánh với trogocytosis đối chứng.

Trogocytosis (Treg):

- (a) dàn mỏng khoảng 500000 PBMC mới phân lập với mỗi lỗ trong môi trường nuôi cấy tế bào O/N ở 37°C;
- (b) bổ sung khoảng 100000, Treg được opsonin hóa kháng thể CD38, được dán nhãn bằng thuốc nhuộm amin nội bào phát quang chung, mỗi lỗ qua đêm (O/N) ở 37°C; và
- (c) đo biểu hiện CD38 trên Treg trên máy đo đếm tế bào theo dòng chảy, trong đó CD38 giảm trên Treg opsonin hóa kháng thể CD38 khi so sánh với đối chứng biểu thị trogocytosis.

Đối chứng có thể được chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực dựa trên mục đích cụ thể của nghiên cứu hoặc thử nghiệm đang quan tâm. Tuy nhiên, ví dụ không giới hạn của đối chứng bao gồm (i) sự vắng mặt của kháng thể bất kỳ và (ii) kháng thể đối chứng isotyp. Một ví dụ của kháng thể đối chứng isotyp là kháng thể b12, có trình tự VH và VL được mô tả trong bảng 1. Theo một số phương án, trong đó muốn đánh giá hiệu quả trogocytosis của biến thể kháng thể như được mô tả trong bản mô tả

này, đối chứng có thể là (iii) kháng thể mẹ hoặc tham chiếu có vùng gắn kết kháng nguyên khác và/hoặc vùng Fc khác.

Theo một số phương án, ở bước (b), ngoài ra hoặc thay thế đối với thuốc nhuộm amin nội bào huỳnh quang, Treg được dán nhãn bằng thuốc nhuộm màng huỳnh quang chung.

Theo một số phương án, ở bước (d') và (c) của thử nghiệm xác định trogocytosis được nêu ở trên, cũng có thể đo được sự giảm của kháng thể CD38 trên tế bào cho. Ví dụ, trong trường hợp kháng thể CD38 là kháng thể IgG (huIgG) của người, có thể sử dụng kháng thể thứ hai để phát hiện huIgG.

Ngoài tế bào Daudi (ATCC CCL-213), tế bào khối u thích hợp cho thử nghiệm thứ nhất bao gồm, mà không giới hạn, các tế bào được liệt kê trong bảng 2, cụ thể là các tế bào có biểu hiện CD38 cao.

Ngoài Treg, tế bào biểu hiện CD38 thích hợp cho thử nghiệm thứ hai bao gồm tế bào miễn dịch như, ví dụ, tế bào NK, tế bào B, tế bào T và bạch cầu đơn nhân to, cũng như tế bào khối u được liệt kê ở bảng 2, cụ thể là các tế bào có mức biểu hiện CD38 thấp.

Thuật ngữ “vector,” như được sử dụng trong bản mô tả này, dự tính để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng cảm ứng phiên mã của mảnh axit nucleic được nối vào vector. Một loại vector là “plasmid”, ở dạng vòng ADN có chuỗi kép dạng vòng. Loại vector khác là vector virus, trong đó mảnh axit nucleic có thể được nối vào bộ gen của virus. Một số vector nhất định có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà chúng được đưa ra (ví dụ vector vi khuẩn có nguồn gốc vi khuẩn sao chép và vector động vật có vú theo từng giai đoạn). Các vector khác (như vector của động vật có vú không phân đoạn) có thể được tích hợp vào bộ gen của tế bào chủ khi được đưa vào tế bào chủ, và do đó được sao chép cùng với bộ gen của vật chủ. Ngoài ra, một số vector nhất định có khả năng hướng biểu hiện của gen mà chúng được liên kết một cách hoạt động. Các vector này trong bản mô tả này được gọi là “vector biểu hiện tái tổ hợp” (hoặc đơn giản là, “vector biểu hiện”). Nói chung, vector biểu hiện hữu ích trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmid. Trong bản mô tả này, “plasmid” và “vector” có thể được sử dụng thay thế cho nhau vì plasmid là dạng vector được sử dụng phổ biến nhất. Tuy nhiên, sáng chế dự tính bao gồm

các dạng khác của vectơ biểu hiện, như vectơ virus (như retrovirus, adenovirus và virus có liên quan đến adeno khiếm khuyết trong sao chép), bảo toàn chức năng tương đương.

Thuật ngữ “tế bào chủ tái tổ hợp” (hoặc đơn giản là “tế bào chủ”), như được sử dụng trong bản mô tả này, dự tính dùng để chỉ tế bào mà một hoặc nhiều vectơ biểu hiện đã được đưa vào. Ví dụ, HC và LC của biến thể kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này đều có thể được mã hóa bởi cùng một vectơ biểu hiện, và tế bào chủ được chuyển nhiễm với vectơ biểu hiện. Theo cách khác, HC và LC của biến thể kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này có thể được mã hóa bởi các vectơ biểu hiện khác nhau, và tế bào chủ đồng chuyển nhiễm với vectơ biểu hiện. Cần hiểu rằng thuật ngữ “tế bào chủ” được dự tính không chỉ dùng để chỉ tế bào đối tượng cụ thể, mà còn cho thế hệ con cháu của tế bào này. Vì một số biến đổi nhất định có thể xảy ra ở thế hệ kế tiếp do ảnh hưởng của đột biến hoặc môi trường, thế hệ con cháu này trên thực tế có thể không giống với tế bào mẹ, nhưng vẫn được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ “tế bào chủ” như được sử dụng trong bản mô tả này. Tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm, ví dụ, thể chuyển nhiễm, như tế bào CHO, tế bào HEK-293, tế bào PER.C6, tế bào NS0, và tế bào lympho, và tế bào không có nhân điển hình như *E. coli* và các tế bào chủ có nhân điển hình khác như tế bào thực vật và nấm.

Thuật ngữ “thể chuyển nhiễm”, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm tế bào chủ có nhân điển hình tái tổ hợp biểu hiện Ab hoặc kháng nguyên đích, như tế bào CHO, PER.C6, tế bào NS0, tế bào HEK 293, tế bào thực vật, hoặc nấm, bao gồm tế bào nấm men.

Thuật ngữ “điều trị” dùng để chỉ việc sử dụng lượng có hiệu quả của biến thể kháng thể có hoạt tính điều trị theo sáng chế với mục đích làm bớt đau, cải thiện, làm dừng hoặc loại bỏ (chữa khỏi) các triệu chứng hoặc trạng thái bệnh.

Thuật ngữ “lượng có hiệu quả” hoặc “lượng có hiệu quả điều trị” dùng để chỉ lượng hiệu quả, với liều và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể có thể thay đổi theo yếu tố như trạng thái bệnh, tuổi, giới tính và cân nặng của cá thể, và khả năng kháng thể tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể. Lượng có hiệu quả điều trị cũng là lượng trong đó tác dụng

độc hại hoặc có hại bất kỳ của biến thể kháng thể được bù đắp bởi tác dụng có lợi về mặt điều trị.

Phương án cụ thể của sáng chế

Như được mô tả ở trên, sáng chế quan tâm kháng thể mà là biến thể CD38 C có thể kháng thể được, công cụ này có thể chứa biến Fc vùng có thể chứa biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440 trong một chuỗi nặng IgG1 của người.

Như được thể hiện ở ví dụ 3, CDC được tăng cường cho tất cả ba kháng thể IgG1 CD38 được thử nghiệm – A, B và C - khi đưa vào đột biến E430G. Đáng ngạc nhiên là, tuy nhiên, độ lớn của tăng cường CDC khác giữa các bản sao kháng thể được thử nghiệm. Không có đột biến E430G, IgG1-B đã là tác nhân gây cảm ứng CDC tốt, trong khi IgG1-C và IgG1-A cảm ứng khiêm tốn và không có CDC tương ứng. Dù sao, sau khi đưa vào đột biến E430G, tuy nhiên, IgG1-C-E430G cảm ứng CDC có hiệu quả hơn so với IgG1-B-E430G. Cụ thể là trong tế bào khối u và tế bào T điều hòa có mức biểu hiện CD38 thấp hơn, giá trị EC50 của IgG1-C-E430G thấp hơn so với giá trị của IgG1-B-E430G.

Ngoài ra, biến thể kháng thể theo sáng chế cũng có thể biểu lộ ADCC. Ví dụ, như được thể hiện ở ví dụ 4, IgG1-C đạt được phần trăm phân giải tối đa cao hơn khi so sánh với IgG1-B ở thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr và gắn kết FcγRIIIa tăng ở thử nghiệm chỉ thị ADCC khi so sánh với IgG1-B. Việc đưa vào đột biến E430G làm giảm phần trăm phân giải tối đa trong thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr và gắn kết FcγRIIIa ở thử nghiệm chỉ thị ADCC cho tất cả ba kháng thể. IgG1-C-E430G cảm ứng phân giải phần trăm tối đa tương tự khi so sánh với IgG1-B-E430G và IgG1-A-E430G trong thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr và gắn kết FcγRIIIa tương tự ở thử nghiệm chỉ thị ADCC.

Ngoài ra, khả năng kháng thể kháng CD38 ức chế hoạt tính CD38 xyclaza có thể được giữ lại ở dạng biến thể kháng thể theo sáng chế. Ví dụ, như được thể hiện trong ví dụ 7, IgG1-C-E430G biểu thị ức chế hoạt tính CD38 xyclaza mạnh hơn so với IgG1-B-E430G, IgG1-C-E430G dẫn đến ức chế là khoảng 40% và IgG1-B-E430G khoảng 25%. Không bị giới hạn về mặt lý thuyết, ức chế hoạt tính CD38 xyclaza mạnh hơn có thể làm giảm sản xuất cADPR, chất truyền tin mạnh thứ hai điều hòa sự huy động Ca^{2+} từ

phần bào tan, do đó có thể dẫn đến giảm huy động Ca^{2+} và giảm tín hiệu của con đường xuôi dòng mà kiểm soát các quá trình sinh học khác nhau, như tăng sinh và tiết insulin. Vì vậy, không bị giới hạn về mặt lý thuyết, ức chế hoạt tính CD38 xyclaza mạnh hơn có thể ảnh hưởng đến, ví dụ, giảm, khả năng của tế bào ức chế miễn dịch để ngăn chặn đáp ứng miễn dịch.

Các chức năng khác mà có thể được điều biến bao gồm trogocytosis. Cụ thể là, biểu hiện CD38 trên tế bào Daudi bị giảm đáng kể bằng cách đồng nuôi cấy với đại thực bào và kháng thể CD38; tuy nhiên, mức giảm biểu hiện CD38 là mạnh nhất với kháng thể đột biến E430G (ví dụ 8). Đáng ngạc nhiên là, biểu hiện CD38 trên tế bào điều hòa T đồng nuôi cấy với PBMC chỉ giảm sau khi ủ với kháng thể CD38 đột biến E430G; không giảm biểu hiện CD38 được tìm thấy khi tế bào điều hòa T được ủ với kháng thể B. Tuy nhiên, không bị giới hạn về lý thuyết, khả năng của biến thể có thể theo để bật chế độ tế bào cảm ứng của CD38-biểu hiện, không gây bệnh ung thư miễn dịch tế bào, công cụ có thể là chất ức chế miễn dịch tế bào, có thể trong bệnh ung thư tế bào có kết quả tăng miễn dịch phản hồi chống tế bào khối u, không phân biệt tế bào khối u biểu hiện CD38 hay không.

Biến thể kháng thể theo sáng chế cũng có thể có khả năng diệt tế bào khối u in vivo như được thể hiện ở ví dụ 9, trong đó hai liều IgG1-C-E430G hàng tuần giảm tăng trưởng khối u ở hai trong số năm mô hình DLBCL PDX được thử nghiệm có biểu hiện mARN CD38 cao nhất.

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất biến thể kháng thể gắn kết với CD38 của người, biến thể kháng thể này chứa vùng gắn kết kháng nguyên chứa CDR VH và VL của kháng thể C như nêu là SEQ ID NO:2 (VH-3003-C_CDR1), SEQ ID NO:3 (VH-3003-C_CDR2), SEQ ID NO:4 (VH-3003-C_CDR3), SEQ ID NO:6 (VL-3003-C_CDR1), AAS (VL-3003-C_CDR2) và SEQ ID NO:7 (VL-3003-C_CDR3) ở bảng 1, và vùng Fc biến thể chứa đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440 ở chuỗi nặng IgG1 của người.

Theo một phương án, biến thể kháng thể gắn kết với CD38 của người chứa

(a) vùng gắn kết kháng nguyên chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như

nêu trong SEQ ID NO:4, VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7, và

(b) vùng Fc biến thể chứa đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440 ở chuỗi nặng IgG1 của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU.

Theo phương án khác, biến thể kháng thể cũng có thể hoặc theo một cách khác được đặc trưng bởi trình tự axit amin đặc hiệu hoặc đột biến đặc hiệu ở vùng gắn kết kháng nguyên hoặc vùng Fc và/hoặc bởi khả năng cảm ứng chức năng tác động hoặc điều biến hoạt tính enzym CD38 của nó. Các trình tự này còn được mô tả bên dưới.

Vùng gắn kết kháng nguyên và vùng biến đổi

Vùng gắn kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều miền biến đổi kháng thể cho phép gắn kết cụ thể với CD38, như vùng VH và vùng VL. Tương tự, chuỗi nặng và nhẹ chứa vùng VH và VL, tương ứng. Trong tham khảo sau đây với trình tự ở vùng gắn kết kháng nguyên có thể áp dụng tương tự với trình tự của chuỗi nặng và/hoặc nhẹ của biến thể kháng thể theo sáng chế. Thuận lợi là, CDR, vùng VH và/hoặc vùng VL tương tự hoặc giống với vùng của kháng thể C, như nêu trong bảng 1.

Theo một phương án được ưu tiên, vùng gắn kết kháng nguyên, và/hoặc chuỗi nặng và/hoặc nhẹ chứa CDR của kháng thể C, được nêu như SEQ ID NO:2 (VH-3003-C_CDR1), SEQ ID NO:3 (VH-3003-C_CDR2), SEQ ID NO:4 (VH-3003-C_CDR3), SEQ ID NO:6 (VL-3003-C_CDR1), AAS (VL-3003-C_CDR2) và SEQ ID NO:7 (VL-3003-C_CDR3). Theo phương án được ưu tiên khác, trình tự VH và VL là trình tự của kháng thể C, tức là, vùng VH chứa trình tự của SEQ ID NO:1 (VH-3003-C) và vùng VL chứa trình tự của SEQ ID NO:5 (VL-3003-C).

Tuy nhiên, đã được biết trong lĩnh vực là đột biến ở VH và VL của kháng thể có thể được tạo để, ví dụ, làm tăng ái lực của kháng thể với kháng nguyên đích của nó, giảm khả năng sinh miễn dịch tiềm tàng của nó và/hoặc để làm tăng sản lượng của kháng thể có thể được biểu hiện bởi tế bào chủ. Theo đó, theo một số phương án, kháng thể chứa biến thể của trình tự CDR, VH và/hoặc VL của kháng thể C cũng được dự tính, cụ thể là biến thể chức năng của vùng VL và/hoặc VH của kháng thể C. Các biến thể chức năng có thể khác nhau ở một hoặc nhiều axit amin khi so sánh với trình tự VH và/hoặc

VL mẹ, ví dụ, ở một hoặc nhiều CDR, nhưng vẫn cho phép vùng gắn kết kháng nguyên giữ lại ít nhất là tỷ lệ đáng kể (ít nhất là khoảng 50 phần trăm, 60 phần trăm, 70 phần trăm, 80 phần trăm, 90 phần trăm, 95 phần trăm hoặc nhiều hơn) ái lực và/hoặc độ đặc hiệu của kháng thể mẹ. Thông thường, biến thể chức năng này giữ lại độ tương đồng trình tự đáng kể với trình tự mẹ. Biến thể ví dụ bao gồm các biến thể khác với vùng VH hoặc VL mẹ tương ứng khoảng 12 đột biến hoặc ít hơn, như 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 như thế, chèn hoặc xóa gốc axit amin. Biến thể ví dụ bao gồm các biến thể khác với vùng VH và/hoặc VL và/hoặc CDR của trình tự mẹ chủ yếu bởi thế axit amin bảo toàn; ví dụ, 12, như 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 trong số các thế axit amin ở biến thể có thể bảo toàn. Trong một số trường hợp, kháng thể chứa biến thể của VH và/hoặc VL của kháng thể C có thể có liên quan đến ái lực và/hoặc độ đặc hiệu lớn hơn so với kháng thể mẹ. Đối với mục đích của sáng chế, biến thể VH và/hoặc VL cho phép ái lực được giữ lại hoặc được cải thiện và tính đặc hiệu của kháng thể ở gắn kết của nó với CD38 được ưu tiên đặc biệt.

Ví dụ, WO 2011/154453 A1 bộc lộ kháng thể CD38 chứa trình tự axit amin vùng CDR, VH và VL biến thể thích hợp, trong đó gốc axit amin ở một số vị trí nhất định khác với gốc ở CDR, VH và VL của kháng thể C như được thể hiện ở bảng 1. Các vị trí này vì vậy là vị trí ứng viên trong đó đột biến ở trình tự CDR, VH và VL có thể được tạo trong khi ái lực giữ lại hoặc cải thiện và tính đặc hiệu của kháng thể ở gắn kết của nó với CD38. Cụ thể là, vị trí ở CDR VH và VL có thể được đột biến trong biến thể chức năng của VH và VL của kháng thể C được chỉ ra trong SEQ ID NO: 40 đến 43.

Vì thế, theo một số phương án, một hoặc nhiều đột biến cụ thể được tạo ở CDR như nêu trong SEQ ID NO:40 đến 43, tức là, biến thể chức năng bất kỳ của vùng VH và/hoặc VL chứa đột biến ở CDR như nêu trong một hoặc nhiều trong số SEQ ID NO:40 (VH CDR1), SEQ ID NO:41 (VH CDR2), SEQ ID NO:42 (VH CDR3), và SEQ ID NO:44 (VL CDR3). Vùng VH và VL của biến thể kháng thể này có thể tùy ý là duy trì vùng khung ban đầu của kháng thể C. Theo một phương án cụ thể, vùng gắn kết kháng nguyên chứa CDR như nêu trong SEQ ID NO:40 trong đó X₁ là S (VH CDR1), SEQ ID NO:41 trong đó X₁ là R, X₂ là K, X₃ là A (VH CDR2), SEQ ID NO:42 trong đó X₁ là A, X₂ là D và X₃ là V (VH CDR3), SEQ ID NO:43 (VL CDR1), AAS (VL CDR2) và SEQ ID NO:44 trong đó X₁ là S (VL CDR3). Theo một phương án cụ thể, vùng gắn kết

kháng nguyên chứa CDR như nêu trong SEQ ID NO:40 trong đó X₁ là R (VH CDR1), SEQ ID NO:41 trong đó X₁ là V, X₂ là K, X₃ là T (VH CDR2), SEQ ID NO:42 trong đó X₁ là T, X₂ là A và X₃ là F (VH CDR3), SEQ ID NO:43 (VL CDR1), AAS (VL CDR2) và SEQ ID NO:44 trong đó X₁ là N (VL CDR3). Theo một phương án cụ thể, vùng gắn kết kháng nguyên chứa CDR như nêu trong SEQ ID NO:40 trong đó X₁ là S (VH CDR1), SEQ ID NO:41 trong đó X₁ là R, X₂ là K, X₃ là T (VH CDR2), SEQ ID NO:42 trong đó X₁ là A, X₂ là D và X₃ là V (VH CDR3), SEQ ID NO:43 (VL CDR1), AAS (VL CDR2) và SEQ ID NO:44 trong đó X₁ là S (VL CDR3). Theo một phương án cụ thể, vùng gắn kết kháng nguyên chứa CDR như nêu trong SEQ ID NO:40 trong đó X₁ là R (VH CDR1), SEQ ID NO:41 trong đó X₁ là V, X₂ là K, X₃ là V (VH CDR2), SEQ ID NO:42 trong đó X₁ là T, X₂ là A và X₃ là F (VH CDR3), SEQ ID NO:43 (VL CDR1), AAS (VL CDR2) và SEQ ID NO:44 trong đó X₁ là N (VL CDR3).

Theo một số phương án, đột biến không được tạo ở CDR, *tức là*, biến thể chức năng bất kỳ của vùng VH và/hoặc VL Giữ lại các tự động CDR được nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 6, AAS, SEQ ID NO: 7, tương ứng với VH CDR1-3 hoặc VL CDR1 -3 trình tự của kháng thể C.

Theo một phương án, vùng VH chứa SEQ ID NO:1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 80%, như 90%, hoặc 95%, hoặc 97%, hoặc 98%, hoặc 99%, với SEQ ID NO:1. Ví dụ, VH có thể khác với SEQ ID NO:1 bởi 12 hoặc ít hơn, như 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 đột biến như thế, chèn hoặc làm khuyết gốc axit amin. Theo một phương án, vùng VH khác với SEQ ID NO:1 chỉ trong 12 hoặc ít hơn, như 5 hoặc ít hơn, như 5, 4, 3, 2 hoặc 1 axit amin thế. Thế axit amin có thể là, ví dụ, thế axit amin bảo toàn như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án cụ thể, đột biến không được tạo ra trong VH CDR, *tức là*, VH biến thể bất kỳ giữ lại trình tự C CDR được nêu trong SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4.

Theo một phương án, vùng VL chứa SEQ ID NO:5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 80%, như 90%, hoặc 95%, hoặc 97%, hoặc 98%, hoặc 99%, với SEQ ID NO:5. Ví dụ, VL có thể khác với SEQ ID NO:5 khoảng 12 hoặc ít hơn, như 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 đột biến như thế, chèn hoặc xóa gốc axit amin. Theo một phương án, vùng VL khác với SEQ ID NO:5 chỉ ở 12 hoặc ít hơn, như 5 hoặc ít hơn,

như 5, 4, 3, 2 hoặc 1 thể axit amin. Thể axit amin có thể, ví dụ, là thể axit amin bảo toàn như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án cụ thể, đột biến không được tạo trong VL CDR, tức là, VH biến thể bất kỳ giữ lại trình tự C CDR được nêu trong SEQ ID NO:6, AAS, SEQ ID NO:7.

Theo một phương án, biến thể kháng thể chứa vùng VH chứa trình tự của SEQ ID NO:1 và vùng VL chứa trình tự của SEQ ID NO:5.

Vùng Fc biến thể, và vùng CH

Đột biến ở gốc axit amin tại vị trí tương ứng với E430, E345 và S440 ở chuỗi nặng IgG1 của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU, có thể cải thiện khả năng của một cảm biến thành CDC cảm ứng (xem, ví dụ, ví dụ 3). Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, được tin rằng bằng cách thế một hoặc nhiều axit amin ở các vị trí này, có thể kích thích oligome hóa kháng thể, do đó điều biến chức năng tác động để, ví dụ, tăng gắn kết C1q, hoạt hóa bổ thể, CDC, ADCP, nội hóa hoặc (các) chức năng có liên quan khác có thể tạo ra hiệu quả in vivo.

Sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể chứa vùng gắn kết kháng nguyên và vùng Fc biến thể.

Theo một số phương án nhất định, biến thể kháng thể gắn kết với CD38 của người chứa

(a) chuỗi nặng chứa vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng IgG1 CH của người có đột biến ở một hoặc nhiều trong số E430, E345 và S440, gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU;

(b) chuỗi nhẹ chứa vùng VL chứa VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một số phương án nhất định khác, biến thể kháng thể gắn kết với CD38 của người chứa

(a) chuỗi nặng chứa vùng VH chứa SEQ ID NO:1 và vùng CH IgG1 của người với đột biến ở một hoặc nhiều trong số E430, E345 và S440, gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU, và

(b) chuỗi nhẹ chứa vùng VL chứa SEQ ID NO:5.

Biến thể kháng thể theo sáng chế chứa vùng Fc biến thể hoặc vùng CH IgG1 của người chứa đột biến ở một hoặc nhiều trong số E430, E345 và S440. Trong tham chiếu sau đây với đột biến ở vùng Fc có thể áp dụng tương tự với (các) biến thể ở vùng IgG1 CH của người.

Như được mô tả trong bản mô tả này, vị trí của axit amin cần được đột biến trong vùng Fc có thể được đưa ra liên quan đến (tức là, “tương ứng với”) vị trí của nó trong chuỗi nặng IgG1 của người (kiểu đại) có trong tự nhiên, khi được đánh số theo chỉ số EU. Vì vậy, nếu vùng Fc mẹ đã chứa một hoặc nhiều đột biến và/hoặc nếu vùng Fc mẹ, ví dụ, vùng Fc IgG2, IgG3 hoặc IgG4, thì vị trí của axit amin tương ứng với gốc axit amin như, ví dụ, E430 ở chuỗi nặng IgG1 của người được đánh số theo chỉ số EU có thể được xác định bằng cách sắp hàng. Cụ thể là, vùng Fc mẹ được căn chỉnh với trình tự chuỗi nặng IgG1 kiểu đại của người để xác định gốc trong vị trí tương ứng với E430 ở trình tự chuỗi nặng IgG1 của người. Trình tự axit amin vùng hằng định IgG1 của người kiểu đại bất kỳ có thể hữu ích cho mục đích này, bao gồm trình tự bất kỳ trong số các allotyp IgG1 khác nhau của người được nêu trong bảng 1. Điều này được minh họa trên Fig. 1, thể hiện sự căn chỉnh giữa hai allotyp IgG1 khác nhau của người - IgG1m(f) và IgG1m(a) - và IgG2, IgG3 và IgG4 kiểu đại của người, đặc biệt là của các mảnh tương ứng với gốc P247 đến K447 ở chuỗi nặng IgG1 của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU.

Theo đó, trong các đoạn còn lại của phần này và chỗ khác trong bản mô tả này, trừ khi được chỉ định hoặc mâu thuẫn bởi ngữ cảnh, vị trí axit amin để chỉ là vị trí tương ứng với gốc axit amin trong chuỗi nặng IgG1 kiểu đại của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU.

Theo các phương án riêng biệt và cụ thể, vùng Fc biến thể và/hoặc vùng CH IgG1 của người chứa đột biến chỉ ở một trong số E430, E345 và S440; ở cả E430 và E345; ở cả E430 và S440; ở cả E345 và S440; hoặc ở tất cả E430, E345 và S440. Theo một số phương án, vùng Fc biến thể và/hoặc vùng CH IgG1 của người chứa đột biến chỉ ở một trong số E430, E345 và S440; ở cả E430 và E345; ở cả E430 và S440; ở cả E345 và S440; hoặc ở tất cả E430, E345 và S440, với điều kiện đột biến bất kỳ trong S440 là

S440W hoặc S440Y. Theo các phương án khác biệt và cụ thể, đột biến là thể axit amin. Theo một phương án đột biến là thể axit amin chỉ ở một trong số E430X, E345X và S440X; trong cả E430X và E345X; trong cả E430X và S440X; trong cả E345X và S440X; hoặc trong tất cả E430X, E345X và S440X, chỉ với điều kiện mà biến đổi bất kỳ trong S440X là S440Y hoặc S440W. Tốt hơn là, đột biến E430X, E345X và S440X được lựa chọn riêng biệt từ E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y và S440W.

Theo một phương án, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm gồm E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y và S440W.

Theo phương án được ưu tiên, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430G, E345K, E430S và E345Q.

Theo một phương án, đột biến có trong gốc axit amin tương ứng với E430, như thể axit amin, E430X, ví dụ, được chọn từ các gốc axit amin tương ứng với E430G, E430S, E430F hoặc E430T. Theo một phương án được ưu tiên, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin chứa E430G. Theo phương án khác được ưu tiên, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin chứa E430S, tùy ý trong đó đột biến không được tạo ra ở gốc axit amin tương ứng với E345 và S440. Theo phương án được ưu tiên đặc biệt, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin gồm E430G, tức là, đột biến không được tạo ở gốc axit amin tương ứng với E345 và S440.

Theo một phương án, đột biến ở gốc axit amin tương ứng với E345, như thể axit amin, E345X, ví dụ, được chọn từ các gốc axit amin tương ứng với E345K, E345Q, E345R và E345Y. Theo một phương án được ưu tiên, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin chứa E345K. Theo phương án khác được ưu tiên, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin chứa E345Q, tùy ý trong đó đột biến không được tạo ra ở gốc axit amin tương ứng với E430 và S440. Theo phương án được ưu tiên đặc biệt, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin bao gồm E345K, tức là, đột biến không được tạo ở gốc axit amin tương ứng với E430 và S440.

Theo một phương án, đột biến ở gốc axit amin tương ứng với S440, như thể axit amin, S440X, thông thường được chọn từ gốc tương ứng với S440Y và S440W. Theo

một phương án được ưu tiên, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin chứa S440W, tùy ý trong đó biến thể không được tạo ra ở gốc axit amin tương ứng với E430 và E345. Theo một phương án được ưu tiên, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin chứa S440Y, tùy ý trong đó biến thể không được tạo ra ở gốc axit amin tương ứng với E430 và E345.

Tốt hơn là, biến thể kháng thể chứa vùng Fc biến thể theo phần bất kỳ trong số các phần nêu trên, vùng Fc biến thể là biến thể của vùng Fc IgG của người được chọn từ nhóm gồm vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 của người. Đó là, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng với E430, E345 và S440 được tạo ở vùng Fc mẹ mà là vùng Fc IgG của người được chọn từ nhóm gồm vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Tốt hơn là, vùng Fc mẹ là vùng Fc IgG có trong tự nhiên (kiểu đại) của người, như vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 kiểu đại của người, hoặc isotyp hỗn hợp của chúng. Vì vậy, vùng Fc biến thể có thể, ngoại trừ đột biến được chỉ ra (trong một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440), là isotyp IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người hoặc isotyp hỗn hợp của chúng.

Theo một phương án, vùng Fc mẹ và/hoặc vùng CH IgG1 của người là isotyp IgG1 kiểu đại của người.

Do đó, vùng Fc biến thể có thể ngoại trừ đột biến được chỉ ra (ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440), là vùng Fc IgG1 của người.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc mẹ và/hoặc vùng CH IgG1 của người là isotyp IgG1m(f) kiểu đại của người.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc mẹ và/hoặc vùng CH IgG1 của người là isotyp IgG1m(z) kiểu đại của người.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc mẹ và/hoặc vùng CH IgG1 của người là isotyp IgG1m(a) kiểu đại của người.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc mẹ và/hoặc vùng CH IgG1 của người là isotyp IgG1m(x) kiểu đại của người.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc mẹ và/hoặc vùng CH IgG1 của người là IgG1 kiểu đại của người có allotyp hỗn hợp, như IgG1m (za), IgG1m (zax), IgG1m (fa), hoặc tương tự.

Do đó, vùng Fc biến thể và/hoặc vùng CH IgG1 của người có thể, ngoại trừ đột biến đã nêu (ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440), là allotyp IgG1m (f), IgG1m (a), IgG1m (x), IgG1m (z) của người hoặc allotyp hỗn hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều allotyp.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc mẹ và/hoặc vùng CH IgG1 của người là isotyp IgG1m(za) kiểu đại của người.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc mẹ là isotyp IgG2 kiểu đại của người.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc mẹ là isotyp IgG3 kiểu đại của người.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc mẹ là isotyp IgG4 kiểu đại của người.

Trình tự axit amin vùng CH của ví dụ cụ thể của isotyp IgG kiểu đại của người và allotyp IgG1 được nêu trong bảng 1. Theo một số phương án, vùng Fc mẹ chứa CH2-CH3 hoặc, tùy ý là, mảnh bản lề-CH2-CH3 của trình tự axit amin vùng CH kiểu đại này.

Vì vậy, theo một phương án cụ thể, vùng Fc mẹ là một loại cây đại IgG1 của người dùng isotyp có thể chứa gốc axit amin tương ứng với 231-447 trong chuỗi nặng IgG1 của người theo đánh số EU. Ví dụ, vùng Fc mẹ có thể chứa gốc axit amin 114 đến 330 (đánh số trực tiếp) của chất tự được chọn từ bao gồm nhóm của SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23 Theo một phương án cụ thể, vùng Fc mẹ là isotyp IgG1 kiểu đại của người có thể chứa gốc axit amin tương ứng với 216-447 trong IgG1 dạng chuỗi của người dùng đến EU đánh số. Ví dụ, vùng Fc mẹ có thể chứa các gốc axit amin 99 đến 330 (đánh số trực tiếp) của trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 và SEQ ID NO: 23. Như được mô tả trong bản mô tả này cho sản xuất kháng thể trị liệu, axit amin đầu tận C K447 đôi khi có thể được xóa hoặc loại bỏ. Do đó vùng Fc mẹ có thể chứa gốc axit amin 114 đến 329 (đánh số trực tiếp) hoặc gốc axit amin 99 đến 329 (đánh số trực tiếp) của SEQ ID NO: 45.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc biến thể là biến thể của isotyp IgG1 kiểu đại của người chứa gốc axit amin tương ứng với 231-447 trong chuỗi nặng IgG1 của người theo đánh số EU. Ví dụ, vùng Fc biến thể có thể chứa gốc axit amin 114 đến 330 (đánh số trực tiếp) của trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33. Theo phương án khác vùng Fc biến thể có thể chứa gốc axit amin từ 114 đến 329 (đánh số trực tiếp) của SEQ ID NO: 46.

Theo một phương án cụ thể, vùng Fc biến thể là biến thể của isotyp IgG1 kiểu đại của người chứa gốc axit amin tương ứng với 216-447 ở chuỗi nặng IgG1 của người theo đánh số EU. Ví dụ, vùng Fc biến thể có thể chứa gốc axit amin 99 đến 330 (đánh số trực tiếp) của trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33. Theo phương án khác vùng Fc biến thể có thể chứa gốc axit amin từ 99 đến 329 (đánh số trực tiếp) của SEQ ID NO: 46.

Vì vậy, sáng chế có thể được áp dụng cho phân tử kháng thể có chuỗi nặng IgG1 của người, như chuỗi nặng IgG1 của người chứa trình tự axit amin vùng CH IgG1 của người chứa SEQ ID NO: 19 (IgGm (za)). Do đó, vùng CH IgG1 của người có thể chứa, ngoại trừ đột biến đã nêu, trình tự của SEQ ID NO:19.

Sáng chế cũng có thể được áp dụng cho phân tử kháng thể có chuỗi nặng IgG1 của người, như chuỗi nặng IgG1 của người chứa trình tự axit amin vùng CH IgG1 của người chứa SEQ ID NO: 20 (IgGm (f)) hoặc SEQ ID NO: 45. Như vậy, vùng CH IgG1 của người có thể chứa, ngoại trừ đột biến đã nêu, trình tự của SEQ ID NO: 20. Theo phương án khác, vùng CH IgG1 của người có thể chứa, ngoại trừ đột biến đã nêu, trình tự của SEQ ID NO: 45.

Sáng chế cũng có thể được áp dụng cho phân tử kháng thể có chuỗi nặng IgG1 của người, như chuỗi nặng IgG1 của người chứa trình tự axit amin vùng CH IgG1 của người chứa SEQ ID NO: 21 (IgGm (z)). Do đó, vùng CH IgG1 của người có thể chứa, ngoại trừ đột biến đã nêu, trình tự của SEQ ID NO:21.

Sáng chế cũng có thể được áp dụng cho phân tử kháng thể có chuỗi nặng IgG1 của người, như chuỗi nặng IgG1 của người chứa trình tự axit amin vùng CH IgG1 của người chứa, SEQ ID NO: 22 (IgGm (a)). Do đó, vùng CH IgG1 của người có thể chứa, ngoại trừ đột biến đã nêu, trình tự của SEQ ID NO:22.

Sáng chế cũng có thể được áp dụng cho phân tử kháng thể có chuỗi nặng IgG1 của người, như chuỗi nặng IgG1 của người chứa trình tự axit amin vùng CH IgG1 của người chứa SEQ ID NO: 23 (IgG1m (x)). Do đó, vùng CH IgG1 của người có thể chứa, ngoại trừ cho đột biến được nêu, trình tự của SEQ ID NO:23.

Theo các phương án riêng biệt và cụ thể khác, vùng CH IgG1 của người chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 24 đến SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 45.

Theo một phương án cụ thể, vùng CH IgG1 của người chứa SEQ ID NO: 24 (IgG1m(f)-E430G) hoặc SEQ ID NO: 46, tùy ý là trong đó chuỗi nhẹ chứa CL chứa SEQ ID NO:37.

Theo một phương án cụ thể, biến thể kháng thể là kháng thể đơn đặc hiệu chứa hai HC mà tương đồng về trình tự axit amin và hai LC mà tương đồng về trình tự axit amin.

Sáng chế cũng có thể được áp dụng cho phân tử kháng thể có chuỗi nặng IgG2 của người, như chuỗi nặng IgG2 của người chứa trình tự axit amin vùng CH IgG2 của người chứa SEQ ID NO:34.

Sáng chế cũng có thể được áp dụng cho phân tử kháng thể có chuỗi nặng IgG3 của người, như chuỗi nặng IgG3 của người chứa trình tự axit amin vùng CH IgG3 của người chứa SEQ ID NO:35.

Sáng chế cũng có thể được áp dụng cho phân tử kháng thể có chuỗi nặng IgG4 của người, như chuỗi nặng IgG4 của người chứa trình tự axit amin vùng CH IgG4 của người chứa SEQ ID NO:36.

Tuy nhiên, vùng Fc biến thể chứa một hoặc nhiều đột biến khác, tức là, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin khác với gốc tương ứng với E430, E345 và S440 ở chuỗi nặng IgG1 của người khi được đánh số theo chỉ số EU, cũng được dự tính cho biến thể

kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Ngoài ra hoặc thay thế, vùng Fc có thể là isotyp hỗn hợp, ví dụ, trong đó các vùng khác nhau có nguồn gốc từ các isotyp IgG khác nhau. Theo đó, như được mô tả chi tiết hơn ở dưới, vùng Fc mẹ có thể đã chứa một hoặc nhiều đột biến khác nhau khi so sánh với vùng Fc IgG kiểu đại (có trong tự nhiên) của người, hoặc có thể là isotyp hỗn hợp.

Theo một phương án, vùng Fc mẹ mà đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng E430, E345 và S440 được đưa ra, là vùng Fc IgG của người chứa một hoặc nhiều biến thể khác nhau khi so sánh với vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 kiểu đại của người, ví dụ, như nêu trong một trong số SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36. Được biểu hiện theo cách thay thế, vùng Fc biến thể chứa đột biến trong E430, E345 và/hoặc S440 cũng có thể khác ở một hoặc nhiều đột biến khác từ vùng Fc tham chiếu, như vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 kiểu đại tham chiếu của người, ví dụ, như nêu trong một trong số SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36. Ví dụ, ngoại trừ đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440, vùng Fc biến thể có thể khác với vùng Fc kiểu đại ở 12 hoặc ít hơn, như 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 đột biến như thế, chèn hoặc xóa gốc axit amin. Ví dụ, axit amin đầu tận C Lys (K) ở vị trí 447 (đánh số theo Eu) có thể được xóa. Một số tế bào chủ được sử dụng để sản xuất kháng thể có thể chứa các enzym có khả năng loại bỏ các Lys ở vị trí 447, và việc loại bỏ như vậy có thể không đồng nhất. Do đó, kháng thể trị liệu có thể được sản xuất mà không phải là Lys đầu cuối C (K) để làm tăng tính đồng nhất của sản phẩm. Các phương pháp cho kháng thể sản xuất mà không phải Lys đầu cuối C (K) đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và bao gồm kỹ thuật di truyền của axit nucleic biểu hiện kháng thể, các phương pháp và sử dụng tế bào chủ đặc hiệu. Vì vậy, ví dụ vùng Fc mẹ có thể chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 45.

Tốt hơn là, một hoặc nhiều đột biến khác bất kỳ này không làm giảm khả năng kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này, tức là, kháng thể chứa đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440 trong chuỗi nặng IgG1 của người, để cảm ứng CDC và/hoặc ADCC. Tốt hơn là, một hoặc

nhiều đột biến khác bất kỳ này không làm giảm khả năng kháng thể cảm ứng CDC. Tốt nhất là, một hoặc nhiều đột biến khác bất kỳ này không làm giảm khả năng kháng thể cảm ứng một trong hai CDC và ADCC. Các ứng viên cho một hoặc nhiều đột biến khác có thể, ví dụ, được thử nghiệm trong thử nghiệm CDC hoặc ADCC, ví dụ, như được bộc lộ trong bản mô tả này, như ở ví dụ 3 và 4. Ví dụ, CDC của kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ, IgG1-C-E430G, có thể được kiểm tra ở thử nghiệm của ví dụ 3 hoặc thử nghiệm như được mô tả ở phần tiếp theo (hoặc thử nghiệm tương tự) có và không có ứng viên cụ thể cho một hoặc nhiều đột biến khác, để xác định hiệu quả của (các) đột biến khác ứng viên về khả năng của kháng thể cảm ứng CDC. Tương tự, ADCC của kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ, IgG1-C- E430G, có thể được kiểm tra ở thử nghiệm của ví dụ 4 hoặc thử nghiệm như được mô tả ở phần tiếp theo (hoặc thử nghiệm tương tự) có và không có ứng viên cụ thể cho đột biến khác để xác định hiệu quả của đột biến khác ứng viên về khả năng kháng thể cảm ứng ADCC.

Tốt hơn là, trong biến thể kháng thể chứa hai HC và hai LC, vùng Fc trong HC thứ nhất và thứ hai tương đồng sao cho vùng Fc, ở dạng dime hóa, là dime cùng loại.

Tuy nhiên, theo một số phương án, ở biến thể kháng thể chứa hai HC và hai LC, vùng Fc trong HC thứ nhất có thể khác một hoặc nhiều axit amin với vùng Fc trong HC thứ hai, sao cho vùng Fc, ở dạng dime hóa, là dime khác loại. Ví dụ, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440 ở chuỗi nặng IgG1, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU, chỉ có thể có mặt ở một trong các vùng Fc. Theo đó, theo một số phương án, một vùng Fc có thể là SEQ ID NO: 45 hoặc vùng Fc IgG kiểu đại của người được chọn từ SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 và SEQ ID NO: 36 mặc dù vùng Fc khác có thể giống nhau ngoại trừ đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin này được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440 ở chuỗi nặng IgG1.

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này là, ngoại trừ đột biến đã nêu, kháng thể của người.

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này là, ngoại trừ đột biến đã nêu, kháng thể chiều dài đầy đủ, như kháng thể chiều dài đầy đủ của người.

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này là, ngoại trừ đột biến đã nêu, kháng thể hóa trị hai, như kháng thể hóa trị hai của người, như kháng thể chiều dài đầy đủ hóa trị hai của người.

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này là, ngoại trừ đột biến đã nêu, kháng thể đơn dòng, như kháng thể đơn dòng của người, như kháng thể đơn dòng hóa trị hai của người, như kháng thể đơn dòng chiều dài đầy đủ hóa trị hai của người.

Theo phương án được ưu tiên, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này là, ngoại trừ đột biến đã nêu, kháng thể IgG1, như kháng thể IgG1 chiều dài đầy đủ, như kháng thể IgG1 chiều dài đầy đủ của người, tùy ý là kháng thể IgG1, κ hóa trị hai chiều dài đầy đủ đơn dòng của người, ví dụ kháng thể IgG1m(f), κ hóa trị hai chiều dài đầy đủ đơn dòng của người.

Biến thể kháng thể theo theo sáng chế là thuận lợi ở định dạng đơn đặc hiệu hóa trị hai, chứa hai vùng gắn kết kháng nguyên gắn kết với cùng một epitop. Tuy nhiên, các dạng đặc hiệu kép trong đó một trong các vùng gắn kết kháng nguyên gắn kết với epitop khác cũng được dự tính. Vì vậy, biến thể kháng thể theo phương án hoặc khía cạnh bất kỳ trong bản mô tả này có thể, trừ khi mâu thuẫn với ngữ cảnh, có thể là kháng thể đơn đặc hiệu hoặc kháng thể đặc hiệu kép.

Vì vậy, theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả là, ngoại trừ đột biến được nêu, kháng thể đơn đặc hiệu, như kháng thể đơn đặc hiệu của người, như kháng thể đơn đặc hiệu chiều dài đầy đủ của người, như kháng thể đơn dòng hóa trị hai đơn đặc hiệu chiều dài đầy đủ của người, như kháng thể đơn dòng đơn đặc hiệu hóa trị hai chiều dài đầy đủ của người.

Theo phương án khác, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này là, ngoại trừ đột biến được nêu, kháng thể đặc hiệu kép, như kháng thể đặc hiệu kép chiều dài đầy đủ, tùy ý là kháng thể IgG1, κ đặc hiệu kép và hóa trị hai chiều dài đầy đủ.

Điều biến chức năng

Biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này thông thường có thể cảm ứng một hoặc nhiều, tốt hơn là tất cả, CDC, ADCC, ADCP, chết theo chương trình khi có mặt nhưng không vắng mặt chất liên kết ngang Fc, trogocytosis, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng, của tế bào đích biểu hiện CD38 của người, thông thường khi có mặt bổ thể và tế bào tác động.

Biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này thông thường có thể điều biến hoạt tính enzym của CD38.

Theo phương án khác biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này có thể cảm ứng một hoặc nhiều CDC, ADCC, ADCP, chết theo chương trình khi có mặt nhưng không vắng mặt chất liên kết ngang Fc, trogocytosis, và biến đổi hoạt tính enzym của CD38 hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

Độ gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC):

Theo một phương án, biến thể kháng thể như được bộc lộ trong CDC ứng dụng này mô tả. Đặc biệt, biến thể kháng thể của theo sáng chế có thể làm trung gian cho một CDC tăng khi liên kết với CD38 trên, ví dụ, bề mặt của tế bào CD38-biểu hiện hoặc tế bào-màng, khi so sánh với một đối chứng. Đối chứng có thể được, ví dụ, một kháng thể tham chiếu với trình tự axit amin (thông thường và chuỗi nhẹ axit amin) giống nhau thành biến thể cảm ứng ngoại trừ một hoặc nhiều biến trong E430, E345 và/hoặc S440 trong biến thể kháng thể. Ngoài ra, đối chứng có thể là kháng thể tham chiếu với trình tự axit amin (thông thường là trình tự axit amin chuỗi nặng và nhẹ) giống với biến thể kháng thể ngoại trừ các trình tự VH và VL khác nhau. Kháng thể tham chiếu này có thể, ví dụ, thay vào đó có trình tự VH và VL của kháng thể B hoặc A, như được thể hiện trong bảng 1. Tốt hơn là, trình tự VH và VL của kháng thể tham chiếu có thể là các trình tự của kháng thể B. Ngoài ra, kháng thể tham chiếu có thể là kháng thể gắn kết cùng đích nhưng với các trình tự axit amin khác nhau. Thay thế, đối chứng có thể là kháng thể lớp có thể đối với đối chứng, ví dụ, VH và VL tự động là những cảm biến của kháng thể b12 có thể hiển thị Bảng 1.

Theo đó, theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng cao hơn CDC chống lại tế bào đích

biểu hiện CD38 hơn một kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu có thể chứa các tự động kháng thể VH và VL vùng C, tức là, SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 5, tương ứng, và CH và CL vùng tự động giống nhau để biến thể kháng ngoại trừ một hoặc nhiều biến trong E430, E345 và/hoặc S440.

Theo phương án khác, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng CDC chống tế bào đích biểu hiện CD38 cao hơn kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa lần lượt trình tự vùng VH và VL của kháng thể C, tức là, SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:5, và lần lượt trình tự vùng CH và CL của SEQ ID NO:20 (IgGm(f)) và SEQ ID NO:37 (kappa).

Theo phương án khác, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng CDC chống tế bào đích biểu hiện CD38 cao hơn kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa lần lượt trình tự vùng VH và VL của kháng thể B, tức là, SEQ ID NO:8 và SEQ ID NO:9, và trình tự vùng CH và CL giống với biến thể kháng thể.

Theo phương án khác, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng CDC chống tế bào đích biểu hiện CD38 cao hơn kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa lần lượt trình tự vùng VH và VL của kháng thể A, tức là, SEQ ID NO:10 và SEQ ID NO:11, và trình tự vùng CH và CL giống với biến thể kháng thể.

Theo phương án khác, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng CDC chống tế bào đích biểu hiện CD38 cao hơn kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa lần lượt trình tự vùng VH và VL của kháng thể b12, tức là, SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 16, và trình tự vùng CH và CL giống với biến thể kháng thể.

Theo một phương án cụ thể, đáp ứng CDC được mô tả là phân giải tối đa, trong đó phân giải tối đa cao hơn phản ánh CDC tăng. Theo một phương án cụ thể, đáp ứng CDC được mô tả là EC50 (nồng độ mà một nửa phân giải cực đại quan sát được), trong đó EC50 thấp cho thấy CDC tăng. Theo một phương án cụ thể, tế bào đích biểu hiện CD38 là tế bào khối u, như tế bào u lympho. Các ví dụ không giới hạn của tế bào đích u lympho bao gồm (chỉ thị, trong dấu ngoặc đơn, nguồn thương mại):

- tế bào Daudi (ATCC CCL-213);
- tế bào Ramos (ATCC CRL-1596);
- tế bào REH (DSMZ ACC 22);
- tế bào Wien-133 (BioAnaLab, Oxford, U.K.);
- tế bào RS4;11 (DSMZ ACC 508);
- NALM-16 (DSMZ ACC 680);
- U266 (ATCC TIB-196);
- RC-K8 (DSMZ ACC 561);
- SU-DHL-8;
- Oci-Ly-7;
- Oci-Ly-19;
- Oci-Ly-18;
- Raji;
- DOHH-2;
- SU-DHL-4;
- WSU-DLCL-2;
- Z-138;
- JVM-13;
- Jeko-1;
- 697;
- Granta 519;
- DB;
- Pfeiffer.

Tế bào đích biểu hiện CD38 cũng có thể là tế bào AML, như tế bào được chọn từ gồm nhưng không giới hạn ở: THP1, monomac6, Oci-AML3, KG-1, ML2, U937, Nomo-1, AML-193, MEGAL, MOLM13, HL-60 và Oci-M1.

Theo phương án cụ thể khác, tế bào đích biểu hiện CD38 là tế bào khối u, như tế bào u lympho hoặc tế bào u tủy, trong đó số phân tử CD38 trung bình gần đúng trên mỗi tế bào nằm ở một trong các khoảng sau đây, tùy ý là khi được xác định như được mô tả trong ví dụ 1:

- 150000-250000, như khoảng 200000;
- 200000-300000, như khoảng 260000;
- 80000-180000, như khoảng 130000;
- 50000-150000, như khoảng 100000;
- 40000-120000, như khoảng 80000;
- 30000-70000, như khoảng 50000;
- 10000-20000, như khoảng 15000;
- 5000-15000, như khoảng 10000.

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ như được bộc lộ ở đây cảm ứng CDC tăng cường chống lại tế bào đích biểu hiện CD38 khi so sánh với kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu có thể chứa VH và các tự động vùng VL của kháng thể B, tức là, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9, tương ứng, và CH và CL khu vực tự động giống nhau để cảm ứng có thể biến đổi, trong đó CDC-phản hồi là EC50 và tế bào CD38-biểu hiện được chọn. từ NALM-16 (DSMZ ACC 680), U266 (ATCC TIB-196) và RC-K8 (DSMZ ACC 561).

Theo phương án được ưu tiên, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ như được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng CDC tăng chống tế bào đích biểu hiện CD38 khi so sánh với kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa lần lượt trình tự vùng VH và VL của kháng thể C, tức là, SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 5 và lần lượt trình tự vùng CH và CL của SEQ ID NO: 20 (IgGm (f)) và SEQ ID NO: 37 (kappa), trong đó đáp ứng CDC là phân giải tối đa và tế bào đích biểu hiện CD38 được chọn từ tế bào Daudi (ATCC CCL-213) và tế bào Ramos (ATCC CRL-1596). Biến thể kháng thể cụ thể là có thể dẫn đến phân giải tối đa cao hơn ít nhất là 50%, như ít nhất là 60% hoặc ít nhất là 70% kháng thể tham chiếu.

Bất kỳ phương pháp hoặc thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết đến và thích hợp để đánh giá khả năng của kháng thể, như kháng thể IgG, để cảm ứng CDC chống tế bào đích biểu hiện CD38 có thể được sử dụng. Tốt hơn là thử nghiệm chứa, trong phần có liên quan, các bước của thử nghiệm CDC được mô tả trong ví dụ 3.

Ví dụ không giới hạn của thử nghiệm để xác định phân giải tối đa của tế bào biểu hiện CD38 như được trung gian bởi kháng thể CD38, hoặc giá trị EC50, có thể bao gồm các bước:

- (a) dàn mỏng khoảng 100000 tế bào biểu hiện CD38 trong 40 μ L môi trường nuôi cấy được bổ sung 0,2% BSA cho mỗi lỗ trong đĩa nhiều lỗ;
- (b) ủ sơ bộ tế bào trong 20 phút với 40 μ L kháng thể CD38 được pha loãng định kỳ (0,0002-10 μ g/mL);
- (c) ủ mỗi lỗ trong 45 phút ở 37°C với 20 phần trăm huyết thanh được tụ huyết thông thường của người;
- (d) bổ sung thuốc nhuộm có khả năng tồn tại và đo phần trăm phân giải tế bào trên máy đo đếm tế bào theo dòng chảy;
- (e) xác định phân giải tối đa và/hoặc tính giá trị EC50 sử dụng phi tuyến hồi quy.

Tế bào khối u thích hợp cho thử nghiệm này bao gồm, mà không giới hạn, tế bào được liệt kê trong bảng 2, như tế bào Daudi (ATCC CCL-213).

Theo một số phương pháp nhất định, biến thể kháng thể cảm ứng tế bào Daudi chống CDC (ATCC No. CCL-213) hoặc tế bào Ramos (ATCC No. CRL-1596) dẫn đến phân giải tối đa ít nhất là 50%, như ít nhất là 60%, như ít nhất là 70% cao hơn phân giải thu được với kháng thể tham chiếu chỉ khác ở việc không có đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E435 và S440 ở chuỗi nặng IgG1 của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU. Theo một phương án, kháng thể tham chiếu chứa trình tự vùng VH và VL của kháng thể C, tức là, lần lượt SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 5 và lần lượt trình tự vùng CH và CL của SEQ ID NO:20 (IgGm(f)) và SEQ ID NO:37 (kappa).

Độ gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC):

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này cảm ứng ADCC. Theo một số phương án, biến thể kháng thể của theo sáng chế có thể làm trung gian ADCC khi liên kết với CD38 trên, ví dụ, bề mặt của tế bào CD38-biểu hiện hoặc tế bào. Kháng thể kháng CD38 chứa đột biến E430G được tìm thấy là cảm ứng mức hơi ADCC thấp hơn so với cùng kháng thể mà không có đột

biến E430G. Biến thể kháng thể của theo sáng chế có thể làm trung gian ADCC cao hơn khi liên kết với CD38 trên, ví dụ, bề mặt của tế bào hoặc tế bào CD38-biểu hiện, hơn một đối chứng đối, trong đó anh ta có thể chứng nhận, ví dụ, kháng thể có thể tham chiếu với các tự động axit amin (các trình tự ứng dụng axit amin thường và chuỗi nhẹ) giống nhau thành biến thể kháng thể ngoại trừ cho các chương trình VH và VL khác nhau. Kháng thể tham chiếu này có thể, ví dụ, thay vào đó có trình tự VH và VL của kháng thể B hoặc A, như được thể hiện trong bảng 1. Tốt hơn là, trình tự VH và VL của kháng thể tham chiếu có thể là các trình tự của kháng thể B. Ngoài ra, đối chứng có thể là kháng thể đối chứng isotyp, sao cho trình tự VH và VL là các trình tự của kháng thể b12 như được thể hiện trong bảng 1.

Theo đó, theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong này mô tả này, cảm ứng ADCC chống tế bào đích biểu hiện CD38 cao hơn kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa trình tự vùng VH và VL của kháng thể B, tức là, lần lượt là SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 và trình tự vùng CH và CL tương đồng với biến thể kháng thể. Theo một phương án cụ thể, đáp ứng ADCC là phân giải tối đa, trong đó mức phân giải tối đa cao hơn phản ánh ADCC cao hơn. Theo một phương án cụ thể, đáp ứng ADCC đánh giá ở thử nghiệm xác định gắn kết FcyRIIIa, trong đó gắn kết cao hơn chỉ ra ADCC cao hơn. Theo một phương án cụ thể, tế bào biểu hiện CD38 là tế bào khối u. Ví dụ không giới hạn của tế bào bao gồm Daudi, Wien-133, Granta 519, MEC-2 và khối u dòng tế bào được liệt kê trong bảng 2.

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng ADCC chống tế bào Daudi biểu hiện CD38 cao hơn khi so sánh với kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa lần lượt trình tự vùng VH và VL của kháng thể B, tức là, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 và trình tự vùng CH và CL giống với biến thể kháng thể, tùy ý là trong đó đáp ứng ADCC là phân giải tối đa hoặc gắn kết FcyRIIIa.

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng ADCC chống tế bào Daudi biểu hiện CD38 cao hơn khi so sánh với kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa trình tự vùng VH và VL của kháng thể b12, tức là, lần lượt SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO:

16 và trình tự vùng CH và CL tương đồng với biến thể kháng thể, tùy ý là trong đó đáp ứng ADCC là phân giải tối đa hoặc gắn kết FcγRIIIa.

Phương pháp hoặc thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* bất kỳ được người hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết và thích hợp để đánh giá khả năng của kháng thể, như kháng thể IgG, để cảm ứng ADCC chống tế bào đích biểu hiện CD38 có thể được sử dụng. Tốt hơn là, thử nghiệm bao gồm, ở phần có liên quan, các bước của thử nghiệm gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể giải phóng ^{51}Cr hoặc thử nghiệm sinh học báo cáo ADCC được mô tả ở ví dụ 4. Ví dụ không giới hạn của thử nghiệm để xác định ADCC của tế bào biểu hiện CD38 như được trung gian bởi kháng thể CD38 có thể bao gồm các bước của thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr hoặc thử nghiệm chỉ thị được nêu ở dưới.

ADCC với giải phóng ^{51}Cr :

- (a) dàn mỏng khoảng 5000 ^{51}Cr được dán nhãn tế bào biểu hiện CD38 (ví dụ, tế bào Daudi) trong 50 μL môi trường nuôi cấy được bổ sung BSA 0,2% vào mỗi lỗ trong đĩa nhiều lỗ;
- (b) ủ sơ bộ tế bào trong 15 phút với 50 μL kháng thể CD38 được pha loãng định kỳ (0,0002-10 $\mu\text{g/mL}$);
- (c) ủ mỗi lỗ trong 4 giờ ở 37°C với 500000 tế bào đơn nhân máu ngoại vi mới phân lập (PBMC) với mỗi lỗ;
- (d) đo lượng giải phóng ^{51}Cr trong 75 μL dịch nổi trên bộ đếm gamma;
- (e) tính phần trăm phân giải tế bào dưới dạng (mẫu cpm - phân giải tự phát cpm)/(phân giải tối đa cpm - phân giải tự phát cpm) trong đó cpm được tính với mỗi phút.

ADCC với thử nghiệm chỉ thị:

- (a) dàn mỏng khoảng 5000 tế bào Daudi trong 10 μL ở đĩa nhiều lỗ thích hợp để đọc quang (ví dụ, OptiPlates 384 lỗ từ PerkinElmer Inc.) trong môi trường tiêu chuẩn (ví dụ, RPMI 1640) được bổ sung huyết thanh IgG thấp 25%;
- (b) ủ mỗi lỗ trong 6 giờ ở 37°C với 10 μL Jurkat được chế tạo tế bào biểu hiện ổn định FcγRIIIa thụ thể, V158 (ái lực cao) biến thể, và phân tử NFAT phản ứng điều khiển biểu hiện của đom đóm luciferaza như tác động của tế bào và 10 μL định kỳ được pha loãng Kháng thể CD38 (0,0002-10 $\mu\text{g/mL}$);

(c) ủ mỗi lỗ 5 phút ở RT với 30 μ L chất nền luciferaza và đo độ phát quang.

Thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP):

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này cảm ứng ADCP. Theo một số phương án, biến thể kháng thể của theo sáng chế có thể làm trung gian cho ADCP khi liên kết với CD38 trên, ví dụ, bề mặt của tế bào CD38-biểu hiện hoặc màng tế bào. Biến thể kháng thể của theo sáng chế có thể làm trung gian cho ADCP cao hơn khi liên kết với CD38 trên, ví dụ, bề mặt của tế bào hoặc tế bào CD38-biểu hiện, hơn một đối chứng trong đó đối với đối chứng là một lớp kháng Ví dụ, đối chứng kháng thể, như VH và VL tự động là cảm biến có thể b12 như thể hiện được Bảng 1.

Theo đó, theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong này mô tả, cảm ứng cao hơn ADCP chống lại tế bào đích biểu hiện CD38 hơn một kháng thể tham khảo, trong đó kháng thể tham chiếu có thể chỉ với một biến thể hoặc nhiều biến thể trong E430, E345 và/hoặc S440 trong kháng thể biến. Theo một phương án thay thế, kháng thể tham chiếu có thể chứa các ký tự VH và VL vùng của kháng thể có thể b12, tức là, SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 16, tương ứng và các ký tự vùng CH và CL giống nhau đến biến thể kháng thể.

Theo một phương án cụ thể, tế bào đích biểu hiện CD38 là tế bào khối u, như u tủy hoặc u lympho tế bào. Các ví dụ không giới hạn của tế bào đích là tế bào khối u bao gồm những người được liệt kê trong bảng 2.

Bất kỳ phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo* hoặc thử nghiệm nào đều được người hiểu biết về trung bình trong lĩnh vực và sự thích hợp để đánh giá khả năng của một kháng thể, như kháng thể IgG, để cảm ứng ADCP chống tế bào đích biểu hiện CD38 có thể được sử dụng. Tốt hơn là, thử nghiệm chứa, ở phần có liên quan, các bước của đại thực bào dựa trên ADCP thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 5. Cụ thể là, thử nghiệm để xác định ADCP của tế bào biểu hiện CD38 như qua trung gian bởi kháng thể CD38 có thể bao gồm các bước được thiết lập ở dưới:

ADCP:

- (a) biệt hóa mới phân lập bạch cầu đơn nhân thành đại thực bào với 5 ngày ủ trong GM-CSF-chứa môi trường;
- (b) dần mỏng khoảng 100000 đại thực bào với mỗi lỗ ở đĩa nhiều lỗ trong môi trường tua tế bào với GM-CSF;
- (c) bổ sung 20000 CD38-kháng thể opsonin hóa Tế bào biểu hiện CD38 (ví dụ, Daudi tế bào), được dán nhãn bằng thuốc nhuộm màu huỳnh quang chung, mỗi lỗ trong 45 phút tại 37°C;
- (d) đo tỷ lệ phần trăm đại thực bào dương tính với CD14, âm tính với CD19, dương tính với thuốc nhuộm màng trên máy đo đếm tế bào theo dòng chảy.

Chết theo chương trình:

Biến thể kháng thể để sử dụng theo sáng chế có thể, theo một phương pháp, không cảm ứng chết theo chương trình trong sự xa lánh của một chất lỏng liên kết Fc. Theo phương án khác biến thể cảm ứng có thể cảm ứng chết theo chương trình có mặt của chất lượng Fc-liên kết nhưng không ở ngoài mặt của một Fc-liên kết ngang chất.

Theo một phương án Fc-liên kết ngang chất là một kháng thể.

Theo một phương án chết theo chương trình có thể được xác định như được mô tả trong Ví dụ 6.

Trogocytosis:

Theo một phương án, biến thể kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này phản ứng trogocytosis, như trogocytosis của CD38 từ người hiến Tế bào biểu hiện CD38 đến người nhận tế bào. Tế bào nhận điển hình bao gồm tế bào T và B, bạch cầu đơn nhân/đại thực bào, tế bào đuôi gai, bạch cầu trung tính và tế bào NK. Tốt hơn là, tế bào nhận là lympho bào biểu hiện thụ thể Fc-gamma- ($Fc\gamma$), như, ví dụ, đại thực bào hoặc PBMC. Cụ thể là, biến thể kháng thể theo sáng chế có thể làm trung gian cho trogocytosis tăng khi so sánh với đối chứng. Đối chứng có thể là, ví dụ, kháng thể tham chiếu với trình tự axit amin (thông thường là trình tự axit amin chuỗi nặng và nhẹ) giống với biến thể kháng thể ngoại trừ một hoặc nhiều đột biến ở E430, E345 và/hoặc S440 trong kháng thể biến thể. Theo phương án khác, đối chứng là kháng thể tham chiếu với

trình tự axit amin (thông thường là trình tự axit amin chuỗi nặng và nhẹ) tương đồng với biến thể kháng thể ngoại trừ các trình tự VH và VL khác nhau. Ví dụ, đối chứng có thể là kháng thể đối chứng isotyp, ví dụ, sao cho các trình tự VH và VL là các trình tự của kháng thể b12 như được thể hiện ở bảng 1.

Thử nghiệm thích hợp để đánh giá trogocytosis đã biết trong lĩnh vực và bao gồm, ví dụ, thử nghiệm trong ví dụ 8. Ví dụ không giới hạn của thử nghiệm để xác định trogocytosis của tế bào biểu hiện CD38 như được trung gian bởi kháng thể CD38 bao gồm thử nghiệm sau đây:

Trogocytosis (tế bào Daudi):

- (a') biệt hóa mới phân lập đơn nhân bạch cầu thành đại thực bào với 5 ngày GM-CSF;
- (b') dàn mỏng khoảng 100000 đại thực bào mỗi lỗ ở môi trường tế bào tua với GM-CSF;
- (c') bổ sung khoảng 20000 tế bào Daudi opsonin hóa kháng thể CD38, được dán nhãn bằng chất nhuộm màu huỳnh quang chung chung, mỗi lỗ trong 45 phút tại 37°C;
- (d') đo biểu hiện CD38 trên tế bào Daudi bằng máy đếm tế bào theo dòng chảy, trong đó CD38 giảm trên tế bào Daudi opsonin hóa kháng thể CD38 khi so sánh với đối chứng chỉ thị trogocytosis.

Trogocytosis (Treg):

- (a) dàn mỏng khoảng 500000 PBMC mới phân lập với mỗi lỗ trong môi trường nuôi cấy tế bào O/N ở 37°C;
- (b) bổ sung khoảng 100000, Treg opsonin hóa kháng thể CD38, được dán nhãn bằng thuốc nhuộm amin nội bào phát quang chung, với mỗi lỗ qua đêm (O/N) ở 37°C; và
- (c) đo biểu hiện CD38 trên Treg trên máy đo đếm tế bào theo dòng chảy, trong đó CD38 giảm trên CD38-cảm ứng có thể opsonin hóa Treg khi so sánh với đối chứng đối trogocytosis.

Ngoài tế bào Daudi (ATCC CCL-213), tế bào khối u thích hợp cho bao gồm thử nghiệm thứ nhất, mà không giới hạn, tế bào được liệt kê ở bảng 2, cụ thể là tế bào có

biểu hiện CD38 cao. Ngoài ra, thích hợp tế bào biểu hiện CD38 cho thử nghiệm thứ hai bao gồm, bên ngoài Treg, miễn dịch tế bào như, ví dụ, tế bào NK, tế bào B, tế bào T và bạch cầu đơn nhân, cũng như tế bào khối u được liệt kê ở bảng 2, cụ thể là tế bào có mức biểu hiện CD38 thấp.

Theo đó, theo một phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng mức độ trogocytosis của tế bào đích biểu hiện CD38 cao hơn kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa trình tự vùng VH và VL của kháng thể C, tức là, lần lượt SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:5, và trình tự vùng CH và CL tương đồng với biến thể kháng thể ngoại trừ một hoặc nhiều đột biến ở E430, E345 và/hoặc S440.

Theo một số phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng mức trogocytosis của tế bào đích biểu hiện CD38 cao hơn kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa trình tự vùng VH và VL của kháng thể B, tức là, lần lượt SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9, và trình tự vùng CH và CL tương đồng với biến thể kháng thể.

Theo một số phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng mức trogocytosis của tế bào đích biểu hiện CD38 cao hơn kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa trình tự vùng VH và VL của kháng thể A, tức là, lần lượt SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11 và trình tự vùng CH và CL tương đồng với biến thể kháng thể.

Theo một số phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cảm ứng mức trogocytosis của tế bào đích biểu hiện CD38 cao hơn kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa trình tự vùng VH và VL của kháng thể b12, tức là, lần lượt SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 16 và trình tự vùng CH và CL tương đồng với biến thể kháng thể.

Điều biến hoạt tính enzym CD38

Biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này có thể thông thường một biến hoặc nhiều hoạt tính của CD38 của người. Theo một phương án, biến thể kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này có tác dụng ức chế hoạt tính CD38 xyclaza, ví dụ khi so sánh với đối chứng, ví dụ, kháng thể đối chứng isotyp như

kháng thể b12. Ví dụ, biến thể kháng thể có thể có hiệu quả ức chế hoạt tính xyclaza của CD38 được biểu hiện bởi tế bào, như tế bào khối u và/hoặc hiệu quả ức chế CD38 phân lập, như mảnh có thể hòa tan của CD38 (ví dụ, SEQ ID NO:39).

Bất kỳ phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo* hoặc thử nghiệm nào do người có hiểu biết về trung bình trong lĩnh vực và sự thích hợp để đánh giá khả năng của CD38 có thể kháng thể để ức chế CD38 xyclaza hoạt động đều có thể được sử dụng. Thử nghiệm thích hợp để kiểm tra hoạt tính CD38 xyclaza, ví dụ, được mô tả trong WO 2006/099875 A1 và WO 2011/154453 A1. Tốt hơn là phương pháp bao gồm, ở phần có liên quan, các bước của thử nghiệm cụ thể được mô tả ở ví dụ 6, thử nghiệm hoạt tính xyclaza sử dụng muối nicotinamid guanin dinucleotit natri (NGD) làm cơ chất cho CD38. NGD, không phát quang, được CD38 tuần hoàn thành chất tương tự huỳnh quang của cADPR, GDP-riboza vòng (xem, ví dụ, Comb, Chem High Throughput Screen. 2003 Jun;6(4):367-79A). Một ví dụ không giới hạn của một thử nghiệm chứa các bước sau để xác định sự ức chế của CD38 xyclaza hoạt tính:

(a) gây mầm 200000 Daudi hoặc Wien133 tế bào trong 100 μ L 20 mM Tris-HCL mỗi lỗ; hoặc cho mầm 0,6 μ g/mL CD38 đánh dấu hòa tan (SEQ ID NO: 39) trong 100 μ L 20 mM Tris-HCL cho mỗi lỗ trong đĩa nhiều lỗ;

(b) bổ sung 1 μ g/mL kháng thể CD38 và 80 μ M NGD cho mỗi lỗ;

(c) đo huỳnh quang cho đến khi đạt tới mặt bằng (ví dụ.; 5, 10 hoặc 30 phút);

và

(d) xác định tỷ lệ phần trăm ức chế khi so sánh với đối chứng, như lỗ được ủ với kháng thể đối chứng isotyp.

Theo một phương án, ở thử nghiệm này, biến thể kháng thể có khả năng ức chế hoạt tính xyclaza của CD38, cụ thể là phần trăm tối đa chuyển hóa NGD, với ít nhất là khoảng 40%, như ít nhất là khoảng 50%, như ít nhất là khoảng 60%, như nằm trong khoảng từ 40% đến 60%, khi so với hoạt tính CD38 xyclaza đối chứng, điển hình khi có mặt kháng thể đối chứng isotyp. Ví dụ, kháng thể đối chứng isotyp có thể chứa trình tự vùng VH và VL của kháng thể b12, tức là, SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 16, tương ứng, và trình tự vùng CH và CL giống với biến thể kháng thể. Theo một phương án cụ thể, thử nghiệm sử dụng hisCD38 (SEQ ID NO: 39) để xác định hoạt tính xyclaza.

Theo một số phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này có ức chế hoạt tính xyclaza CD38 tăng (tức là, hiệu quả hơn) khi so sánh với kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa trình tự vùng VH và VL của kháng thể B, tức là, lần lượt là SEQ ID NO:8 và SEQ ID NO:9 và trình tự vùng CH và CL tương đồng với biến thể kháng thể.

Theo một số phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này có ức chế hoạt tính xyclaza CD38 tăng (tức là, hiệu quả hơn) khi so sánh với kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu chứa trình tự vùng VH và VL của kháng thể A, tức là, lần lượt là SEQ ID NO:10 và SEQ ID NO:11 và trình tự vùng CH và CL tương đồng với biến thể kháng thể.

Ngoài ra, theo một số phương án, biến thể kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này cảm ứng sự chết theo chương trình của tế bào biểu hiện CD38 khi có mặt, mà không vắng mặt, kháng thể liên kết ngang Fc. Các chức năng này đều có thể được đo ở thử nghiệm bao gồm, trong phần có liên quan, các bước của thử nghiệm chết theo chương trình được mô tả ở ví dụ 6. Theo một phương án, thử nghiệm chết theo chương trình có thể bao gồm các bước:

- (a) dàn mỏng 100000 tế bào khối u biểu hiện CD38 trong 100 μ L môi trường nuôi cấy được bổ sung BSA 0,2% mỗi lỗ;
- (b) ủ mỗi lỗ O/N ở 37°C với kháng thể CD38 được pha loãng định kỳ (0,0002-10 μ g/mL) và 10 μ g/mL IgG1 kháng người của dê;
- (c) đo tỷ lệ phần trăm của tế bào chết trên máy đếm tế bào dòng chảy.

Thế liên hợp

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể được liên hợp với thuốc, chất gây độc tế bào, chất độc, nhãn phóng xạ hoặc đồng vị phóng xạ.

Theo một phương án, biến thể kháng thể chứa một hoặc nhiều axit amin được dán nhãn phóng xạ được cung cấp. Biến thể được gắn nhãn phóng xạ có thể được sử dụng cho các mục tiêu chẩn đoán *in vitro*, các mục tiêu chẩn đoán *in vivo*, các mục tiêu trị liệu hoặc kết hợp của chúng. Các ví dụ không giới hạn của nhãn phóng xạ cho cảm biến có thể bao gồm ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{131}I và ^{186}Re . Phương pháp điều chế axit amin được dán nhãn phóng xạ và dẫn xuất peptit có liên quan đã được biết đến trong

lĩnh vực kỹ thuật này, (xem, ví dụ Junghans *et al.*, in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2nd Ed., Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) và U.S. 4,681,581, U.S. 4,735,210, U.S. 5,101,827, U.S. 5,102,990 (US RE35,500), US 5,648,471 và US 5,697,902. Ví dụ, đồng vị phóng xạ của halogen như iot hoặc brom có thể được liên hợp bởi phương pháp cloramin-T.

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo sáng chế được liên hợp với đồng vị phóng xạ hoặc chelat chứa đồng vị phóng xạ. Ví dụ, biến thể có thể được liên hợp với chất liên kết chelat, ví dụ DOTA, DTPA hoặc tiuxetan, cho phép kháng thể được tạo phức với đồng vị phóng xạ. Kháng thể cũng có thể hoặc ngoài ra chứa hoặc được liên hợp với một hoặc nhiều axit amin được dán nhãn phóng xạ hoặc phân tử được dán nhãn phóng xạ khác. Biến thể được gắn nhãn phóng xạ có thể được sử dụng cho cả mục tiêu chẩn đoán và điều trị. Theo một phương án biến thể theo sáng chế được liên hợp với nguồn phát xạ alpha. Các ví dụ không giới hạn của đồng vị phóng xạ phát alpha bao gồm ^{213}Bs , ^{225}Ac và ^{227}Th .

Theo một phương án, biến thể kháng thể được gắn vào chất liên kết chelat, ví dụ tiuxetan, cho phép biến thể kháng thể được liên hợp với đồng vị phóng xạ.

Axit nucleic

Kháng thể đã được biết đến là chất trị liệu mà có thể được sử dụng trong việc điều trị các bệnh khác nhau. Phương pháp sử dụng kháng thể cho đối tượng cần điều trị khác bao gồm việc sử dụng axit nucleic hoặc hỗn hợp của axit nucleic mã hóa kháng thể này để biểu hiện *in vivo* kháng thể này.

Do vậy theo một khía cạnh, sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của biến thể kháng thể theo sáng chế, trong đó chuỗi nặng này chứa vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng CH IgG1 của người với đột biến ở một hoặc nhiều trong số E430, E345 và S440, gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU.

Theo một khía cạnh sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic hoặc hỗn hợp của axit nucleic, mã hóa biến thể kháng thể theo sáng chế.

Theo một số phương án sáng chế đề cập đến axit nucleic hoặc hỗn hợp của axit nucleic mã hóa biến thể kháng thể chứa:

a) vùng gắn kết kháng nguyên chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4, VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7, và

b) vùng Fc biến thể chứa đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345 và S440 ở chuỗi nặng IgG1 của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU.

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo sáng chế được mã hóa bởi một axit nucleic. Vì vậy, trình tự nucleotit mã hóa biến thể kháng thể theo sáng chế có mặt ở một axit nucleic hoặc cùng phân tử axit nucleic.

Theo phương án khác biến thể kháng thể theo sáng chế được mã hóa bằng hỗn hợp của axit nucleic, thông thường bằng hai axit nucleic. Theo một phương án hỗn hợp axit nucleic này chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của biến thể kháng thể này và axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của biến thể kháng thể này.

Theo một số phương án sáng chế đề cập đến axit nucleic hoặc hỗn hợp axit nucleic mã hóa biến thể kháng thể chứa:

a) chuỗi nặng chứa vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng CH IgG1 của người với đột biến ở một hoặc nhiều trong số E430, E345 và S440, gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU;

b) chuỗi nhẹ chứa vùng VL chứa VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một phương án, biến thể kháng thể theo sáng chế được mã hóa bằng một axit nucleic. Vì vậy, trình tự nucleotit mã hóa biến thể kháng thể theo sáng chế có mặt ở một axit nucleic hoặc cùng phân tử axit nucleic.

Theo phương án khác biến thể kháng thể theo sáng chế được mã hóa bằng hỗn hợp của các axit nucleic, thông thường bằng hai axit nucleic. Theo một phương án hỗn

hợp của các axit nucleic này chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của biến thể kháng thể này và axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của biến thể kháng thể này.

Như được mô tả ở trên axit nucleic có thể được sử dụng như phương tiện để cung cấp protein điều trị, như kháng thể, cho đối tượng cần điều trị.

Theo một số phương án, axit nucleic này có thể là axit deoxyribonucleic (ADN). ADN và phương pháp điều chế ADN thích hợp để biểu hiện *in vivo* của protein điều trị, như kháng thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ, và bao gồm nhưng không giới hạn ở những gì được mô tả bởi Patel A et al., 2018, Cell Reports 25, 1982-1993.

Theo một số phương án, axit nucleic này có thể là axit ribonucleic (ARN), như ARN thông tin (mARN). Theo một số phương án, mARN có thể chỉ bao gồm nucleotit có trong tự nhiên. Theo một số phương án, mARN có thể bao gồm nucleotit được biến đổi, trong đó được biến đổi chỉ nucleotit này khác về mặt hóa học với nucleotit có trong tự nhiên. Theo một số phương án, mARN có thể bao gồm cả nucleotit có trong tự nhiên và được biến đổi.

Các axit nucleic khác nhau thích hợp để biểu hiện *in vivo* của protein trị liệu, như kháng thể, ở đối tượng được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ. Ví dụ, mARN thích hợp để biểu hiện kháng thể trị liệu ở đối tượng, thường bao gồm khung đọc mở (ORF), được bao quanh bởi các vùng chưa được dịch mã (UTR) bao gồm các trình tự cụ thể, và đầu 5' và 3' được tạo thành bởi cấu trúc bít đầu và đuôi poly(A) (xem ví dụ, Schlake et al., 2019, Molecular Therapy Vol. 27 No 4 April).

Ví dụ của phương pháp tối ưu hóa ARN và phân tử ARN thích hợp, ví dụ mARN, để biểu hiện *in vivo* bao gồm, nhưng không giới hạn ở được mô tả trong US9,254,311; US9,221,891; US20160185840 và EP3118224.

(Các) axit nucleic trên được sử dụng cho đối tượng để biểu hiện *in vivo* là dễ bị phân hủy và/hoặc gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Ngoài ra, để biểu hiện *in vivo* của kháng thể được mã hóa bởi axit nucleic, axit nucleic này thường được sử dụng ở dạng thích hợp để axit nucleic xâm nhập vào tế bào của đối tượng. Các phương pháp vận chuyển axit nucleic để biểu hiện *in vivo* khác nhau tồn tại và bao gồm cả hai phương pháp liên quan đến phương tiện cơ học và hóa học. Ví dụ, phương pháp này có thể liên

quan đến việc đốt điện hoặc xăm axit nucleic lên da (Patel et al., 2018, Cell Reports 25, 1982–1993). Các phương pháp khác thích hợp để sử dụng axit nucleic cho đối tượng liên quan đến việc sử dụng axit nucleic ở chế phẩm thích hợp. Vì vậy sáng chế cũng đề cập đến vật truyền phân phối chứa axit nucleic theo sáng chế.

Theo một số phương án, vật truyền phân phối này có thể chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của biến thể kháng thể theo sáng chế. Vì vậy theo một phương án axit nucleic này có thể mã hóa chuỗi nặng chứa vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng CH IgG1 của người với đột biến ở một hoặc nhiều trong số E430, E345 và S440, gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU.

Theo một số phương án, sáng chế cũng đề cập đến vật truyền phân phối chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của biến thể kháng thể theo sáng chế. Vì vậy theo một phương án axit nucleic này có thể mã hóa chuỗi nhẹ chứa vùng VL chứa VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7.

Sáng chế cũng đề cập đến hỗn hợp của các vật truyền phân phối chứa vật truyền phân phối chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nặng của biến thể kháng thể theo sáng chế và vật truyền phân phối chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của biến thể kháng thể theo sáng chế. Vì vậy theo một phương án hỗn hợp của các vật truyền phân phối này chứa vật truyền phân phối chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nặng chứa vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng CH IgG1 của người với đột biến ở một hoặc nhiều trong số E430, E345 và S440, gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU; và vật truyền phân phối chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ chứa vùng VL chứa VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một số phương án, vật truyền phân phối này chứa axit nucleic hoặc hỗn hợp của axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ nucleic và nặng của biến thể kháng thể theo sáng chế.

Vì vậy theo một phương án vật truyền phân phối này có thể chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nặng chứa vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2,

VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng CH IgG1 của người với đột biến ở một hoặc nhiều trong số E430, E345 và S440, gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU; và chuỗi nhẹ chứa vùng VL chứa VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7. Vì vậy, trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và nhẹ của biến thể kháng thể theo sáng chế có mặt ở một (cùng) phân tử axit nucleic.

Theo phương án khác vật truyền phân phối này có thể chứa axit nucleic mã hóa chuỗi nặng chứa vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng CH IgG1 của người với đột biến ở một hoặc nhiều trong số E430, E345 và S440, gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU; và axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ chứa vùng VL chứa VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7. Vì vậy, trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và nhẹ của biến thể kháng thể theo sáng chế có mặt ở các phân tử axit nucleic riêng hoặc khác nhau.

Theo một số phương án vật truyền phân phối này có thể là chế phẩm lipid. Lipit của chế phẩm có thể là (các) hạt, như (các) hạt nano lipid (LNP). Axit nucleic hoặc sự kết hợp của axit nucleic theo sáng chế có thể được bao trong hạt này, ví dụ trong LNP này.

Các chế phẩm lipid khác nhau thích hợp để sử dụng axit nucleic cho đối tượng để biểu hiện *in vivo* đã được biết đến với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, chế phẩm lipid này thường có thể bao gồm lipid, aminolipit có thể ion hóa, PEG-lipit, cholesterol hoặc bất kỳ sự kết hợp nào của chúng.

Các dạng và phương pháp khác nhau để điều chế chế phẩm lipid thích hợp để sử dụng axit nucleic cho đối tượng để biểu hiện của kháng thể trị liệu đã được biết đến nhiều trong lĩnh vực này. Ví dụ về chế phẩm lipid này bao gồm nhưng không giới hạn ở các chế phẩm được mô tả trong US20180170866 (Arcturus), EP 2391343 (Arbutus), WO 2018/006052 (Protiva), WO2014152774 (Shire Human Genetics), EP 2 972 360 (Translate Bio), US10195156 (Moderna) và US20190022247 (Acuitas).

Sản xuất kháng thể biến thể

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tăng ít nhất là một chức năng tác động của kháng thể chứa trình tự axit amin CDR, VH và/hoặc VL của kháng thể C, bao gồm đưa đột biến vào kháng thể ở một hoặc nhiều gốc axit amin tương ứng với E430, E345, và S440 ở vùng Fc của chuỗi nặng IgG1 của người, được đánh số theo chỉ số EU.

Vì vậy, theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp tăng chức năng tác động của kháng thể mẹ chứa vùng Fc và vùng gắn kết kháng nguyên gắn kết với CD38, phương pháp bao gồm đưa vào vùng Fc đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345, và S440 ở vùng Fc của chuỗi nặng IgG1 của người, trong đó gốc axit amin được đánh số theo chỉ số EU; và

trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4, VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một số phương án nhất định khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất biến thể của kháng thể mẹ chứa vùng Fc và vùng gắn kết kháng nguyên, tùy ý là biến thể có chức năng tác động tăng khi so sánh với kháng thể mẹ, phương pháp bao gồm

(a) đưa vào vùng Fc đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430, E345, và S440 ở vùng Fc của chuỗi nặng IgG1 của người để thu được kháng thể biến thể,

(b) lựa chọn kháng thể biến thể bất kỳ có chức năng tác động tăng khi so sánh với kháng thể mẹ, và

(c) sản xuất kháng thể biến thể này ở tế bào chủ tái tổ hợp,

trong đó vùng gắn kết kháng nguyên chứa VH CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:2, VH CDR2 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:3, VH CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4, VL CDR1 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:6, VL CDR2 có trình tự AAS, và VL CDR3 có trình tự như nêu trong SEQ ID NO:7.

Theo một phương án theo bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, chức năng tác động là CDC.

Theo một phương án theo bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, chức năng tác động là trogocytosis.

Theo một phương án theo bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, chức năng tác động là CDC và trogocytosis.

Theo một phương án theo bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ nhóm tương ứng với E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y và S440W. Ví dụ, đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin có thể chứa hoặc gồm E430G.

Theo một phương án theo bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, vùng Fc của kháng thể mẹ is, ngoại trừ (các) đột biến được chỉ ra, vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người, hoặc hỗn hợp isotyp của chúng. Tùy ý là chứa vùng Fc của một trong số các trình tự được nêu như SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:45 và SEQ ID NO:36. Theo phương án cụ thể, vùng Fc của kháng thể mẹ là vùng Fc IgG1 của người. Ví dụ, kháng thể mẹ có thể là kháng thể IgG1 chiều dài đầy đủ của người, tùy ý là kháng thể IgG1,κ hóa trị hai chiều dài đầy đủ đơn dòng của người. Ngoài ra, kháng thể mẹ có thể là kháng thể đơn đặc hiệu hoặc lưỡng đặc hiệu, như kháng thể đơn đặc hiệu.

Trong khi vùng Fc của kháng thể mẹ thông thường là trình tự có trong tự nhiên (kiểu đại), theo một số phương án, vùng Fc của kháng thể mẹ chứa một hoặc nhiều đột biến khác, như được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể thu được hoặc có thể thu được theo bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả ở trên.

Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic và vectơ phân lập mã hóa biến thể kháng thể theo bất kỳ trong số các khía cạnh và phương án được mô tả trong bản mô tả này, cũng như vectơ và hệ thống biểu hiện mã hóa biến thể. Cấu trúc axit nucleic, vectơ và hệ thống biểu hiện thích hợp cho kháng thể và biến thể của chúng đã biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, được mô tả trong ví dụ. Theo

phương án trong đó kháng thể biến thể chứa HC và LC là polypeptit riêng hơn là được chứa trong một polypeptit (ví dụ, như ở protein dung hợp scFv-Fc), trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng và nhẹ có thể có mặt ở các axit nucleic hoặc vector giống hoặc khác nhau.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic hoặc vector biểu hiện chứa

- (i) trình tự nucleotit mã hóa trình tự chuỗi nặng của biến thể kháng thể theo bất kỳ trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này;
- (ii) trình tự nucleotit mã hóa trình tự chuỗi nhẹ của biến thể kháng thể theo bất kỳ trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này; hoặc
- (iii) cả (i) và (ii).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic hoặc vector biểu hiện chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự chuỗi nặng của biến thể kháng thể theo bất kỳ trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic hoặc vector biểu hiện chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự chuỗi nặng và trình tự chuỗi nhẹ của biến thể kháng thể theo bất kỳ trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hỗn hợp của axit nucleic thứ nhất và thứ hai hoặc hỗn hợp của vector biểu hiện thứ nhất và thứ hai, tùy ý ở cùng tế bào chủ, trong đó thứ nhất chứa trình tự nucleotit theo (i), và thứ hai chứa trình tự nucleotit theo (ii).

Vector biểu hiện trong ngữ cảnh của sáng chế có thể là vector thích hợp bất kỳ, bao gồm vector nhiễm sắc thể, không nhiễm sắc thể và axit nucleic tổng hợp (trình tự axit nucleic bao gồm tập hợp các yếu tố kiểm soát biểu hiện thích hợp). Ví dụ về vector này bao gồm dẫn xuất của SV40, plasmit vi khuẩn, ADN thực khuẩn thể, baculovirut, plasmit nấm men, vector có nguồn gốc từ sự kết hợp của plasmit và ADN thực khuẩn thể và vector axit nucleic (ARN hoặc ADN) của virut. Theo một phương án, axit nucleic được bao gồm trong vector ADN hoặc ARN trần, bao gồm, ví dụ, phần tử biểu hiện tuyến tính (như được mô tả trong ví dụ như Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-359 (1997)), vector axit nucleic nén (như được mô tả trong ví dụ US 6,077,835 và/hoặc WO 00/70087), vector plasmit như pBR322, pUC 19/18 hoặc pUC 118/119, vector axit

nucleic có kích thước tối thiểu “ruồi vằn” (như được mô tả trong ví dụ Schakowski et al, Mol Ther 3, 793 800 (2001)), hoặc cấu trúc vector axit nucleic kết tựa, như cấu trúc kết tựa CaP04 (như được mô tả trong ví dụ WO200046147, Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551 55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978), và Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)). Các vector axit nucleic này và việc sử dụng chúng đã được biết đến nhiều trong lĩnh vực này (xem ví dụ US 5,589,466 và US 5,973,972).

Theo một phương án, vector thích hợp để biểu hiện biến thể kháng thể ở tế bào vi khuẩn. Ví dụ của vector này bao gồm vector biểu hiện như BlueScript (Stratagene), vector pIN (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503 5509 (1989), vector pET (Novagen, Madison WI) và tương tự).

Vector biểu hiện cũng có thể hoặc theo một cách khác là vector thích hợp để biểu hiện trong hệ thống nấm men. Vector thích hợp để biểu hiện trong hệ thống nấm men có thể được sử dụng. Vector vector thích hợp bao gồm, ví dụ, vector bao gồm đoạn khởi động cấu thành hoặc quy nạp như yếu tố alpha, rượu oxidaza và PGH (được xem xét trong: F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), và Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516 544 (1987)).

Vector biểu hiện cũng có thể hoặc theo một cách khác là vector thích hợp để biểu hiện ở tế bào động vật có vú, ví dụ vector chứa glutamin synthetaza làm chất đánh dấu có thể chọn lọc, như vector được mô tả ở Bebbington (1992) Biotechnology (NY) 10:169-175.

Axit nucleic và/hoặc vector cũng có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa trình tự tiết/khu trú, có thể nhắm mục tiêu polypeptit, như chuỗi polypeptit mới ra đời, đến vùng ngoại chất hoặc vào môi trường nuôi cấy tế bào. Các trình tự này đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm chất dẫn đầu tiết hoặc các peptit tín hiệu.

Vector biểu hiện có thể chứa hoặc có liên quan đến đoạn khởi động, đoạn tăng cường và các yếu tố hỗ trợ biểu hiện khác thích hợp bất kỳ. Ví dụ về yếu tố này bao gồm đoạn khởi động biểu hiện mạnh (ví dụ, đoạn khởi động/đoạn tăng cường CMV IE của người cũng như đoạn khởi động RSV, SV40, SL3 3, MMTV và HIV LTR), trình tự kết

thúc poly (A) hiệu quả, gốc sao chép cho sản phẩm plasmit ở *E. coli*, gen kháng lại kháng sinh như gen đánh dấu lựa chọn được và/hoặc vị trí nhân dòng thuận tiện (ví dụ, vùng đa liên kết). Axit nucleic cũng có thể bao gồm đoạn khởi động cảm ứng ngược với đoạn khởi động cấu thành như CMV IE.

Theo một phương án, vector biểu hiện mã hóa biến thể kháng thể có thể được tạo vị trí ở và/hoặc được vận chuyển đến tế bào chủ hoặc động vật chủ qua vector virus.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ tái tổ hợp mà sản xuất biến thể kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này, tùy ý là trong đó tế bào chủ chứa (các) axit nucleic hoặc (các) vector phân lập theo sáng chế. Thông thường, tế bào chủ đã được biến đổi hoặc chuyển nhiễm với (các) axit nucleic hoặc (các) vector. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm có thể là, ví dụ, tế bào nhân chuẩn, tế bào nhân sơ hoặc tế bào vi sinh vật, ví dụ, một tế bào chuyển nhiễm. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là tế bào nhân thực. Theo một phương án cụ thể, tế bào chủ là tế bào nhân sơ. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể chuỗi nặng. Tuy nhiên, theo hầu hết các phương án, biến thể kháng thể sẽ chứa cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, do đó tế bào chủ này biểu hiện cả cấu trúc mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trên vector giống hoặc khác nhau.

Ví dụ của tế bào chủ bao gồm tế bào nấm men, vi khuẩn, thực vật và động vật có vú, như CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6, tế bào NS0, tế bào Sp2/0 hoặc tế bào lympho. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào CHO (Buồng trứng Hamster Trung Quốc). Ví dụ, theo một phương án, tế bào chủ có thể chứa cấu trúc axit nucleic thứ nhất và thứ hai được tích hợp ổn định vào hệ gen tế bào, trong đó tế bào thứ nhất mã hóa chuỗi nặng và tế bào thứ hai mã hóa chuỗi nhẹ của biến thể kháng thể theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chứa axit nucleic không tích hợp, như plasmit, cosmit, phagemit hoặc phần tử biểu hiện tuyến tính, bao gồm cấu trúc axit nucleic thứ nhất và thứ hai như được mô tả ở trên.

Theo một phương án, tế bào chủ này là tế bào mà có khả năng glycosyl hóa liên kết Asn của protein, ví dụ tế bào nhân thực, như tế bào động vật có vú, ví dụ, tế bào của người. Theo phương án khác, tế bào chủ này là tế bào không phải của người được thiết kế gen để sản xuất glycoprotein có quá trình glycosyl hóa của người hoặc giống người. Ví dụ về tế bào này là *Pichia pastoris* biến đổi gen (Hamilton et al., Science 301 (2003)

1244-1246; Potgieter et al., J. Biotechnology 139 (2009) 318-325) và *Lemna minor* biến đổi gen (Cox et al., Nature Biotechnology 12 (2006) 1591-1597).

Theo một phương án, tế bào chủ này là tế bào chủ mà không có khả năng loại bỏ hiệu quả gốc lysin K447 ở đầu tận C khỏi chuỗi nặng kháng thể. Ví dụ, bảng 2 ở Liu et al. (2008) J Pharm Sci 97: 2426 (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) liệt kê một số hệ thống sản xuất kháng thể này, ví dụ Sp2/0, NS/0 hoặc tuyến vú chuyển gen (dê), trong đó chỉ thu được loại bỏ một phần lysin ở đầu tận C. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào chủ có bộ máy glycosyl hóa bị thay thế. Các tế bào này được mô tả trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng làm tế bào chủ để biểu hiện biến thể theo sáng chế để do đó sản xuất kháng thể có quá trình glycosyl hóa bị thay thế. Ví dụ, xem Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, cũng như EP1176195; WO03/035835; và WO99/54342. Các phương pháp bổ sung để tạo glycoform được xử lý di truyền đã được biết đến trong lĩnh vực này, và bao gồm nhưng không giới hạn ở phương pháp được mô tả trong Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473), US6602684, WO00/61739A1; WO01/292246A1; WO02/311140A1; WO 02/30954A1; Công nghệ Potelligent™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); Công nghệ thiết kế glycosyl hóa GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland); US 20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49, cũng như phương pháp được mô tả trong WO2018/114877 WO2018/114878 và WO2018/114879.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến động vật hoặc thực vật không phải người chuyển gen bao gồm axit nucleic mã hóa một hoặc hai bộ chuỗi nặng của người và chuỗi nhẹ của người, trong đó động vật hoặc thực vật sản xuất biến thể kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất biến thể kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này, bao gồm nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp ở môi trường nuôi cấy và trong điều kiện thích hợp để sản xuất biến thể kháng thể và, tùy ý là, tinh chế hoặc cô lập biến thể kháng thể từ môi trường nuôi cấy.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể thu được hoặc có thể thu được bằng phương pháp được mô tả ở trên.

Hợp phần và bộ kit

Sáng chế cũng đề cập đến hợp phần chứa biến thể kháng thể theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vector biểu hiện theo sáng chế hoặc tế bào chủ theo sáng chế.

Theo phương án khác hợp phần theo sáng chế là dược phẩm, thông thường chứa chất mang dược dụng. Theo một phương án dược phẩm chứa biến thể kháng thể như được xác định theo bất kỳ khía cạnh hoặc phương án được bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc vector biểu hiện như được xác định theo bất kỳ khía cạnh hoặc phương án được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa:

- biến thể kháng thể như được xác định theo bất kỳ khía cạnh và phương án được bộc lộ trong bản mô tả này, và
- chất mang dược dụng.

Dược phẩm có thể được bào chế theo các kỹ thuật thông thường như được bộc lộ trong Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Dược phẩm theo sáng chế có thể ví dụ bao gồm chất pha loãng, chất độn, muối, chất đệm, chất tẩy rửa (ví dụ, chất tẩy rửa không chứa ion, như Tween-20 hoặc Tween-80), chất ổn định (ví dụ, đường hoặc axit amin không chứa protein), chất bảo quản, chất cố định mô, chất hòa tan và/hoặc các vật liệu khác thích hợp để đưa vào dược phẩm.

Chất mang dược dụng bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi thích hợp, môi trường phân tán, chất phủ, chất kháng khuẩn và chống nấm, chất đẳng trương, chất chống oxy hóa và chất làm chậm hấp thu, và những chất tương tự tương thích về mặt sinh lý với một biến thể của kháng thể theo sáng chế. Ví dụ về các chất mang dung dịch nước và không nước thích hợp có thể được sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm nước, dung dịch muối, dung dịch muối đệm photphat, etanol, dextroza, polyol (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, và các loại tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng, dầu thực vật, dung dịch keo cacboxymetyl xenluloza, gồm tragacanth và các

este hữu cơ dạng tiêm, như etyl oleat, và/hoặc các chất đệm khác nhau. Chất mang được dụng bao gồm dung dịch nước vô trùng hoặc dịch phân tán và bột vô trùng để điều chế rộng rãi dung dịch tiêm hoặc dịch phân tán vô trùng. Có thể duy trì tính lưu động thích hợp, ví dụ, bằng cách sử dụng nguyên liệu phủ, như lexithin, bằng cách duy trì kích cỡ hạt cần thiết trong trường hợp dịch phân tán, và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt.

Dược phẩm cũng có thể chứa chất chống oxy hóa được dụng ví dụ (1) chất chống oxy hóa hòa tan trong nước, như axit ascorbic, xystein hydroclorua, natri bisulfat, natri metabisulfít, natri sulfít và tương tự; (2) chất chống oxy hóa tan trong dầu, như ascorbyl palmitat, hydroxyanisol butyl hóa, hydroxytoluen butyl hóa, lexithin, propyl gallat, alpha-tocopherol, và tương tự; và (3) chất chelat kim loại, như axit xitric, axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA), sorbitol, axit tartaric, axit photphoric, và tương tự.

Dược phẩm cũng có thể chứa chất đẳng trương, như đường, rượu đa chức, như mannitol, sorbitol, glyxerol hoặc natri clorua trong hợp phần.

Dược phẩm cũng có thể chứa một hoặc nhiều các chất bổ trợ thích hợp cho đường dùng đã chọn như chất bảo quản, chất làm ướt, chất nhũ hóa, chất phân tán, chất bảo quản hoặc chất đệm, có thể nâng cao thời hạn sử dụng hoặc hiệu quả của dược phẩm. Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế với chất mang sẽ bảo vệ kháng thể chống giải phóng nhanh, như chế phẩm giải phóng có kiểm soát, bao gồm mô cấy, miếng dán thẩm thấu qua da và hệ thống phân phối vi bao. Các chất mang này có thể bao gồm gelatin, glyxeryl monostearat, glyxeryl distearat, polyme có thể phân hủy sinh học, tương thích sinh học như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic một mình hoặc với sáp, hoặc các vật liệu khác đã biết đến trong lĩnh vực này. Các phương pháp điều chế chế phẩm này thường được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến.

Các dung dịch tiêm vô trùng có thể được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất có hoạt tính với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với một hoặc hỗn hợp của các thành phần, ví dụ, như liệt kê ở trên, theo yêu cầu, tiếp theo là vi lọc khử trùng. Thông thường, thể phân tán được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất có hoạt tính với vật truyền vô trùng mà chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần khác được yêu

cầu, ví dụ, từ các thành phần được liệt kê ở trên. Trong trường hợp bột vô trùng để điều chế dung dịch tiêm vô trùng, ví dụ về phương pháp điều chế là làm khô chân không và làm khô đông (đông khô) để tạo ra bột của thành phần hoạt tính cộng với bất kỳ thành phần mong muốn bổ sung nào từ dung dịch đã được lọc vô trùng trước đó của chúng.

Các mức liều lượng thực tế của hoạt chất trong dược phẩm có thể được thay đổi để thu được lượng hoạt chất có hiệu quả đạt được đáp ứng điều trị mong muốn cho bệnh nhân, hợp phần và phương thức sử dụng cụ thể, mà không gây độc cho bệnh nhân. Mức liều lượng đã chọn sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố dược động học bao gồm hoạt tính của hợp phần cụ thể theo sáng chế được sử dụng, đường dùng, thời gian dùng, tốc độ bài tiết của hợp chất cụ thể được sử dụng, thời gian điều trị, các thuốc, hợp chất và/hoặc nguyên liệu khác được sử dụng kết hợp với hợp phần cụ thể được sử dụng, tuổi, giới tính, cân nặng, tình trạng, sức khỏe chung và tiền sử bệnh trước đây của bệnh nhân đang được điều trị, và yếu tố tương tự đã biết rõ trong lĩnh vực y học.

Dược phẩm có thể được sử dụng bằng lộ trình và phương thức bất kỳ thích hợp. Theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế được dùng ngoài đường tiêu hóa. “Dùng ngoài đường tiêu hóa” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là phương thức sử dụng khác với dùng qua đường tiêu hóa và tại chỗ, thường bằng cách tiêm, và bao gồm tiêm qua biểu bì, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, trong động mạch, nội tủy, trong bao, trong ổ mắt, trong tim, trong da, trong phúc mạc, trong nội tạng, qua khí quản, dưới da, tiêm dưới da, trong nhãn, dưới bao, dưới nhện, trong tủy sống, trong sọ, trong lồng ngực, tiêm và truyền ngoài màng cứng và trong màng cứng.

Theo một phương án dược phẩm được sử dụng bằng cách tiêm hoặc truyền tĩnh mạch hoặc dưới da.

Sáng chế cũng đề cập đến bộ kit để sử dụng đồng thời, riêng biệt hoặc tuần tự trong liệu pháp bao gồm biến thể kháng thể theo sáng chế, hoặc chế phẩm bao gồm biến thể kháng thể theo sáng chế, tùy ý, trong đó bộ phụ tùng chứa nhiều hơn một liều lượng của biến thể kháng thể.

Theo một phương án, bộ kit chứa như biến thể kháng thể hoặc hợp phần ở một hoặc nhiều vật chứa như lọ.

Theo một phương án, bộ kit chứa như biến thể kháng thể hoặc hợp phần để sử dụng đồng thời, riêng biệt hoặc tuần tự trong trị liệu.

Các ứng dụng trị liệu

Biến thể kháng thể theo sáng chế có nhiều tiện ích điều trị liên quan đến việc điều trị các bệnh và rối loạn liên quan đến các tế bào biểu hiện CD38, ví dụ, tế bào khối u hoặc tế bào miễn dịch biểu hiện CD38. Ví dụ, các biến thể của kháng thể có thể được sử dụng cho các tế bào trong nuôi cấy, ví dụ, in vitro hoặc ex vivo, hoặc cho các đối tượng người, ví dụ, in vivo, để điều trị hoặc ngăn ngừa nhiều loại rối loạn và bệnh tật. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" nhằm bao gồm động vật người và động vật không phải người có thể có lợi hoặc phản ứng với kháng thể. Ví dụ, các đối tượng có thể bao gồm bệnh nhân con người mắc các bệnh hoặc rối loạn có thể được điều chỉnh hoặc cải thiện bằng cách điều chỉnh chức năng CD38, như hoạt động của enzym và/hoặc cảm ứng phân giải và/hoặc loại bỏ/giảm số lượng tế bào biểu hiện CD38 và/hoặc giảm lượng CD38 trên màng tế bào. Theo đó, các biến thể của kháng thể có thể được sử dụng để tạo ra một hoặc nhiều hoạt tính sinh học in vivo hoặc in vitro sau: CDC của tế bào biểu hiện CD38 khi có bổ thể; ức chế hoạt động của CD38 cyclase; thực bào hoặc ADCC của một tế bào biểu hiện CD38 với sự hiện diện của các tế bào tác động của người; và tế bào biểu hiện CD38, như tế bào khối u hoặc tế bào miễn dịch.

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể theo sáng chế, axit nucleic hoặc hỗn hợp các axit nucleic theo sáng chế, vật truyền phân phối theo sáng chế, vector biểu hiện theo sáng chế, tế bào chủ theo sáng chế, hợp phần theo sáng chế, hoặc dược phẩm theo sáng chế để sử dụng làm thuốc.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến sử dụng biến thể kháng thể theo sáng chế, axit nucleic hoặc hỗn hợp các axit nucleic theo sáng chế, vật truyền phân phối theo sáng chế, vector biểu hiện theo sáng chế, tế bào chủ theo sáng chế, hợp phần theo sáng chế, hoặc dược phẩm theo sáng chế trong việc bào chế thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể theo sáng chế, axit nucleic hoặc hỗn hợp các axit nucleic theo sáng chế, vật truyền phân phối theo sáng chế, vector biểu hiện theo sáng chế, tế bào chủ theo sáng chế, hợp phần theo sáng chế, hoặc

được phẩm theo sáng chế để sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn, như để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn liên quan đến tế bào biểu hiện CD38, ví dụ, để sử dụng trong điều trị bệnh liên quan đến tế bào biểu hiện CD38. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vector biểu hiện theo sáng chế, tế bào chủ theo sáng chế, hợp phần theo sáng chế, hoặc được phẩm theo sáng chế để sử dụng trong việc cảm ứng đáp ứng CDC chống khối u chứa tế bào biểu hiện CD38.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn bao gồm sử dụng biến thể kháng thể theo sáng chế, axit nucleic hoặc hỗn hợp các axit nucleic theo sáng chế, vật truyền phân phối theo sáng chế, vector biểu hiện theo sáng chế, tế bào chủ theo các điểm yêu cầu bảo hộ của sáng chế, hợp phần theo sáng chế, hoặc được phẩm theo sáng chế cho đối tượng cần điều trị.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ để sử dụng làm thuốc.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến sử dụng biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong việc điều chế thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ để sử dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa một căn bệnh hoặc rối loạn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn, bao gồm việc sử dụng biến thể kháng thể theo bất kỳ khía cạnh hoặc phương án nào cho đối tượng cần đến nó, thường với lượng có hiệu quả điều trị và/hoặc trong một thời gian đủ để điều trị bệnh hoặc rối loạn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa biến thể kháng thể theo bất kỳ khía cạnh hoặc phương án, để sử dụng làm thuốc.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ để sử dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn bao gồm việc sử dụng dược phẩm bao gồm biến thể kháng thể theo bất kỳ khía cạnh hoặc phương án nào cho đối tượng cần điều trị, thường với lượng có hiệu quả điều trị và/hoặc trong thời gian đủ để điều trị bệnh hoặc rối loạn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn, bao gồm các bước

- lựa chọn đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn, và
- sử dụng cho đối tượng biến thể kháng thể theo bất kỳ khía cạnh hoặc phương án, hoặc dược phẩm chứa biến thể kháng thể, thông thường với lượng có hiệu quả điều trị và/hoặc trong thời gian đủ để điều trị bệnh hoặc rối loạn.

Theo một phương án, bệnh hoặc rối loạn bao gồm tế bào biểu hiện CD38 là bệnh ung thư, tức là rối loạn khối u, như rối loạn đặc trưng bởi sự hiện diện của các tế bào khối u hoặc tế bào miễn dịch biểu hiện CD38, bao gồm, ví dụ, ung thư huyết học như ung thư hạch tế bào B, khối u ác tính tế bào plasma, u lympho tế bào T/NK, khối u ác tính dòng tủy cũng như khối u ác tính rắn.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn là bệnh ung thư bao gồm tế bào khối u biểu hiện CD38.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn là bệnh ung thư bao gồm tế bào ức chế miễn dịch biểu hiện CD38, như tế bào ức chế miễn dịch không ung thư biểu hiện CD38.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn là bệnh ung thư bao gồm cả tế bào khối u và tế bào ức chế miễn dịch biểu hiện CD38.

Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn là bệnh ung thư bao gồm tế bào ức chế miễn dịch biểu hiện CD38 và tế bào khối u mà không biểu hiện CD38.

Theo phương án khác nữa, bệnh hoặc rối loạn là bệnh hoặc rối loạn viêm và/hoặc tự miễn dịch bao gồm tế bào biểu hiện CD38.

Theo phương án khác nữa, bệnh hoặc rối loạn là rối loạn trao đổi chất bao gồm tế bào biểu hiện CD38.

Bệnh ung thư máu:

Theo một khía cạnh, bệnh hoặc rối loạn là bệnh ung thư máu. Ví dụ của bệnh ung thư máu này bao gồm u lympho/bệnh bạch cầu tế bào B bao gồm bệnh bạch cầu/ung thư bạch cầu nguyên bào lympho tế bào B tiền thân và u lympho không Hodgkin tế bào B; bệnh bạch cầu nguyên bào cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính và tân sinh tế bào B trưởng thành, như bệnh bạch cầu lympho mãn tính tế bào B (CLL)/u lympho tế bào nhỏ (SLL), bệnh bạch cầu cấp tính tế bào B, bệnh bạch cầu tế bào B, ung thư tế bào u lympho, u lympho tế bào lớp áo (MCL), u lympho dạng nang (FL), bao gồm FL cấp thấp, cấp trung gian và cấp cao, u lympho trung tâm nang da, u lympho tế bào B vùng biên (loại MALT, loại nút và lách), bệnh bạch cầu tế bào lông, tế bào B lớn lan tỏa ung thư hạch (DLBCL), u lympho Burkitt, u bạch cầu, tế bào u tủy plasma, bệnh bạch cầu tế bào plasma, rối loạn tăng sinh hạch sau cấy ghép, bệnh macroglobulin Waldenström, bệnh bạch cầu tế bào plasma và u lympho tế bào lớn đồng sản (ALCL).

Ví dụ của u lympho không phải Hodgkin tế bào B là u hạt u lymphotoid, u lympho tràn dịch nguyên phát, u lympho tế bào B lớn nội mạch, u lympho tế bào B lớn trung thất, bệnh chuỗi nặng (bao gồm bệnh γ , μ và α), u lympho do điều trị bằng chất ức chế miễn dịch, như u lympho do cyclosporin, và u lympho do methotrexat.

Theo một phương án của sáng chế, rối loạn bao gồm tế bào biểu hiện CD38 là u lympho Hodgkin.

Các ví dụ khác của rối loạn bao gồm tế bào biểu hiện CD38 bao gồm các khối u ác tính có nguồn gốc từ tế bào T và NK bao gồm: tế bào T trưởng thành và tế bào khối u NK bao gồm bệnh bạch cầu tăng sinh tế bào T, bệnh bạch cầu lymphocytic dạng hạt lớn tế bào T, bệnh bạch cầu tế bào NK mạnh, bệnh bạch cầu/u lympho tế bào T trưởng thành, u lympho tế bào NK/T ngoài hạch, tủy mũi, u lympho tế bào T loại bệnh đường ruột, u lympho tế bào T ở gan, u lympho tế bào T giống viêm mô mỡ dưới da, u lympho tế bào NK tạo huyết, hội chứng Mycosis Fungoides/ $\neg$ Sézary, rối loạn tăng sinh bạch huyết tế bào T dương tính CD30 ở da nguyên phát (u lympho tế bào lớn đồng sản da nguyên phát C-ALCL, u nhú dạng lympho, tổn thương đường viền), u lympho tế bào T nguyên bào mạch máu, u lympho tế bào T ngoại vi không xác định và tế bào lớn không sản sinh u lympho.

Ví dụ của bệnh ác tính có nguồn gốc từ tế bào dòng tủy bao gồm bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, bao gồm bệnh bạch cầu nguyên bào tủy cấp tính và bệnh tăng sinh tủy mãn tính, bao gồm bệnh bạch cầu dòng tủy mãn tính.

Theo một số phương án, bệnh ung thư máu được chọn từ nhóm gồm đa u tủy xương (MM), bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu cấp dòng lympho (ALL), bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy (người trưởng thành) (AML), u lympho tế bào vỏ (MCL), u lympho nang (FL), và u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm đa u tủy xương (MM), bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), u lympho tế bào vỏ (MCL), u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL), bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy (người trưởng thành) (AML), bệnh bạch cầu cấp dòng lympho (ALL), và u lympho nang (FL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư là đa u tủy xương (MM).

Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư là u lympho tế bào vỏ (MCL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư là u bạch huyết tế bào B lớn khuếch tán (DLBCL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư là u lympho nang (FL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy (người trưởng thành) (AML).

Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính (ALL).

Bệnh ác tính khối u rắn:

Theo một khía cạnh, bệnh hoặc rối loạn là bệnh ung thư chứa khối u rắn. Nghĩa là, bệnh nhân bị ung thư có khối u rắn.

Ví dụ của khối u rắn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, u hắc tố, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ dạng vảy (NSCLC), NSCLC không phải dạng vảy, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tuyến tiền

liệt chống việc cắt bỏ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thuộc dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư tuyến giáp, caxinom tế bào dạng vảy của đầu và cổ, caxinom của ống thực quản hoặc dạ dày-ruột, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ống dẫn trứng, bệnh ung thư não, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư sinh dục, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư cổ tử cung, ung thư biểu mô phổi, caxinom tế bào thận (RCC) (ví dụ, caxinom tế bào sáng thận hoặc caxinom tế bào dạng nhú thận), u trung biểu mô, caxinom mũi hầu (NPC), caxinom của ống thực quản hoặc dạ dày-ruột, hoặc tổn thương di căn của bất kỳ của chúng.

Theo một phương án được ưu tiên, khối u rắn là từ bệnh ung thư mà chứa tế bào ức chế miễn dịch, như Treg, và biểu hiện CD38. Tế bào điều hòa T (Treg) có thể có biểu hiện CD38 cao, và Treg với biểu hiện CD38 cao ức chế miễn dịch hơn so với Treg có biểu hiện CD38 trung gian (Krejci J. et al. Blood 2016 128: 384-394). Theo đó, không bị giới hạn về mặt lý thuyết, khả năng của biến thể kháng thể theo sáng chế để làm giảm lượng biểu hiện CD38 trên Treg thông qua quá trình phân bào đặc biệt cho phép điều trị các khối u rắn ở bệnh nhân mà Treg biểu hiện CD38. Treg biểu hiện CD38 khi biểu hiện CD38 trên Treg có ý nghĩa thống kê so với đối chứng, ví dụ, biểu hiện được phát hiện bằng kháng thể kháng CD38 so với biểu hiện được phát hiện bằng kháng thể đối chứng isotyp bằng cách sử dụng phương pháp đã biết. Điều này có thể được kiểm tra, ví dụ, bằng cách lấy mẫu sinh học như mẫu máu, mẫu tủy xương hoặc sinh thiết khối u.

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể theo bất kỳ khía cạnh hoặc phương án, hoặc được phẩm chứa biến thể kháng thể, để sử dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa khối u rắn ở đối tượng chứa Treg biểu hiện CD38.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị khối u rắn ở đối tượng, chứa Treg biểu hiện CD38, phương pháp bao gồm sử dụng biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ cho đối tượng, hoặc được phẩm chứa biến thể kháng thể, thông thường với lượng có hiệu quả điều trị và/hoặc trong thời gian đủ để điều trị bệnh hoặc rối loạn.

Theo một số phương án, khối u rắn là u hắc tố.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư phổi.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ dạng vảy (NSCLC).

Theo một số phương án, khối u rắn là NSCLC không phải dạng vảy.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư kết tràng.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư tuyến tiền liệt chống việc cắt bỏ.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư dạ dày.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư buồng trứng.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư thuộc dạ dày.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư gan.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư tụy.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư tuyến giáp.

Theo một số phương án, khối u rắn là caxinom tế bào dạng vảy của đầu và cổ.

Theo một số phương án, khối u rắn là caxinom của ống thực quản hoặc dạ dày-ruột non.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư vú.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư ống dẫn trứng.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư não.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư niệu đạo.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư sinh dục.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư nội mạc tử cung.

Theo một số phương án, khối u rắn là bệnh ung thư cổ tử cung.

Theo một số phương án, tế bào khối u của khối u rắn thiếu biểu hiện CD38 có thể phát hiện. Tế bào khối u của khối u rắn thiếu biểu hiện CD38 có thể phát hiện khi biểu hiện CD38 ở tế bào khối u phân lập từ khối u rắn không có ý nghĩa thống kê khi so

sánh với đối chứng, ví dụ, biểu hiện được phát hiện với kháng thể kháng CD38 so với biểu hiện được phát hiện bằng kháng thể kiểm soát isotyp bằng cách sử dụng phương pháp đã biết. Điều này có thể được kiểm tra, ví dụ, bằng cách lấy mẫu sinh học như sinh thiết, từ khối u.

Theo một số phương án, bệnh ung thư là ở bệnh nhân chứa tế bào điều hòa T biểu hiện CD38.

Theo phương án cụ thể, biến thể kháng thể được sử dụng với lượng có hiệu quả điều trị và/hoặc trong khoảng thời gian đủ để điều trị bệnh ung thư.

Rối loạn trao đổi chất:

Theo một khía cạnh bệnh hoặc rối loạn là rối loạn trao đổi chất. Nghĩa là, bệnh nhân đang bị rối loạn trao đổi chất.

Theo một số phương án rối loạn trao đổi chất là bệnh thoái hóa tinh bột. Bệnh thoái hóa tinh bột nhóm bệnh rất lớn được xác định bằng sự có mặt lắng đọng protein không hòa tan trong các mô. Chẩn đoán của nó dựa trên các phát hiện mô học. Theo một phương án khác cho biết chứng thoái hóa dạng tinh bột có thể là bệnh thoái hóa tinh bột AL.

Bệnh nhân:

Biến thể kháng thể theo sáng chế có thể để sử dụng điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng người đã nhận được ít nhất một liệu pháp điều trị trước đó cho cùng một bệnh hoặc rối loạn với một hoặc nhiều hợp chất, trong đó một hoặc nhiều hợp chất khác với biến thể của kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án cho biết, bệnh hoặc rối loạn có thể là bất kỳ bệnh hoặc rối loạn nào được mô tả ở đây; như ung thư, bệnh viêm và/hoặc bệnh tự miễn dịch hoặc rối loạn liên quan đến các tế bào biểu hiện CD38, hoặc rối loạn trao đổi chất bao gồm tế bào biểu hiện CD38.

Ví dụ, theo một số phương án biến thể kháng thể theo sáng chế có thể để sử dụng điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng người đã được điều trị trước bằng thuốc ức chế proteasome (PI) và/hoặc thuốc điều hòa miễn dịch (IMiD). Ví dụ về chất ức chế proteasome bao gồm nhưng không giới hạn ở bortezomib, carfilzomib và ixazomib. Ví dụ về chất ức chế proteasome bao gồm nhưng không giới hạn ở

bortezomib, carfilzomib và ixazomib. Trong một phương án khác cho biết bệnh hoặc rối loạn có thể là ung thư hoặc khối u, như đa u tủy, u lympho tế bào lớp áo hoặc hội chứng loạn sản tủy (MDS). Do đó, đối tượng có thể là một bệnh nhân ung thư, như bệnh nhân đa u tủy, u lympho tế bào lớp hoặc hội chứng loạn sản tủy (MDS).

Biến thể kháng thể theo sáng chế có thể để sử dụng điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng mà không điều trị trước bất kỳ bằng kháng thể kháng CD38. Thông thường, đối tượng hoặc bệnh nhân này được gọi là bệnh nhân chưa từng sử dụng kháng thể kháng CD38. Theo một phương án, kháng thể kháng CD38 là daratumumab; tức là đối tượng hoặc bệnh nhân chưa điều trị trước với daratumumab. Do đó, theo một phương án, đối tượng hoặc bệnh nhân là đối tượng/bệnh nhân chưa từng sử dụng daratumumab. Bệnh hoặc rối loạn có thể là ung thư hoặc khối u, hoặc bệnh chuyển hóa, bệnh thoái hóa tinh bột này, theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề xuất biến thể kháng thể để sử dụng điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng mà đã nhận được ít nhất một liệu pháp trước đó bao gồm một kháng thể CD38.

Sáng chế cũng đề xuất biến thể kháng thể để sử dụng trong việc điều trị bệnh nhân bệnh ung thư mà nhận được ít nhất một liệu pháp trước đó bao gồm kháng thể CD38. Sáng chế cũng đề xuất biến thể kháng thể để sử dụng trong điều trị bệnh nhân mắc bệnh chuyển hóa, như chứng thoái hóa dạng tinh bột, người đã nhận được ít nhất một liệu pháp trước đó bao gồm kháng thể CD38. Liệu pháp trước đó có thể là một hoặc nhiều chu kỳ của chương trình điều trị theo kế hoạch bao gồm kháng thể CD38, như một hoặc nhiều chu kỳ dự kiến của kháng thể CD38 dưới dạng liệu pháp đơn tác nhân hoặc trong liệu pháp kết hợp, cũng như chuỗi phương pháp điều trị được sử dụng theo cách được lập kế hoạch. Theo một phương án, liệu pháp trước là đơn trị liệu kháng thể CD38. Theo một phương án, liệu pháp trước là liệu pháp kết hợp chứa kháng thể CD38. Ví dụ, liệu pháp trước đó có thể là kháng thể CD38 kết hợp với chất ức chế proteasome (PI) và tác nhân điều hòa miễn dịch. Theo một số phương án, kháng thể CD38 là daratumumab.

Theo một số khía cạnh, bệnh nhân bệnh ung thư cũng có thể là người sử dụng daratumumab như một liệu pháp đơn trị liệu có hiệu lực giới hạn.

Theo một số khía cạnh, bệnh ung thư có thể được đặc trưng là bệnh ung thư mà “kháng” hoặc “tái phát” với liệu pháp trước. Theo phương án khác, liệu pháp trước có thể chứa một hoặc nhiều trong số PI, IMiD, và kháng thể CD38, ví dụ trong đó kháng thể CD38 là daratumumab. Thông thường, điều này chỉ ra rằng liệu pháp trước đó đạt được ít hơn đáp ứng hoàn toàn (CR), ví dụ, ung thư không đáp ứng với liệu pháp kết hợp hoặc đơn chất kháng thể CD38 hoặc ung thư tiến triển trong một khoảng thời gian xác định trước sau khi kết thúc CD38 liệu pháp kháng thể. Ví dụ về các liệu pháp kết hợp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sự kết hợp của kháng thể CD38 với PI hoặc IMiD hoặc sự kết hợp của PI và IMiD. Tương tự, nó có thể chỉ ra rằng liệu pháp trước đó đạt được ít hơn đáp ứng hoàn toàn (CR), ví dụ, ung thư không đáp ứng với PI, hoặc IMiD hoặc liệu pháp kết hợp của chúng, hoặc ung thư tiến triển trong một định trước khoảng thời gian sau khi kết thúc liệu pháp nói trên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định liệu bệnh ung thư có kháng điều trị trước đó hay không dựa trên những gì đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm hướng dẫn có sẵn cho từng loại bệnh ung thư.

Ví dụ, ở đa u tủy xương, bệnh kháng và tái phát có thể được xác định theo hướng dẫn được xuất bản bởi Rajkumar, Harousseau et al., on behalf of the International Myeloma Workshop Consensus Panel, *Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel*, Blood 2011;117:4691-4695:

U tủy xương *kháng* có thể được xác định là bệnh không đáp ứng khi đang điều trị chính hoặc cứu cánh, hoặc tiến triển trong vòng 60 ngày kể từ ngày điều trị cuối cùng. Bệnh không đáp ứng được định nghĩa là không đạt được đáp ứng tối thiểu hoặc phát triển bệnh tiến triển (PD) trong khi điều trị. Có thể có 2 loại u tủy kháng: “u tủy tái phát và kháng” và “u tủy xương kháng nguyên phát”:

U tủy xương *tái phát và kháng* có thể được xác định là bệnh không đáp ứng trong khi trị liệu cứu cánh, hoặc tiến triển trong vòng 60 ngày kể từ lần trị liệu cuối cùng ở bệnh nhân đã đạt được đáp ứng tối thiểu (MR) hoặc tốt hơn vào một thời điểm nào đó trước khi tiến triển trong quá trình bệnh của họ.

U tủy xương *kháng nguyên phát* có thể được xác định là bệnh không đáp ứng ở bệnh nhân chưa từng đạt được đáp ứng tối thiểu hoặc tốt hơn với liệu pháp bất kỳ. Nó bao gồm bệnh nhân chưa từng đạt được MR hoặc tốt hơn, trong đó không có thay đổi đáng kể về protein M và không có bằng chứng về tiến triển lâm sàng cũng như kháng nguyên phát, PD nơi bệnh nhân đáp ứng tiêu chuẩn về PD thực sự. Khi báo cáo hiệu quả điều trị cho bệnh nhân kháng nguyên phát, hiệu quả trong 2 phân nhóm này (“không đáp ứng - không tiến triển” và “tiến triển”) cần được mô tả riêng biệt.

U tủy xương tái phát có thể được xác định như u tủy đã điều trị trước đó mà tiến triển và cần bắt đầu trị liệu cứu cánh nhưng không đáp ứng tiêu chí cho loại “u tủy kháng nguyên phát” hoặc “u tủy tái phát và kháng”.

Chi tiết về đáp ứng đặc hiệu (CR, PR v.v.) ở đa u tủy xương và làm thế nào để kiểm tra chúng, xem Rajkumar, Harousseau et al., 2011 (*supra*).

Theo đó, theo một số phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này, hoặc được phẩm chứa biến thể kháng thể, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư mà kháng với điều trị trước chứa một hoặc nhiều trong số PI, IMiD và kháng thể CD38. Theo một phương án điều trị trước chứa kháng thể CD38. Theo phương án cụ thể, bệnh ung thư được xác định là bệnh ung thư kháng trước khi sử dụng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng, bao gồm các bước:

(i) nhận biết đối tượng kháng với điều trị trước chứa một hoặc nhiều trong số PI, IMiD và kháng thể CD38, và

(ii) sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này, hoặc được phẩm chứa biến thể kháng thể cho đối tượng.

Theo một phương án điều trị trước chứa kháng thể CD38.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư kháng với điều trị trước chứa một hoặc nhiều trong số PI, IMiD và kháng thể CD38 ở đối tượng, bao gồm sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của biến thể kháng thể theo khía

cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này, hoặc được phẩm chứa biến thể kháng thể to đối tượng. Theo một phương án điều trị trước chứa kháng thể CD38.

Theo một số phương án PI được chọn từ nhóm bao gồm bortezomib, carfilzomib và ixazomib.

Theo một số phương án IMiD được chọn từ nhóm bao gồm thalidomide, lenalidomide và pomalidomide.

Theo một số phương án, kháng thể CD38 là daratumumab.

Theo một số phương án, biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này, hoặc được phẩm chứa biến thể kháng thể, để sử dụng trong việc điều trị bệnh ung thư mà tái phát sau khi điều trị trước chứa một hoặc nhiều trong số PI, IMiD và kháng thể CD38. Theo một phương án điều trị trước chứa kháng thể CD38. Theo phương án cụ thể, bệnh ung thư được xác định là đã tái phát trước khi sử dụng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư ở đối tượng, bao gồm các bước:

- (i) nhận biết đối tượng tái phát sau khi điều trị trước chứa một hoặc nhiều trong số PI, IMiD và kháng thể CD38, và
- (ii) sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này, hoặc được phẩm chứa biến thể kháng thể cho đối tượng.

Theo một phương án điều trị trước chứa kháng thể CD38.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư tái phát sau khi điều trị trước chứa một hoặc nhiều trong số PI, IMiD và kháng thể CD38 ở đối tượng, bao gồm sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này, hoặc được phẩm chứa biến thể kháng thể cho đối tượng. Theo một phương án điều trị trước chứa kháng thể CD38.

Theo một số phương án PI được chọn từ nhóm gồm bortezomib, carfilzomib và ixazomib.

Theo một số phương án IMiD được chọn từ nhóm gồm thalidomide, lenalidomide và pomalidomide.

Theo một số phương án, kháng thể CD38 là daratumumab.

Theo phương án cụ thể, biến thể kháng thể theo sáng chế được sử dụng với lượng có hiệu quả điều trị và/hoặc trong khoảng thời gian đủ để xử lý bệnh ung thư kháng hoặc tái phát.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư máu.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát được chọn từ nhóm gồm đa u tủy xương (MM), bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu nguyên bào tủy cấp tính (người trưởng thành) (AML), lympho tế bào lớp bao (MCL), u bạch huyết nang (FL), và u bạch huyết tế bào B lớn khuếch tán (DLBCL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát được chọn từ nhóm gồm đa u tủy xương (MM), bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), lympho tế bào vỏ (MCL), u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL), và u lympho nang (FL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là đa u tủy xương (MM).

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là u lympho tế bào vỏ (MCL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là u lympho tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là u bạch huyết nang (FL).

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là khối u rắn. Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát được chọn từ nhóm gồm u hắc tố, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ dạng vảy (NSCLC), NSCLC không phải dạng vảy, bệnh ung thư kết tràng, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tuyến tiền liệt chống việc cắt bỏ, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư thuộc dạ dày, bệnh ung thư gan, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư

tuyến giáp, caxinom tế bào dạng vảy of đầu và cổ, caxinom của ống thực quản hoặc dạ dày-ruột non, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư ống dẫn trứng, bệnh ung thư não, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư sinh dục, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư cổ tử cung.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là u hắc tố.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư phổi.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư phổi không phải tế bào nhỏ dạng vảy (NSCLC).

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là NSCLC không phải dạng vảy.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư kết tràng.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư tuyến tiền liệt.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư tuyến tiền liệt chống việc cắt bỏ.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư dạ dày.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư buồng trứng.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư thuộc dạ dày.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư gan.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư tụy.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư tuyến giáp.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là caxinom tế bào dạng vảy của đầu và cổ.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là caxinom của ống thực quản hoặc dạ dày-ruột non.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư vú.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư ống dẫn trứng.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư não.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư niệu đạo.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư sinh dục.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư nội mạc tử cung.

Theo một số phương án, bệnh ung thư kháng hoặc tái phát là bệnh ung thư cổ tử cung.

Các bệnh và rối loạn tự miễn và viêm:

Theo phương án khác của sáng chế, rối loạn bao gồm tế bào biểu hiện CD38 là rối loạn miễn dịch trong đó tế bào B biểu hiện CD38, đại thực bào, huyết tế bào, bạch cầu đơn nhân to và tế bào T liên quan đến, như bệnh viêm và/hoặc bệnh tự miễn. Ví dụ về các rối loạn miễn dịch trong đó tế bào B biểu hiện CD38, tế bào huyết tương, bạch cầu đơn nhân và tế bào T có liên quan bao gồm rối loạn tự miễn dịch, như bệnh vẩy nến, viêm khớp vẩy nến, viêm da, bệnh xơ cứng bì toàn thân và bệnh xơ cứng, bệnh viêm ruột (IBD), bệnh Crohn, viêm loét đại tràng, hội chứng suy hô hấp, viêm màng não, viêm não, viêm màng bồ đào, viêm cầu thận, chàm, hen suyễn, xơ vữa động mạch, thiếu kết dính bạch cầu, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Raynaud, hội chứng Sjögren, bệnh tiểu đường khởi phát vị thành niên, bệnh Reiter, bệnh Behçet, viêm thận phức hợp miễn dịch, bệnh thận IgA, bệnh đa dây thần kinh IgM, giảm tiểu cầu qua trung gian miễn dịch, như ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát cấp tính và ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát mãn tính, thiếu máu tán huyết, bệnh nhược cơ, viêm thận luput, luput ban đỏ hệ thống, viêm khớp dạng thấp (RA), viêm da dị ứng, bệnh pemfigut, bệnh Grave, viêm tuyến

giáp Hashimoto, bệnh u hạt Wegener, hội chứng Omenn, suy thận mạn tính, tăng bạch cầu đơn nhân nhiễm trùng cấp tính, bệnh đa xơ cứng, HIV và các bệnh liên quan đến virus herpes. Các ví dụ khác là hội chứng suy hô hấp cấp tính nghiêm trọng và viêm màng cứng. Hơn nữa, các bệnh và rối loạn khác được bao gồm, như những bệnh gây ra hoặc qua trung gian nhiễm vi rút của tế bào B, như vi rút Epstein-Barr (EBV).

Theo một phương án, rối loạn bao gồm tế bào biểu hiện CD38 là viêm khớp dạng thấp.

Các ví dụ khác của rối loạn viêm, miễn dịch và/hoặc tự miễn dịch trong đó tự kháng thể và/hoặc hoạt tính quá mức của tế bào lympho B và T nổi bật và có thể được điều trị theo sáng chế bao gồm: bệnh viêm mạch và các rối loạn mạch khác, như viêm nhiều mạch vi mô, hội chứng Churg-Strauss, và các bệnh mạch máu liên quan đến ANCA khác, viêm đa mạch, viêm mạch máu cấp thiết yếu, viêm mạch bạch cầu ở da, bệnh Kawasaki, viêm động mạch Takayasu, viêm khớp tế bào khổng lồ, ban xuất huyết Henoch-Schönlein, viêm mạch máu não nguyên phát hoặc cô lập, nốt ban đỏ, viêm tắc tiểu cầu, thuyên tắc huyết khối ban xuất huyết (bao gồm hội chứng tan huyết urê huyết), và bệnh mạch máu thứ phát, bao gồm viêm mạch bạch cầu ở da (ví dụ, thứ phát sau viêm gan B, viêm gan C, macroglobulin huyết Waldenström, khối u tế bào B, viêm khớp dạng thấp, hội chứng Sjögren, hoặc luput ban đỏ hệ thống); các ví dụ khác là ban đỏ nốt, viêm mạch dị ứng, viêm mô da, bệnh Weber-Christian, bệnh tăng huyết cầu ban xuất huyết và bệnh Buerger; rối loạn da, như viêm da tiếp xúc, bệnh da liễu IgA tuyến tính, bệnh bạch biến, bệnh loét mù hóa, ly giải biểu bì bóng nước mắc phải, bệnh pemphigus thể thông thường (bao gồm pemphigoid màng nhầy và pemphigoid bóng nước), rụng tóc từng mảng (bao gồm rụng tóc toàn thể và rụng tóc toàn bộ), viêm da herpetiformis, hồng ban đa dạng và mày đay mạn tính tự miễn (bao gồm phù mạch và mày đay liên quan đến viêm mạch); giảm bạch cầu qua trung gian miễn dịch, như giảm bạch cầu hạt trung tính tự miễn, và bất sản hồng cầu đơn thuần; rối loạn mô liên kết, như bệnh luput CNS, bệnh luput ban đỏ dạng đĩa, hội chứng CREST, bệnh mô liên kết hỗn hợp, viêm đa cơ/viêm da cơ, bệnh viêm cơ thể vùi, chứng thoái hóa dạng tinh bột thứ phát, bệnh huyết tương tủy I và tủy II, đau cơ xơ hóa, hội chứng kháng thể phospholipid, bệnh ưa chảy máu thứ phát, viêm đa sụn tái phát, bệnh sacoit, hội chứng người cứng và sốt thấp khớp; ví dụ khác là viêm bao cơ bạch cầu ái toan; viêm khớp, như viêm cột sống dính

khớp, viêm khớp mãn tính ở trẻ vị thành niên, bệnh Still người lớn và hội chứng SAPHO; các ví dụ khác là viêm xương cùng, viêm khớp phản ứng, bệnh Still và bệnh gút; rối loạn huyết học, như thiếu máu bất sản, thiếu máu tan máu nguyên phát (bao gồm hội chứng ngưng kết lạnh), thiếu máu tan máu thứ phát sau CLL hoặc bệnh luput ban đỏ hệ thống; hội chứng POEMS, bệnh thiếu máu ác tính và bệnh tăng sắc tố ban xuất huyết Waldenström; các ví dụ khác là mất bạch cầu hạt, giảm bạch cầu tự miễn, bệnh Franklin, bệnh Seligmann, bệnh chuỗi nặng gamma, hội chứng paraneoplastic thứ phát sau u tuyến ức và u lympho, hội chứng cận sản thứ phát sau u tuyến ức và u lympho, và sự tạo ra chất ức chế yếu tố VIII; bệnh nội tiết, như bệnh đa nội tạng và bệnh Addison; các ví dụ khác là hạ đường huyết tự miễn, suy giáp tự miễn, hội chứng insulin tự miễn, viêm tuyến giáp de Quervain, và kháng insulin qua trung gian kháng thể thụ thể insulin; rối loạn gan-tiêu hóa, như bệnh celiac, bệnh Whipple, xơ gan mật nguyên phát, viêm gan mạn tính hoạt động và viêm đường mật xơ cứng nguyên phát; một ví dụ khác là viêm dạ dày tự miễn dịch; bệnh thận, như viêm cầu thận tiến triển nhanh, viêm thận sau liên cầu, hội chứng Goodpasture, viêm cầu thận màng và viêm thận do cryoglobulin; một ví dụ khác là bệnh thay đổi tối thiểu; rối loạn thần kinh, như bệnh thần kinh tự miễn dịch, viêm đa dây thần kinh, hội chứng nhược cơ Lambert-Eaton, múa giật Sydenham, tabes dorsalis và hội chứng Guillain-Barré; các ví dụ khác là bệnh lý tủy/liệt cứng nhiệt đới, bệnh nhược cơ, bệnh đa dây thần kinh do viêm cấp tính, và bệnh đa dây thần kinh do viêm mãn tính; bệnh đa xơ cứng; rối loạn tim và phổi, như COPD, viêm phế nang xơ hóa, viêm tiểu phế quản tắc nghẽn, aspergillosis dị ứng, xơ nang, hội chứng Löffler, viêm cơ tim và viêm màng ngoài tim; các ví dụ khác là viêm phổi quá mẫn, và hội chứng paraneoplastic thứ phát sau ung thư phổi; rối loạn dị ứng, như hen phế quản và hội chứng tăng IgE; ví dụ khác là amaurosis fugax; rối loạn nhãn khoa, như viêm túi mắt vô căn; các bệnh truyền nhiễm, như nhiễm trùng parvovirus B (bao gồm cả hội chứng tay và tất); các rối loạn sản phụ khoa, như nạo phá thai nhiều lần, sót thai nhiều lần và thai chậm phát triển trong tử cung; ví dụ khác là hội chứng paraneoplastic thứ phát sau ung thư phụ khoa; rối loạn sinh sản nam, như hội chứng paraneoplastic thứ phát sau u tinh hoàn; và rối loạn có nguồn gốc từ cấy ghép, như từ chối allograft và xenograft, và bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ.

Theo một phương án, bệnh hoặc rối loạn là viêm khớp dạng thấp.

Chế độ liều lượng và hỗn hợp

Chế độ liều lượng ở phương pháp điều trị và việc sử dụng trên được điều chỉnh để mang lại đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị). Ví dụ, có thể dùng một liều duy nhất, nhiều liều chia nhỏ có thể được dùng theo thời gian hoặc liều lượng có thể được giảm hoặc tăng tương ứng theo chỉ định của tình trạng điều trị. Chế phẩm tiêm có thể được bào chế dưới dạng đơn vị liều lượng để dễ sử dụng và đồng nhất liều lượng.

Liều hiệu quả và chế độ liều lượng cho biến thể kháng thể tùy thuộc vào bệnh hoặc tình trạng để được điều trị và có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Khoảng làm ví dụ, không giới hạn cho lượng có hiệu quả điều trị của biến thể kháng thể theo sáng chế là khoảng 0,001-30 mg/kg.

Biến thể kháng thể cũng có thể được sử dụng phòng bệnh để giảm nguy cơ phát triển ung thư, trì hoãn sự khởi đầu của việc xuất hiện sự kiện tiến triển ung thư và/hoặc giảm nguy cơ tái phát khi ung thư thuyên giảm.

Biến thể kháng thể cũng có thể được sử dụng theo liệu pháp kết hợp, tức là, kết hợp với các tác nhân điều trị khác hoặc các phương thức điều trị có liên quan đến bệnh hoặc tình trạng được điều trị.

Theo đó, theo một phương án, biến thể kháng thể là cho kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu khác, như tác nhân hóa trị liệu, tác nhân chống viêm hoặc chất ức chế miễn dịch và/hoặc tác nhân điều hòa miễn dịch, ví dụ, kháng thể trị liệu khác. Việc quản lý kết hợp như vậy có thể đồng thời, riêng biệt hoặc tuần tự. Để sử dụng đồng thời, các tác nhân có thể được sử dụng như một chế phẩm hoặc các chế phẩm riêng biệt, nếu thích hợp.

Biến thể kháng thể cũng có thể được sử dụng kết hợp với xạ trị và/hoặc phẫu thuật và/hoặc tế bào gốc ngoại vi tự thân hoặc dị sinh hoặc cấy ghép tủy xương.

Các ứng dụng chẩn đoán

Theo các khía cạnh khác, chế phẩm chẩn đoán và sử dụng chứa biến thể kháng thể theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ cũng được dự tính, ví dụ, đối với bệnh liên quan đến tế bào biểu hiện CD38, như được ví dụ ở trên. Ví dụ, biến thể kháng thể có thể được đánh dấu bằng chất phóng xạ (như được mô tả trong bản mô tả này) hoặc chất tạo

mảng bám phóng xạ. Theo một phương án, chế phẩm chẩn đoán là chẩn đoán đồng hành mà được sử dụng để sàng lọc và chọn bệnh nhân sẽ được hưởng lợi từ việc điều trị bằng biến thể kháng thể.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến sử dụng biến thể kháng thể, hợp phần hoặc bộ kit gồm các phần theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp chẩn đoán bao gồm sử dụng polypeptit, kháng thể, hợp phần hoặc bộ kit gồm các phần theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này cho ít nhất là một phần cơ thể người hoặc động vật có vú khác.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến sử dụng biến thể kháng thể, hợp phần hoặc bộ kit gồm các phần theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này trong việc tạo ảnh của ít nhất một phần cơ thể của người hoặc động vật có vú khác.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ảnh ít nhất là một phần cơ thể người hoặc động vật có vú khác, bao gồm việc sử dụng biến thể, hợp phần hoặc bộ kit gồm các phần theo khía cạnh hoặc phương án bất kỳ trong bản mô tả này được mô tả.

Bảng 1 – Axit amin và trình tự axit nucleic

SEQ ID NO:	Thiết kế	Trình tự
1	VH-3003-C	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAF <u>GGT</u> <u>FSSYA</u> ISWVRQAPGQGLEWMGRI <u>IIRFLGIA</u> NYAQKFQGRVTLIADKSTNTAYMELSSLR SEDTAVYYC <u>AGEPGERDPDAVDI</u> WGQGT MVTVSS
2	VH-3003-C_CDR1	GGTFSSYA
3	VH-3003-C_CDR2	IIRFLGIA
4	VH-3003-C_CDR3	AGEPGERDPDAVDI
5	VL(Kappa)-3003-C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGIR</u> <u>SWLAWYQQKPEKAPKSLIYA</u> AASSLQSGVP

		SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQ</u> <u>YNSYPLT</u> FGGGTKVEIK
6	VL(Kappa)-3003-C_CDR1	QGIRSW
	VL(Kappa)-3003-C_CDR2	AAS
7	VL(Kappa)-3003-C_CDR3	QQYNSYPLT
8	VH-3003-B	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVS <u>GFTF</u> <u>NSFAM</u> SWVRQAPGKGLEWVSA <u>ISGSGGG</u> <u>TY</u> YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYFC <u>AKDKILWFGEPVFDY</u> WGQ GTLVTVSS
9	VL(Kappa)-3003-B	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <u>QSVSS</u> <u>YLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>DASN</u> RATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>RSNWPPT</u> FGQGTKVEIK
10	VH-3003-A	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <u>GGTF</u> <u>SSYAF</u> SWVRQAPGQGLEWMGR <u>VIPFLGIA</u> NSAQKFQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRS EDTAVYYC <u>ARDDIAALGPFDY</u> WGQGTLV TVSS
11	VL(Kappa)-3003-A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISS</u> <u>WLA</u> WYQQKPEKAPKSLIY <u>AASS</u> LQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQ</u> <u>YNSYPR</u> TFGQGTKVEIK
12	VH-gp120-b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQAS <u>GYR</u> <u>FSNFVI</u> HWVRQAPGQRFWMGW <u>INPYNG</u> <u>NKEF</u> SAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRS LRSADTAVYYC <u>ARVGPYSWDDSPQDNYY</u> <u>MDV</u> WGKGTTVIVSS
13	VH-gp120-b12_CDR1	GYRFSNFV
14	VH-gp120-b12_CDR2	INPYNGNK
15	VH-gp120-b12_CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV
16	VL-gp120-b12	EIVLTQSPGTLTLSPGERATFSCRSS <u>HSIRSR</u> <u>RVA</u> WYQHKPGQAPRLVIH <u>GVS</u> NRASGISD

		RFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC <u>QV</u> <u>YGASSYTF</u> GGQTKLERK
17	VL-gp120-b12_CDR1	HSIRSRR
	VL-gp120-b12_CDR2	GVS
18	VL-gp120-b12_CDR3	QVYGASSYT
19	vùng hằng định HC IgG1m(za) của người (Uniprot entry P01857)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDDK <u>K</u> VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SR <u>DEL</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
20	vùng hằng định HC IgG1m(f) của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
21	vùng hằng định HC IgG1m(z) của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDDK <u>K</u> VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

22	vùng hằng định HC IgG1m(a) của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKPVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS <u>RDEL</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
23	vùng hằng định HC IgG1m(x) của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKPVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHE <u>G</u> LHNHYTQKSL SLSPGK
24	vùng hằng định HC IgG1m(f)-E430G của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSL SLSPGK
25	vùng hằng định HC IgG1m(f)-E430S của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

		REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMH <u>S</u> ALHNHYTQKSL SLSPGK
26	vùng hăng định HC IgG1m(f)-E430F của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMH <u>F</u> ALHNHYTQKSL SLSPGK
27	vùng hăng định HC IgG1m(f)-E430T của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMH <u>T</u> ALHNHYTQKSL SLSPGK
28	vùng hăng định HC IgG1m(f)-E345K của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>K</u> PQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMH <u>E</u> ALHNHYTQKSL SLSPGK
29	vùng hăng định HC IgG1m(f)-E345Q của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS

		NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPRQPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
30	vùng hằng định HC IgG1m(f)-E345R của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
31	vùng hằng định HC IgG1m(f)-E345Y của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPRYPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
32	vùng hằng định HC IgG1m(f)-S440W của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD

		KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK <u>WL</u> SLSPGK
33	vùng hằng định HC IgG1m(f)-S440Y của người	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK <u>YL</u> SLSPGK
34	vùng hằng định HC IgG2 của người (Uniprot entry P01859)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPS NTKVDKTVERKCCVECPPCAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPMMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
35	vùng hằng định HC IgG3 của người (Uniprot entry P01860)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPS NTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCD TPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVQFKWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMMLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVM HEALHNRFTHQKSLSLSPGK
36	vùng hằng định HC IgG4 của người (Uniprot entry P01861)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV

		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVQLHQLDNLGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG K
37	vùng hằng định Kappa LC của người	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
38	CD38 của người (Uniprot entry P28907)	MANCEFSPVSGDKPCCRLSRAQLCLGVSI LVLILVVVLA VVVPRWRQQWSGPGTTKRF PETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDA FKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTV CNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLED TLLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDW RKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVH VMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKV QTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESII SKRNIQFSCCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCT SEI
39	hisCD38	HHHHHHHRWRQTWSGPGTTKRF PETVLAR CVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFIS KHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLW SRIKDLAHQFTQVQRDMFTLED TLLGYLA DDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNN PVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGS RSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEAW VIHGGREDSRDLCQDPTIKELESII SKRNIQF SCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI
40	biến thể VH CDR1	GGTFX ₁ SYA, trong đó X ₁ is S or R
41	biến thể VH CDR2	IIX ₁ FLGX ₂ X ₃ , trong đó X ₁ is R or V; X ₂ is I or K; and X ₃ is A, T or V, như A or T
42	biến thể VH CDR3	X ₁ GEPGX ₂ RDPDAX ₃ DI, trong đó X ₁ is A or T; X ₂ is E, D or A, như E or D; and X ₃ is V or F
43	VL CDR1	QGIRSW
	VL CDR2	AAS

44	biến thể VL CDR3	QQYNX ₁ YPLT, trong đó X ₁ is S or N
45	vùng hằng định HC IgG1m(f) của người mà không có Lys (K) ở vị trí 447 theo đánh số Eu	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVKPKCDKTHCTPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSL SLSPG
46	vùng hằng định HC IgG1m(f)-E430G của người, mà không có Lys (K) ở vị trí 447 theo đánh số Eu	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVKPKCDKTHCTPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKSL SLSPG

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế còn được minh họa bằng các ví dụ sau đây không nên được hiểu là giới hạn.

Ví dụ 1 – Kháng thể và dòng tế bào

Cấu trúc biểu hiện kháng thể

Để biểu hiện các kháng thể của người và kháng thể được nhân bản hóa được sử dụng ở đây, trình tự chuỗi nặng (VH) và chuỗi nhẹ (VL) biến đổi được điều chế bằng cách tổng hợp gen (GeneArt Gene Synthesis; ThermoFisher Scientific) và được nhân bản trong vectơ biểu hiện pcDNA3.3 (ThermoFisher Scientific) có chứa vùng không đổi của chuỗi nặng IgG của người (HC) (vùng không đổi IgG1m ở người (f) HC: SEQ ID

NO: 20) và/hoặc vùng không đổi của chuỗi nhẹ kappa ở người (LC): SEQ ID NO: 37. Các đột biến mong muốn được đưa vào bằng cách tổng hợp gen. Các biến thể kháng thể CD38 trong ứng dụng này có trình tự VH và VL bắt nguồn từ các kháng thể CD38 IgG1-A được mô tả trước đây (WO 2006/099875 A1, WO 2008/037257 A2, WO 2011/154453 A1; VH: SEQ ID NO: 10; VL: SEQ ID NO: 11), IgG1-B (WO 2006/099875 A1, WO 2008/037257 A2, WO 2011/154453 A1; VH: SEQ ID NO: 8; VL: SEQ ID NO: 9) và IgG1-C (WO 2011/154453 A1; VH: SEQ ID NO: 1; VL: SEQ ID NO: 5). Kháng thể IgG1 của người b12, kháng thể đặc hiệu với HIV gp120 được sử dụng làm đối chứng âm tính trong một số thí nghiệm (Barbas et al., J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23; VH: SEQ ID NO:12; VL: SEQ ID NO:16).

Cấu trúc kháng thể biểu hiện tạm thời

Hỗn hợp ADN plasmit mã hóa cả chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể đã được truyền nhanh chóng trong các tế bào Expi293F (Gibco, Cat No A14635) bằng cách sử dụng 293fectin (Life Technologies) về cơ bản như được mô tả bởi Vink et al. (Vink et al, 2014 Phương pháp 65 (1): 5-10). Nồng độ kháng thể trong chất nổi được đo bằng độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm. Các chất nổi có chứa kháng thể hoặc được sử dụng trực tiếp trong các xét nghiệm trong ống nghiệm, hoặc các kháng thể đã được tinh chế như được mô tả bên dưới.

Tinh chế kháng thể và đánh giá chất lượng

Kháng thể được tinh chế bằng sắc ký ái lực Protein A. Chất nổi trên bề mặt nuôi cấy được lọc qua bộ lọc cột 0,20 μ M và được nạp trên cột 5 mL MabSelect SuRe (GE Healthcare), được rửa và rửa giải bằng natri xitrat-NaOH 0,02 M, pH 3. Chất rửa giải được nạp trên cột HiPrep Desalting (GE Healthcare) ngay sau khi tinh chế và các kháng thể được trao đổi đệm thành 12,6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, đệm pH 7,4 (B.Braun hoặc Thermo Fisher). Sau khi trao đổi dung dịch đệm, mẫu được lọc vô trùng qua bộ lọc cột 0,2 μ m. Protein tinh khiết được phân tích bằng một số xét nghiệm phân tích sinh học bao gồm điện di mao quản trên gel natri dodecyl sulfat-polyacrylamit (CE-SDS) và sắc ký loại trừ kích thước hiệu suất cao (HP-SEC). Nồng độ được đo bằng độ hấp thụ ở 280 nm. Các kháng thể tinh khiết được lưu trữ tại 2-8°C.

Dòng tế bào được sử dụng ở ví dụ được mô tả ở bảng 2 bên dưới. Số phân tử CD38 và CD59 trung bình trên mỗi tế bào được xác định bằng phương pháp đo tế bào dòng định lượng (Qifi, DAKO).

Bảng 2: Tổng quan của dòng tế bào và biểu hiện của CD38 và CD59

				ABC ước tính	
dòng tế bào	loại khối u	Mục lục	nhà cung cấp	CD38	CD59
SU-DHL-8	DLBCL	ACC 573	DSMZ	415000	31000
Oci-Ly-7	DLBCL	ACC 688	DSMZ	310000	81000
Oci-Ly-19	DLBCL	ACC 528	DSMZ	271000	28000
Ramos	Burkitt	CRL-1596	ATCC	260000	7000
Daudi	Burkitt	CCL-213	ATCC	200000	0
Oci-Ly18	DLBCL	ACC 699	DSMZ	181000	40000
Raji	Burkitt	CCL-86	ATCC	170000	55000
DOHH2	FL	ACC 47	DSMZ	167000	66000
SU-DHL-4	DLBCL	ACC 495	DSMZ	158000	147000
WSU-DLCL2	DLBCL	ACC 575	DSMZ	150000	96000
Z-138	MCL	CRL-3001	ATCC	133000	53000
JVM-13	MCL	CRL-3003	ATCC	130000	254000
REH	B-ALL	ACC 22	DSMZ	130000	không được thử nghiệm
Jeko-1	MCL	ACC 553	DSMZ	108000	31000
Wien133	Burkitt	-	BioAnaLab, UK	100000	0
697	B-ALL	ACC 42	DSMZ	98000	130000
Granta-519	MCL	ACC 342	DSMZ	90000	140000

RS4;11	B-ALL	ACC 508	DSMZ	80-86000	không được thử nghiệm
DB	DLBCL	ACC 539	DSMZ	70000	200000
NALM-16	B-ALL	ACC 680	DSMZ	50000	không được thử nghiệm
JVM-3	CLL	ACC 18	DSMZ	30000	không được thử nghiệm
U266	MM	ACC 9	DSMZ	15000	không được thử nghiệm
RC-K8	DLBCL	ACC 561	DSMZ	10000	không được thử nghiệm
Pfeiffer	DLBCL	CRL-2632	ATCC	0	100000
THP-1	AML	ACC 16	DSMZ	400000	40000
Oci-AML3	AML	ACC 582	DSMZ	200000	40000
monomac6	AML	ACC 124	DSMZ	200000	30000
KG-1	AML	CCL-246	ATCC	180000	100000
ML-2	AML	ACC 15	DSMZ	150000	10000
U937	AML	CRL-1593.2	ATCC	130000	không được thử nghiệm
Nomo-1	AML	ACC 542	DSMZ	110000	30000
MEGAL	AML	ACC 719	DSMZ	100000	110000
AML-193	AML	ACC 549	DSMZ	100000	không được thử nghiệm
MOLM-13	AML	ACC 554	DSMZ	90000	10000
HL-60	AML	CLL-240	ATCC	90000	10000
Oci-M1	AML	ACC 529	DSMZ	0	200000

ABC = Kháng thể liên kết với mỗi tế bào

Gốc/nguồn của các dòng tế bào như sau:

Dòng tế bào:	Nguồn:
Daudi	ATCC; CCL-213
Ramos	ATCC; CRL-1596
Wien-133	BioAnaLab, Oxford, U.K
NALM-16	DSMZ; ACC 680
U266	ATCC; TIB-196
RC-K8	DSMZ; ACC 561

Ví dụ 2 – Gắn kết kháng thể CD38 và biến thể của nó với CD38 của người và khỉ cynomolgus được biểu hiện trên bề mặt tế bào

Gắn kết với bề mặt tế bào được biểu hiện CD38 ở tế bào Daudi và NALM16 và PBMC từ khỉ cynomolgus, được xác định bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy. Các tế bào, được tái tạo trong RPMI chứa 0,2% BSA, được gieo mầm ở 100000 tế bào/lỗ trong đĩa đáy tròn 96 lỗ polystyren (Greiner bio-one) và được ly tâm trong 3 phút ở 300xg, 4°C. Các dung dịch pha loãng nối tiếp (0,005-10 µg/mL nồng độ kháng thể cuối cùng trong 3 lần pha loãng nối tiếp) của CD38 hoặc các kháng thể đối chứng được thêm vào và các tế bào được ủ trong 30 phút ở 4°C. Đĩa được rửa/ly tâm hai lần bằng cách sử dụng đệm FACS (PBS/0,1% BSA/0,01% Na-Azide). Tiếp theo, các tế bào được ủ trong 30 phút ở 4°C với R-Phycoerythrin (PE) - IgG kháng người liên hợp F(ab')₂ (Jackson) pha loãng 1/100 trong PBS/0,1% BSA/0,01% Na -Azide hoặc IgG kháng người liên hợp với FITC (Southern Biotech) để phân tích PBMC của khỉ cynomolgus. Tế bào được rửa/ly tâm hai lần bằng cách sử dụng dung dịch đệm FACS, được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm FACS và được phân tích bằng cách xác định cường độ huỳnh quang trung bình sử dụng FACS_Fortessa (BD). Các đường cong gắn kết được tạo ra bằng cách sử dụng phân tích hồi quy phi tuyến tính (đáp ứng liều chữ chi với độ dốc thay đổi) trong phần mềm GraphPad Prism V6.04 (GraphPad Software).

Fig. 2 thể hiện rằng kháng thể CD38 IgG1-B, IgG1-C và IgG1-A gắn kết phụ thuộc vào liều lượng với tế bào NALM16 biểu hiện CD38. Việc đưa đột biến E430G tăng cường hexameri hóa vào các kháng thể này đã không ảnh hưởng đến sự gắn kết.

Fig. 3 thể hiện rằng kháng thể CD38 IgG1-A-E430G, nhưng không có IgG1-B-

E430G và IgG1-C-E430G, gắn kết phụ thuộc vào liều lượng với CD38 được biểu hiện trên PBMC của khỉ cynomolgus (A). Sự gắn kết trung bình với CD38 được biểu hiện trên tế bào B, T và NK của khỉ cynomolgus được mô tả, xác định dựa trên FSC và SSC. Là đối chứng dương, gắn kết với tế bào Daudi biểu hiện số lượng bản sao CD38 của người nhiều cũng được mô tả (B).

Ví dụ 3 – Độ gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC) bởi kháng thể CD38 đột biến ở E430G

CDC trên dòng tế bào khối u

Tế bào Daudi, Wien133, Ramos, NALM16, U266 và RC-K8 được tạo huyền phù lại trong RPMI chứa 0,2% BSA và được mạ thành các tấm đáy tròn 96 lỗ polystyren (Greiner bio-one) với mật độ 1×10^5 tế bào/lỗ (40 μ L/lỗ). Các kháng thể CD38, các biến thể của nó và đối chứng isotyp Abs được pha loãng theo huyết thanh (nồng độ kháng thể cuối cùng 0,0002-10 μ g/mL trong các dung dịch pha loãng nối tiếp 3x) và 40 μ L Ab pha loãng được thêm vào mỗi lỗ. Tế bào và Ab được ủ trước trong 20 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó, 20 μ L huyết thanh người bình thường gộp chung (Sanquin) được thêm vào mỗi lỗ và ủ thêm 45 phút ở 37°C. Sau đó, các đĩa được quay ly tâm (3 phút, 1200 vòng/phút) và phần nổi phía trên được loại bỏ. Các viên tế bào được gắn lại trong dung dịch đệm FACS được bổ sung topro-3 iodua 0,25 μ M (Life technologies), và quá trình phân giải được phát hiện bằng cách đo tỷ lệ phần trăm tế bào dương tính với iốt topro-3 trên FACS_Fortessa (BD). CDC được mô tả như phần trăm phân giải. Dữ liệu được hiển thị là N = 3 (Daudi và NALM16), N = 2 (tế bào Wien133 và U266) hoặc N = 1 (RC-K8 và Ramos). Các kháng thể kiểm soát isotyp chỉ được đưa vào tế bào Daudi và Wien133.

Fig. 4 chứng tỏ rằng kháng thể CD38 B, C và A mà không có đột biến E430G cảm ứng ~85, ~50 và 0 phần trăm phân giải tế bào Ramos và Daudi. Không thấy sự phân giải đáng kể nào bởi các kháng thể CD38 này đối với bất kỳ trong số các dòng tế bào được thử nghiệm khác. Việc đưa đột biến E430G vào các kháng thể CD38 này dẫn đến hoạt tính của CDC cao hơn ở nồng độ kháng thể thấp hơn đáng kể. Tất cả 3 kháng thể mang đột biến E430G đều gây ra sự phân giải tế bào Ramos và Daudi tới 100%. Ngoài ra, trên các dòng tế bào có biểu hiện CD38 thấp hơn, kháng thể CD38 đột biến E430G có thể cảm ứng CDC tối đa (Wien133) hoặc một phần (NALM16 và U266), trong khi

kháng thể CD38 không có đột biến E430G không cảm ứng CDC. Các kết quả này chứng minh rằng CD38 Ab với đột biến E430G cảm ứng CDC mạnh hơn và yêu cầu ít biểu hiện CD38 hơn so với kháng thể CD38 không có đột biến E430G. Trong tế bào khối u có mức độ biểu hiện CD38 thấp hơn (NALM-16, RS4; 11 và REH), IgG1-C-E430G thể hiện giá trị EC50 thấp hơn so với IgG1-B-E430G.

Bảng 3 EC50-giá trị phân giải.

Một số dòng tế bào được thử nghiệm chỉ một lần (Ramos, RS4;11, REH)

	Ramos	Daudi	Wien-133	NALM-16	U266	RS4;11	REH
B	0,126	0,183	0,199	-	-	-	-
B-E430G	0,019	0,018	0,013	0,075	-	0,243	0,054
C	0,158	0,250	0,193	-	-	-	-
C-E430G	0,014	0,019	0,015	0,022	0,052	0,056	0,017
A	-	-	-	-	-	-	-
A-E430G	0,133	0,206	0,271	-	-	-	-

Thử nghiệm CDC được mô tả ở trên được lặp lại với một số dòng tế bào khối u khác có nguồn gốc từ khối u tế bào B, bao gồm DLBCL, u lympho Burkitt, FL, MCL, B-ALL, CLL hoặc MM và các kháng thể IgG1-B, IgG1-B-E430G, IgG1-C-E430G, IgG1-A-E430G và kháng thể đối chứng isotyp. Phần trăm phân giải được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ kháng thể và phần trăm phân giải tối đa và giá trị EC50 được tính toán bằng phần mềm Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc; phiên bản 8.1,0) và được hiển thị trong bảng 4. Kết quả cũng được thể hiện trên Fig. 14.

Fig. 14 chứng tỏ rằng CD38 mAb IgG1-B kiểu đại cảm ứng sự phân giải của dòng tế bào biểu hiện CD38 cao; SU-DHL-8, Oci-Ly-7, Oci-Ly-19, Ramos, Daudi, Oci-Ly-18 và Raji, nhưng không đối với bất kỳ trong số các dòng tế bào khác mà biểu hiện ít phân tử CD38 trên màng. Việc đưa đột biến E430G vào IgG1-B dẫn đến hoạt tính CDC cao hơn ở nồng độ Ab thấp hơn đáng kể trên các dòng tế bào vốn đã nhạy cảm với loại IgG1-B đại và dẫn đến phân giải các dòng tế bào bổ sung có số lượng bản sao CD38

thấp hơn không nhạy cảm với IgG1 -B gây ra CDC (ví dụ, DOHH2, SU-DHL-4, WSU-DLCL2, Z-138, JVM-13, REH, Jeko-1, Wien-133, 697, RS4; 11, NALM-16 và JVM-3). Một số dòng tế bào có biểu hiện CD38 rất thấp (RC-K8 và Pfeiffer) hoặc biểu hiện CD59 rất cao (DB và Granta-519) không bị phân giải khi tiếp xúc với IgG1-B và IgG1-B-E430G. Trên hầu như tất cả các dòng tế bào được thử nghiệm, IgG1-C-E430G gây ra sự phân giải tế bào ở nồng độ kháng thể thấp hơn so với IgG1-B-E430G, trong khi IgG1-A-E430G gây ra sự phân giải ở nồng độ Ab cao hơn nhiều. Điều này cũng được phản ánh bởi giá trị EC50 cao hơn đối với IgG1-A-E430G trong bảng 4. Điều này chứng tỏ rằng mAbs CD38 đột biến E430G tạo ra CDC mạnh hơn so với các kháng thể CD38 kiểu đại và tạo ra CDC trên các tế bào khối u có mức biểu hiện CD38 thấp hơn, trong đó loại kháng thể CD38 không cảm ứng CDC. Hơn nữa, hiệu lực của kháng thể CD38 đột biến E430G để tạo ra CDC có thể khác nhau giữa các dòng kháng thể nhắm mục tiêu CD38 khác nhau.

Fig. 15 thể hiện tóm tắt một số giá trị EC50 được mô tả trong bảng 4. Giá trị EC50 của CDC được tạo ra bởi các kháng thể IgG1-B, IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G trên 20 dòng tế bào khối u tế bào B khác nhau được hiển thị. Mỗi hình vuông, tam giác hoặc hình tròn đại diện cho dòng tế bào khối u tế bào B khác. Giá trị EC50 thu được với dòng tế bào AML không được bao gồm vì IgG1-B-E430G không được thử nghiệm trên dòng tế bào AML.

CDC bằng IgG1-C-E430G cũng được đánh giá dựa trên sự lựa chọn dòng tế bào bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (AML) (Fig. 16). Nó được thực hiện như mô tả ở trên đối với dòng tế bào khối u tế bào B với sự khác biệt duy nhất là (các) dòng tế bào khối u.

Fig. 16 chứng tỏ rằng CDC được cảm ứng bởi IgG1-C-E430G ở tất cả các dòng tế bào AML biểu hiện CD38, trong khi CDC không quan sát được trong dòng tế bào AML âm tính với CD38. CDC bởi IgG1-C-E430G xuất hiện ở giá trị EC50 thấp hơn nhiều so với IgG1-B, trong khi phân giải tế bào cực đại cao hơn đối với IgG1-C-E430G so với IgG1-B (bảng 4).

Bảng 4 phân giải tối đa và giá trị phân giải EC50

IgG1-C-E430G	IgG1-B	IgG1-B-E430G
--------------	--------	--------------

dòng tế bào	EC50 ug/mL	% phân giải tối đa	% phân giải tối thiểu	EC50 ug/mL	% phân giải tối đa	% phân giải tối thiểu	EC50 ug/mL	% phân giải tối đa	% phân giải tối thiểu	N
SU-DHL-8	0,009	100,0	35,4	0,040	99,8	22,8	0,009	100,0	31,0	3
Oci-Ly-7	0,012	99,2	21,0	0,138	91,7	18,1	0,027	98,9	19,4	3
Oci-Ly-19	0,031	100,0	23,4	0,091	98,8	24,6	0,032	100,0	27,4	3
Ramos	0,013	99,5	25,0	0,108	94,0	17,1	0,020	99,3	19,4	3
Daudi	0,030	96,5	17,9	0,307	89,5	11,3	0,026	96,7	19,1	4
Oci-Ly18	0,057	92,5	24,5	0,212	83,3	17,3	0,088	92,3	18,8	3
Raji	0,036	83,8	18,4	0,171	65,8	18,6	0,088	87,1	17,8	4
DOHH2	0,115	50,3	19,2	0,874	29,4	19,4	0,399	49,7	20,9	3
SU-DHL-4	0,073	75,5	12,0	ND	23,5	12,5	0,165	76,6	11,8	3
WSU-DLCL2	0,345	65,9	6,3	ND	7,8	8,3	0,577	67,6	7,7	1
Z-138	0,106	41,2	20,6	4,327	28,1	19,5	0,190	38,0	21,2	1
JVM-13	0,146	43,6	13,3	0,769	30,5	13,3	0,458	44,5	13,3	3
REH	0,039	58,3	22,4	0,232	30,6	18,0	0,112	58,1	19,2	3
Jeko-1	0,108	61,6	5,5	0,833	13,2	9,3	0,302	51,5	8,1	2
Wien133	0,015	96,0	8,2	0,199	13,2	7,0	0,013	97,4	7,9	2
697	0,087	57,6	10,9	ND	ND	ND	0,308	65,6	11,1	3
Granta-519	ND	17,4	13,5	ND	15,5	77,8	ND	16,7	13,1	3
RS4;11	0,093	33,9	9,8	ND	14,1	9,9	0,328	29,9	10,1	3
DB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1
NALM-16	0,022	60,9	10,1	0,193	16,2	9,4	0,075	58,6	9,7	3

JVM-3	0,110	42,5	11,6	0,245	19,0	12,8	0,287	40,2	12,2	2
U266	0,052	32,5	9,6	3,889	19,1	10,8	ND	ND	8,7	2
RC-K8	ND	ND	6,6	ND	7,7	ND	ND	8,2	8,6	1
Pfeiffer	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2
THP-1	0,075	81,5	12,6	0,051	42,4	6,1	NT	NT	NT	3
Oci-AML3	0,046	90,4	0,0	1,485	26,1	0,0	NT	NT	NT	3
monomac6	0,093	83,9	14,0	0,053	54,1	0,0	NT	NT	NT	3
KG-1	0,104	77,7	0,0	1,401	26,2	2,0	NT	NT	NT	3
ML-2	0,023	99,6	5,1	0,414	95,4	0,0	NT	NT	NT	3
U937	0,057	68,6	0,0	0,140	34,3	0,0	NT	NT	NT	2
Nomo-1	0,039	95,9	6,7	1,937	28,4	1,9	NT	NT	NT	3
MEGAL	0,170	30,1	0,7	ND	ND	ND	NT	NT	NT	3
AML-193	0,032	89,5	0,8	ND	ND	ND	NT	NT	NT	2
MOLM-13	0,017	92,0	0,0	0,290	32,5	9,8	NT	NT	NT	3
HL-60	0,070	52,5	0,0	4,519	10,2	0,0	NT	NT	NT	3
Oci-M1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NT	NT	NT	1

Việc đưa CDC bằng kháng thể CD38 kiểu đại và đột biến E430G sử dụng tế bào điều hòa T cũng được xác định. Tế bào điều hòa T được tạo ra như được mô tả trong ví dụ 8 (Trogocytosis của CD38 từ các tế bào điều hòa T) và được thử nghiệm trong một xét nghiệm CDC như đã mô tả ở trên đối với các dòng tế bào khối u. Phần trăm phân giải được thể hiện trên Fig. 17 cùng với giá trị EC50.

Fig. 17 chứng tỏ rằng IgG1-B cảm ứng hầu như không phân giải tế bào điều hòa T; trong khi IgG1-B-E430G và IgG1-C-E430G gây ra sự phân giải tế bào điều hòa T, trong đó IgG1-C-E430G cho thấy giá trị EC50 thấp hơn so với IgG1-B-E430G.

CDC trong toàn bộ máu

Toàn bộ máu từ người cho khỏe mạnh được thu thập trong ống hirudin để ngăn đông máu mà không ảnh hưởng đến nồng độ canxi sinh lý (cần thiết cho CDC). 50 μL /lỗ được mạ vào đĩa nuôi cấy mô đáy phẳng 96 lỗ (Greiner bio-one). Các kháng thể CD38, các biến thể của chúng và Abs đối chứng được pha loãng theo thứ tự trong RPMI có chứa 0,2% BSA (nồng độ kháng thể cuối cùng 0,016-10/g/mL trong các dung dịch pha loãng nối tiếp 5x) và 50 μL Ab pha loãng được thêm vào mỗi lỗ và ủ qua đêm ở 37°C. Là một đối chứng dương tính đối với CDC trên tế bào B, CD20 Ab IgG1-7D8 được thử nghiệm có và không có eculizumab 60/g/mL để ngăn chặn CDC. Tế bào được chuyển sang đĩa đáy tròn 96 lỗ polystyrene (Greiner bio-one, ly tâm), ly tâm (3 phút, 1200 vòng/phút) và rửa một lần với 150 μL PBS (B.Braun) cho mỗi lỗ. Các viên tế bào được tạo huyền phù lại trong 80 μL PBS với thuốc nhuộm khả năng sống phản ứng amin pha loãng 1000 lần (BD) và được ủ 30 phút ở 4°C. Tiếp theo, tế bào được rửa bằng 150 μL PBS và ủ bằng 80 μL PBS chứa hỗn hợp kháng thể định hình kiểu tế bào lympho (CD3-EF450 kháng người của chuột 1:200 [OKT3, ebioscience], CD19-BV711 kháng người của chuột 1:50 [HIB19, Biolegend] và CD56-PE/CF594 kháng người của chuột 1:100 [NCAM16.2, BD]) trong 30 phút ở 4°C. Tế bào được rửa bằng 150 μL PBS và ủ 10 phút ở 4°C với 150 μL dung dịch phân giải hồng cầu (10 mM KHCO_3 [Sigma], 0,01 mM EDTA [Fluka], 155 mM NH_4Cl [Sigma] hòa tan trong 1 L H_2O [B.Braun] và điều chỉnh đến độ pH 7,2). Tế bào được rửa bằng 150 μL dung dịch đệm FACS, được tạo huyền phù lại trong 100 μL dung dịch đệm FACS và được phân tích trên FACS_Fortessa (BD). Số lượng tế bào NK có thể tồn tại ($\text{CD}56^{\text{pos}}$, $\text{CD}3^{\text{neg}}$ và dye^{neg} có thể tồn tại phản ứng amin), tế bào T ($\text{CD}3^{\text{pos}}$ và dye^{neg} có thể tồn tại phản ứng amin) và tế bào B ($\text{CD}19^{\text{pos}}$ và dye^{neg} có thể tồn tại phản ứng amin) được mô tả trong Fig. 5. Dữ liệu được thể hiện từ 1 người cho đại diện trong số 5 người được thử nghiệm.

Fig. 5 chứng tỏ rằng kháng thể CD38 chứa đột biến E430G cảm ứng CDC tối thiểu hoặc tế bào lympho máu khỏe mạnh. CD20 Ab IgG1-7D8 đối chứng dương tính chứng minh CDC đặc hiệu của tế bào B dương tính với CD20, bị chặn hoàn toàn bởi chất ức chế CDC eculizumab. Kháng thể IgG1 CD38 kiểu đại không tạo ra CDC của tế bào B, T và NK. Một số CDC được quan sát thấy đối với tế bào NK sau khi ủ với các

dòng vô tính B và C có chứa đột biến E430G (khoảng 40% phân giải tế bào NK ở nồng độ cao nhất bằng IgG1-B-E430G), nhưng không phải tế bào B và T.

Nói chung, các kết quả này chỉ ra rằng kháng thể CD38 đột biến E430G có hoạt tính CDC rộng chống lại một nhóm các dòng tế bào khối u có biểu hiện CD38 thay đổi. Các kháng thể CD38 với đột biến E430G cũng được thử nghiệm chống lại các tế bào lympho thu được từ những người hiến tặng khỏe mạnh và được chứng minh là chỉ gây ra sự phân giải tới 40% tế bào NK. Tế bào NK biểu hiện trung bình 15000 CD38/tế bào, tương tự với dòng tế bào MM U266. Cả hai loại tế bào đều nhạy cảm như nhau với CDC bởi kháng thể CD38 đột biến E430G, cho thấy rằng kháng thể CD38 đột biến CDC bởi E430G có tương quan với sự biểu hiện CD38. Không bị giới hạn về mặt lý thuyết, dựa trên những dữ liệu này, người ta tin rằng ngưỡng đối với CDC do kháng thể CD38 đột biến E430G đặt khoảng 15000 phân tử CD38/tế bào. Trong khi hầu hết các dòng tế bào khối u tế bào B biểu hiện mức CD38 cao hơn, dao động từ 15000 - 400000 phân tử CD38/tế bào, các tế bào lympho khỏe mạnh chỉ biểu hiện 2000 - 15000 phân tử CD38/tế bào, điều này làm cho các tế bào này ít bị tổn thương hơn bởi CDC bằng kháng thể CD38 đột biến E430G.

Ví dụ 4 – Gây độc tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) bằng kháng thể CD38 đột biến E430G

Khả năng của kháng thể CD38 đột biến E430G cảm ứng gây độc tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) được xác định bằng thử nghiệm giải phóng crom. Tế bào Daudi được thu thập (5×10^6 tế bào/mL) trong môi trường nuôi cấy 2 mL (RPMI 1640 bổ sung 0,2% BSA), trong đó 100 μCi ^{51}Cr (Chromium - 51; PerkinElmer) đã được thêm vào. Các tế bào được ủ trong nồi cách thủy ở 37°C trong 1 giờ trong khi lắc. Sau khi rửa các tế bào (hai lần trong PBS, 1500 vòng/phút, 5 phút), các tế bào được tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi cấy và được đếm bằng phương pháp loại trừ màu xanh trypan. Các tế bào được pha loãng đến mật độ 1×10^5 tế bào/mL và được pipet vào đĩa microtiter đáy tròn 96 lỗ (Greiner Bio-One), và 50 μL của chuỗi nồng độ (0,005-10 $\mu\text{g/mL}$ nồng độ cuối cùng trong 3 lần pha loãng) CD38 hoặc kháng thể đối chứng isotyp, được pha loãng trong môi trường nuôi cấy được thêm vào. Tế bào được ủ sơ bộ với Ab ở nhiệt độ phòng (RT) trong 15 phút.

Trong lúc ấy, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ người tình nguyện khỏe mạnh (Sanquin) được phân lập từ 45 mL máu heparin mới rút (áo khoác đệm) bằng cách sử dụng môi trường phân tách tế bào lympho (Bio Whittaker) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi tạo huyền phù lại tế bào trong môi trường nuôi cấy, tế bào được đếm bằng cách loại trừ màu xanh trypan và được pha loãng đến mật độ 1×10^7 tế bào/mL.

Sau khi ủ sơ bộ tế bào đích bằng Ab, 50 μ L tế bào tác động được bổ sung, dẫn đến tỷ lệ tế bào tác động với tế bào đích là 100: 1. Tế bào được ủ trong 4 giờ ở 37°C và 5% CO_2 . Để xác định độ phân giải tối đa, 50 μ L tế bào Daudi đánh dấu ^{51}Cr (5000 tế bào) được ủ với 100 μ L Triton-X100 5%; để xác định phân giải tự phát (phân giải nền), 5000 tế bào Daudi đánh dấu ^{51}Cr được ủ trong 150 μ L môi trường mà không có kháng thể hoặc tế bào tác động bất kỳ. Mức phân giải tế bào không phụ thuộc vào kháng thể được xác định bằng cách ủ 5000 tế bào Daudi với 500000 PBMC không có kháng thể. Các đĩa được quay ly tâm (1200 vòng/phút, 10 phút) và 75 μ L dịch nổi bề mặt được chuyển vào các ống micron, sau đó ^{51}Cr đã giải phóng được đếm sử dụng máy đếm gamma. Phần trăm phân giải qua trung gian kháng thể được tính như sau:

% phân giải cụ thể = $(\text{cpm mẫu} - \text{cpm phân giải tự phát}) / (\text{phân giải tối đa cpm} - \text{phân giải tự phát cpm})$ trong đó cpm được tính mỗi phút.

Fig. 6 thể hiện rằng tất cả các CD38 Ab có thể cảm ứng sự phân giải của Daudi, như được chỉ ra bởi sự tăng phân giải được thấy đối với CD38 Abs so với đối chứng isotyp (IgG1-b12-E430G). Sự phân giải tế bào ở nồng độ kháng thể thấp nhất đã được ghi nhận, cho thấy rằng các kháng thể nên được pha loãng thêm để quan sát hiệu ứng phụ thuộc vào liều lượng. Các kháng thể CD38 có chứa đột biến E430G cho thấy khả năng phân giải tối đa thấp hơn so với kiểu đại kháng thể.

Thử nghiệm giải phóng crom ở trên được lặp lại với các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi từ các tình nguyện viên khỏe mạnh khác nhau (tế bào hiệu ứng), các tế bào đích sau: Daudi, Wien-133, Granta 519 và MEC-2, và với các kháng thể IgG1-B-E430G, IgG1-B, IgG1-C-E430G, IgG1-C và IgG1-b12-E430G. Kết quả được hiển thị trong Fig. 18.

Fig. 18 thể hiện rằng tất cả các CD38 Ab có thể cảm ứng sự phân giải của tế bào Daudi, Wien-133, Granta 519 và MEC-2 như được chỉ ra bởi sự tăng phân giải được

thấy đối với CD38 Abs so với đối chứng isotyp (IgG1-b12-E430G). Trong hầu hết các trường hợp đã thấy phân giải tế bào đích phụ thuộc vào liều lượng, nhưng một số khác biệt được quan sát thấy giữa các nhà tài trợ PBMC khác nhau.

Khả năng của kháng thể CD38 cảm ứng ADCC còn được đánh giá bằng cách sử dụng xét nghiệm sinh học báo cáo ADCC phát quang (Promega, Cat # G7018) phát hiện liên kết chéo Fc γ RIIIa (CD16), làm đại diện cho ADCC. Là tế bào tác động, bộ dụng cụ cung cấp các tế bào T của người Jurkat được thiết kế để biểu hiện ổn định Fc γ RIIIa (V158) có ái lực cao và yếu tố hạt nhân của tế bào T hoạt hóa (NFAT)-yếu tố phản ứng thúc đẩy sự biểu hiện của luciferaza đom đóm. Ngắn gọn là, tế bào điều hòa T hoặc Daudi (5000 tế bào/lỗ) được gieo giống trong Optiplate màu trắng 384 lỗ (Perkin Elmer) trong dung dịch đệm thử nghiệm ADCC [môi trường RPMI-1640 (Lonza, Cat # BE12-115F) được bổ sung huyết thanh IgG thấp 3,5%] và ủ trong 6 giờ ở 37°C/CO₂ 5% trong tổng thể tích 30 μ L chứa chuỗi nồng độ kháng thể (nồng độ cuối cùng 0,5-250 ng/mL trong dung dịch pha loãng 3,5 lần) và rửa đông tế bào tác động thử nghiệm sinh học ADCC. Sau khi điều chỉnh đĩa trong 15 phút về nhiệt độ phòng (RT), 30 μ L thuốc thử luciferaza thử nghiệm Bio Glo được bổ sung và đĩa được ủ trong 5 phút ở RT. Việc sản xuất luciferaza được định lượng bằng cách đọc phát quang trên EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer). Mức nền được xác định từ lỗ mà chỉ tế bào đích và kháng thể (không có tế bào tác động) được bổ sung. Là đối chứng âm, lỗ chỉ chứa tế bào đích và tế bào tác động (không có kháng thể) được sử dụng.

Fig. 7 thể hiện kết quả thu được với tế bào Daudi, thể hiện rằng kháng thể CD38 có hiệu quả cao trong việc cảm ứng liên kết ngang Fc γ RIIIa phụ thuộc vào liều lượng như được xác định trong thử nghiệm chỉ thị. Các kháng thể CD38 chứa đột biến E430G thể hiện liên kết ngang tối đa thấp hơn so với kháng thể kiểu đại tương ứng, phù hợp với kết quả thu được đối với thử nghiệm giải phóng crom.

Fig. 19 thể hiện kết quả thu được với tế bào điều hòa T, thể hiện rằng kháng thể CD38 có hiệu quả cao trong việc cảm ứng liên kết ngang Fc γ RIIIa phụ thuộc vào liều lượng như được xác định trong thử nghiệm chỉ thị. Các kháng thể CD38 chứa đột biến E430G thể hiện liên kết ngang tối đa thấp hơn so với kháng thể kiểu đại tương ứng.

Ví dụ 5 – Thử nghiệm tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP) bằng kháng thể

CD38 đột biến E430G

Khả năng của kháng thể CD38 đột biến E430G cảm ứng thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể được phỏng theo Overdijk M.B. et al. mAbs 7: 2,311-320. Các đại thực bào thu được bằng cách phân lập PBMC từ người tình nguyện khỏe mạnh (Sanquin) sử dụng môi trường phân tách tế bào lympho (Bio Whittaker) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Từ PBMC, bạch cầu đơn nhân được phân lập thông qua chọn lọc âm tính, sử dụng bộ kit phân lập Dynabeads Untouched Human Monocyte (Invitrogen). Các tế bào đơn nhân phân lập được nuôi cấy 3 ngày trong môi trường tế bào tua gai không có huyết thanh (CellGenix GmbH) được bổ sung 50 ng/mL GM-CSF (Invitrogen), sau đó là 2 ngày trong môi trường tế bào tua gai không có huyết thanh được bổ sung 100 ng/mL GM-CSF, để cảm ứng sự biệt hóa của đại thực bào. Các đại thực bào đã biệt hóa được tách ra bằng cách sử dụng versene (Life Technologies) và nạo tế bào và được đặc trưng bởi phép đo dòng chảy để nhuộm với CD1a-FITC (BD), CD14-PE/Cy7 (BD), CD40-APC/H7 (BD), CD80-APC (Miltenyi biotec), CD83-PE (BD) và CD86-PerCP-Cy5.5 (Biolegend). Các đại thực bào được gieo giống ở 100000 tế bào mỗi lỗ vào đĩa nuôi cấy đáy phẳng 96 lỗ (Greiner bio-one) và để bám dính qua đêm ở 37°C trong môi trường tế bào đuôi gai không có huyết thanh được bổ sung 100 ng/mL GM-CSF.

Tế bào đích (Daudi) được đánh dấu PKH-26 (Sigma) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, được opsonin hóa với 10µg/mL kháng thể CD38 (30 phút ở 4°C), rửa ba lần bằng dung dịch đệm FACS và bổ sung vào đại thực bào theo tỷ lệ tế bào tác động:đích (E:T) là 5:1. Đĩa được quay nhanh ở tốc độ 300 vòng/phút để đưa tế bào tác động và tế bào đích vào gần nhau và ủ 45 phút ở 37°C. Tiếp theo, đại thực bào được thu thập bằng cách sử dụng versene và nhuộm bằng CD14-BV605 (biolegend) và CD19-BV711 (biolegend). Thực bào được mô tả là phần trăm đại thực bào dương tính với CD14 mà cũng dương tính với PKH-26, nhưng âm tính với CD19 (để loại trừ đại thực bào chỉ gắn vào tế bào Daudi), được đo bằng máy đo đếm tế bào theo dòng chảy (BD).

Fig. 8 thể hiện rằng tất cả các CD38 Ab có thể cảm ứng ADCP của tế bào Daudi, như được chỉ ra bởi tỷ lệ phần trăm tăng của đại thực bào PKH-29^{pos}, CD14^{pos} và CD19^{neg} được thấy đối với CD38 Ab so với đối chứng isotyp (IgG1-b12 và IgG1-b12-E430G). Tùy thuộc vào thể cho được sử dụng, kháng thể CD38 chứa đột biến E430G

thể hiện tỷ lệ phần trăm đại thực bào PKH-29^{pos}, CD14^{pos} và CD19^{neg} cao hơn so với kháng thể kiểu đại, biểu thị thực bào qua trung gian CD38-Ab có thể được tăng bằng cách đưa vào đột biến E430G.

Ví dụ 6 – Cảm ứng chết theo chương trình bằng kháng thể CD38 trên dòng tế bào khối u

Cảm ứng chết theo chương trình bằng kháng thể CD38 được khảo sát bằng cách ủ qua đêm dòng tế bào khối u với kháng thể CD38, sau đó là phân tích sống/chết trên máy đo dòng chảy. Các tế bào, được tạo huyền phù lại trong RPMI chứa BSA 0,2%, được gieo giống ở 100000 tế bào/lỗ trong đĩa nuôi cấy mô đáy phẳng 96 lỗ (Greiner bio-one). Các dung dịch pha loãng nối tiếp (0,01-10 μ g/mL nồng độ kháng thể cuối cùng trong 4 lần pha loãng nối tiếp) của CD38 hoặc kháng thể đối chứng được bổ sung vào khi không có hoặc có mặt 10 μ g/mL IgG1 kháng người của dê (Jackson) để cung cấp liên kết ngang Fc bổ sung. Tế bào được ủ qua đêm ở 37°C, rửa/ly tâm hai lần sử dụng dung dịch đệm FACS (PBS/BSA 0,1%/Na-Azit 0,01%), và được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm FACS bổ sung Topro-3-iodin pha loãng 1: 4000 (Life Technologies). Khả năng tồn tại của tế bào được phân tích trên FACS_Fortessa (BD) và được mô tả dưới dạng phần trăm tế bào chết theo chương trình (dương tính với topro-3-iodin).

Fig. 9 thể hiện rằng kháng thể CD38 kiểu đại và đột biến E430G đã không cảm ứng chết theo chương trình một mình, nhưng việc bổ sung kháng thể liên kết ngang Fc dẫn đến khoảng 30% chết theo chương trình. Không có sự khác biệt nào được thấy giữa kháng thể CD38 kiểu đại và đột biến E430G.

Ví dụ 7 – Ước chế hoạt tính enzym CD38 khi vắng mặt PBMC

Ước chế hoạt tính CD38 xyclaza

CD38 là enzym ngoại bào chuyển đổi NAD thành cADPR và ADPR. Các hoạt động này phụ thuộc vào sự có mặt của H₂O. Khi có mặt H₂O, NAD được chuyển thành ADPR (hoạt động của glycohydrolase) và cADPR được chuyển thành ADPR (hoạt động của hydrolase). Khoảng 95% NAD được chuyển thành ADPR thông qua hoạt động của hydrolase (glyco). Khi không có H₂O, CD38 biến NAD thành cADPR bằng cách sử dụng hoạt tính cyclase của nó. Để đo sự ức chế hoạt động của enzym CD38, người ta sử dụng các dẫn xuất NAD trở nên huỳnh quang sau khi được xử lý bởi CD38.

Fig. 10 minh họa hoạt tính enzym của CD38.

Đầu tiên, ức chế hoạt tính CD38 xyclaza được đo sử dụng muối nicotinamit guanin dinucleotit natri phosphodiesteraza (NGD, Sigma) làm cơ chất cho CD38. Là nguồn CD38, dòng tế bào khối u với các mức biểu hiện CD38 khác nhau được sử dụng cũng như miền ngoại bào đánh dấu his tái tổ hợp của CD38 (hisCD38). Tế bào khối u (Daudi và Wien133) được thu hoạch và rửa bằng 20 mM Tris-HCL. Tế bào được tiếp tục lại trong 20 mM Tris-HCL và 200000 tế bào/lỗ được cấy trong đĩa trắng đục 96 lỗ (PerkinElmer) ở 100 μ L/lỗ. HisCD38 được gieo ở 0,6 μ g/mL trong 100 μ L/lỗ 20 mM Tris-HCL. Kháng thể CD38 được pha loãng thành 100 μ g/mL trong 20 mM Tris-HCL và 10 μ L được thêm vào tế bào và hisCD38 (nồng độ cuối cùng là 9 μ g/mL) và ủ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Các lỗ đối chứng được ủ với kháng thể b12 thay vì kháng thể CD38, hoặc hoàn toàn không có kháng thể. Tiếp theo, 10 μ L (80 μ M) NGD được pha loãng trong 20 mM Tris-HCL được thêm vào tấm và huỳnh quang ngay lập tức được đo trên đầu đọc đa nhãn Envision (PerkinElmer) sử dụng kích thích 340nm và phát xạ 430nm. Việc chuyển đổi NGD được thực hiện theo thời gian thực, bằng cách đo huỳnh quang tại các điểm thời gian được chỉ định trong Fig. 11 cho đến khi đạt được mức ổn định. Đối với hisCD38, huỳnh quang được đo 3 phút một lần trong 27 phút, đối với tế bào Daudi, huỳnh quang được đo sau 5, 15, 30, 60, 120 và 185 phút và đối với Wien133, huỳnh quang được đo sau 5, 15, 30, 60, 150, 220, 300 và 360 phút. Sự ức chế hoạt động của CD38 xyclaza được mô tả là phần trăm ức chế so với đối chứng, trong đó đối chứng là mẫu có hisCD38 và NGD, nhưng không có Ab. Một thử nghiệm đại diện được mô tả cho mỗi điều kiện được thử nghiệm.

Fig. 11A chứng tỏ rằng NGD được chuyển đổi nhanh chóng thông qua hoạt tính xyclaza của hisCD38. Quá trình chuyển đổi hoàn tất sau khoảng 9 phút. Khi có CD38 Ab B, phần trăm chuyển đổi NGD tối đa đã giảm ~ 25%, khi có CD38 Ab C, phần trăm chuyển đổi NGD tối đa đã giảm ~ 50%, trong khi CD38 Ab A không ảnh hưởng đến tổng doanh thu của NGD. Sự ức chế hoạt động của CD38 xyclaza không bị ảnh hưởng bởi sự hiện diện của đột biến E430G. Các kết quả tương tự cũng được thấy trong Fig. 11B và Fig. 11C, trong đó sự chuyển đổi NGD của CD38 hiện diện trên các tế bào Daudi và Wien133 được đo. Động học của quá trình chuyển đổi NGD chậm hơn một chút trên các tế bào Daudi và đặc biệt là Wien133, điều này có thể liên quan đến ít phân tử CD38

hơn. Tuy nhiên, 25% ức chế hoạt động CD38 xyclaza được gây ra bởi Ab B (~ 25% ức chế) và ~ 40% ức chế hoạt động CD38 xyclaza được gây ra bởi Ab C, trong khi Ab A không cho thấy hiệu quả. Các kháng thể kiểu đại và kháng thể đột biến E430G cho kết quả tương tự, cho thấy rằng đột biến E430G không ảnh hưởng đến sự ức chế qua trung gian kháng thể của hoạt tính CD38 xyclaza.

Ví dụ 8 – Trogocytosis phụ thuộc vào kháng thể bằng Kháng thể CD38 đột biến E430G

Trogocytosis bằng kháng thể CD38 đột biến E430G trên tế bào Daudi:

Khả năng của kháng thể CD38 đột biến E430G cảm ứng trogocytosis trên tế bào Daudi đã được đánh giá. Các đại thực bào thu được bằng cách phân lập PBMC từ những người tình nguyện khỏe mạnh (Sanquin) bằng cách sử dụng môi trường phân tách tế bào lympho (Bio Whittaker) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Từ PBMC, bạch cầu đơn nhân được phân lập thông qua chọn lọc âm tính, sử dụng bộ phân lập tế bào đơn nhân không bị ảnh hưởng của Dynabeads (Invitrogen). Các tế bào đơn nhân phân lập được nuôi cấy 3 ngày trong môi trường tế bào tua gai không có huyết thanh (CellGenix GmbH) được bổ sung 50 ng/mL GM-CSF (Invitrogen), sau đó là 2 ngày trong môi trường tế bào tua gai không có huyết thanh được bổ sung 100 ng/mL GM-CSF, để tạo ra sự biệt hóa của đại thực bào. Các đại thực bào đã biệt hóa được tách ra bằng cách sử dụng các câu (Life Technologies) và nạo tế bào và được đặc trưng bởi phép đo dòng chảy để nhuộm với CD1a-FITC (BD), CD14-PE/Cy7 (BD), CD40-APC/H7 (BD), CD80-APC (Miltenyi biotec), CD83-PE (BD) và CD86-PerCP-Cy5.5 (Biolegend). Các đại thực bào được cấy giống ở 100.000 tế bào mỗi lỗ vào đĩa nuôi cấy đáy phẳng 96 lỗ (Greiner bio-one) và để kết dính qua đêm ở 37°C trong môi trường tế bào đuôi gai không có huyết thanh được bổ sung 100 ng/mL GM-CSF.

Tế bào đích (Daudi) được dán nhãn bằng PKH-26 (Sigma) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, được opso hóa bằng 10 µg/mL kháng thể CD38 (30 phút ở 4°C), được rửa ba lần bằng dung dịch đệm FACS và được bổ sung vào đại thực bào theo tỷ lệ tế bào tác động:đích (E:T) là 5:1. Đĩa được quay nhanh ở tốc độ 300 vòng/phút để đưa tế bào tác động và tế bào đích đến gần nhau và ủ trong 45 phút ở 37°C.

Fig. 21 minh họa cài đặt thử nghiệm được sử dụng để đo trogocytosis.

Biểu hiện CD38 và nhuộm IgG của người được xác định trên tế bào Daudi bằng cách ủ với FITC-CD38 dòng A liên hợp với FITC và IgG-FITC kháng người dê (Southern Biotech) tương ứng. Bản sao CD38 A được sử dụng để nhuộm CD38 vì Ab này nhận ra một epitop không chồng chéo trên CD38 so với bản sao B và C.

Fig. 12 thể hiện rằng biểu hiện CD38 trên tế bào Daudi đã giảm đáng kể sau 45 phút đồng nuôi cấy với đại thực bào và kháng thể CD38. Sự giảm biểu hiện CD38 là mạnh nhất với kháng thể CD38 đột biến E430G. Xu hướng tương tự cũng được thấy đối với nhuộm IgG của người trên tế bào Daudi opsonin hóa kháng thể.

Trogocytosis bằng kháng thể CD38 đột biến E430G trên tế bào điều hòa T:

Tế bào điều hòa T (Treg) với biểu hiện CD38 cao ức chế miễn dịch nhiều hơn so với Treg có biểu hiện CD38 trung gian (Krejci J. et al. Blood 2016 128: 384-394). Do đó, các chiến lược để giảm biểu hiện CD38 trên Treg có thể làm giảm tác dụng ức chế miễn dịch của các tế bào này. Các tác giả sáng chế đã điều tra xem liệu kháng thể CD38 đột biến E430G có thể làm giảm biểu hiện CD38 trên Treg thông qua quá trình phân tích tế bào máu hay không. Treg được phân lập từ PBMC từ người tình nguyện khỏe mạnh (Sanquin) bằng cách sử dụng môi trường phân tách tế bào lympho (Bio Whittaker) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Từ PBMC, các tế bào T CD4 + được phân lập thông qua chọn lọc âm tính, sau đó được làm giàu cho các tế bào điều hòa CD4 + CD25 + T, sử dụng bộ phân lập Treg (Miltenyi) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, Treg được mở rộng ở 5×10^4 tế bào/mL trong môi trường tế bào đuôi gai không có huyết thanh được bổ sung 5% huyết thanh người (Sigma), 1000 U/mL IL-2 (peprotech), 100 ng/mL rapamycin (Sigma) và CD3/CD28 hạt phủ (Gibco) với tỷ lệ hạt: tế bào là 4: 1 trong 20 ngày ở 37°C . Cứ sau 3 đến 4 ngày, mật độ tế bào được điều chỉnh thành 5×10^5 tế bào/mL bằng cách sử dụng môi trường tế bào đuôi gai không có huyết thanh được bổ sung 1000 U/mL IL-2 và 100 ng/mL rapamycin. Kiểu hình điều chỉnh T được theo dõi theo thời gian bằng cách sử dụng phương pháp nhuộm tế bào dòng chảy với các kháng thể sau: CCR7-BV785 (Biolegend), CD62L-FITC (BD), CD4-APC/efluor780 (e-biosciences), CD25-PerCP/Cy5 (Biolegend), Foxp3-PE/CF594 (BD), CTLA4-efluor660 (e-biosciences), CD127-PE/CY7 và CD38-GV605 (Biolegend).

Để đánh giá trogocytosis cảm ứng Ab của CD38 từ Treg, Treg (tế bào đích) được đồng nuôi cấy bằng PBMC (tế bào tác động) và biểu hiện CD38 đã được theo dõi trên Treg. Tóm lại: PBMCs được phân lập từ áo khoác đệm (Sanquin) bằng cách sử dụng môi trường tách tế bào lympho (Bio Whittaker) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được gieo hạt trong môi trường RPMI-1640 (Lonza) bổ sung 0,2% BSA với mật độ 5×10^5 tế bào mỗi lỗ và được nuôi cấy 3 ngày để các bạch cầu đơn nhân bám vào. Tre được gắn nhãn với 0,25 μ M CellTrace đỏ (CTFR) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được ủ trước với E430G CD38 Ab đột biến trong 10 phút ở 37°C. Treg được rửa sạch và 1×10^5 tế bào Ab-opsonized trên mỗi lỗ được chuyển vào đĩa với PBMC. PBMC và Treg được quay một thời gian ngắn với tốc độ 300 vòng/phút để đưa các tế bào vào gần nhau và ủ trong 23 giờ ở 37°C. Trogocytosis của CD38 được đo bằng cách phân tích biểu hiện của CD38 với CD38 được liên hợp với FITC dòng A trên Treg dương tính với CTFR với phương pháp đo tế bào dòng chảy.

Fig. 13 thể hiện rằng biểu hiện CD38 ở tế bào điều hòa T được giảm sau khi ủ bằng kháng thể CD38 đột biến E430G và PBMC. Không có PBMC, không thấy giảm biểu hiện CD38 trên tế bào điều hòa T, gợi ý rõ ràng về hiện tượng nhiễm tế bào trogocytosis. Hơn nữa, với sự hiện diện của PBMC, IgG1-B không gây ra quá trình trao đổi tế bào của CD38, trong khi sự giảm mạnh biểu hiện CD38 được gây ra bởi E430G bị đột biến B và C. Điều này cho thấy rằng các kháng thể CD38 đột biến E430G gây ra trogocytosis CD38 tăng cường.

Ví dụ 9: Hoạt tính chống khối u của kháng thể CD38 đột biến E430G C ở mẫu u bạch huyết tế bào B lớn lan tỏa có nguồn gốc từ bệnh nhân

Tế bào u bạch huyết tế bào B lớn khuếch tán (DLBCL) có nguồn gốc từ bệnh nhân được cấy dưới da ở chuột CB17.SCID và điều trị bằng kháng thể (2 liều hàng tuần 5 mg/kg IgG1-C-E430G, được tiêm vào tĩnh mạch; PBS được sử dụng làm đối chứng âm tính) được bắt đầu khi khối u đạt thể tích trung bình khoảng 150-250 mm³. Thể tích khối u được đo theo hai chiều bằng thước cặp và thể tích được biểu thị bằng mm³ theo công thức: $V = (L \times W \times W)/2$, trong đó V là thể tích khối u, L là chiều dài khối u (kích thước khối u dài nhất) và W là chiều rộng khối u (kích thước khối u dài nhất vuông góc với L), và được mô tả theo thời gian trong Fig. 20. Mỗi nhóm điều trị bao gồm một con

chuột duy nhất. Để tính toán giá trị phản hồi, công thức sau đã được sử dụng; (thể tích khối u của chuột được điều trị IgG1-C-E430G vào ngày X - thể tích khối u của chuột được xử lý IgG1-C-E430G vào ngày 0)/(thể tích khối u của chuột đối chứng vào ngày X - thể tích khối u của chuột đối chứng vào ngày 0)

X = ngày muộn nhất trong khoảng thời gian từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 25 mà cả hai con vật đều sống và việc đo khối u được tiến hành.

Giá trị phản ứng được mô tả trong Bảng 5 cũng như biểu hiện mARN CD38. Các mẫu có mức mARN CD38 cao nhất cũng cho thấy phản ứng tốt nhất. Điều này cũng có thể được nhìn thấy từ đồ thị trong Fig. 20. Do đó, hai liều IgG1-C-E430G hàng tuần đã làm giảm sự phát triển của khối u ở hai trong số năm mẫu DLBCL PDX được thử nghiệm có biểu hiện CD38 mARN cao nhất.

Bảng 5 Tổng quan biểu hiện CD38 mARN và giá trị đáp ứng được tính toán cho năm mẫu DLBCL PDX. Giá trị đáp ứng thấp biểu thị thoái trào khối u.

Mẫu	CD38 (được xác định bằng RNASeq: log2 (giá trị TPM + 1))	Đáp ứng ($\Delta T/\Delta C$)	Đáp ứng được tính cho ngày;
Ly12638	6,427	-11%	15
Ly11212	6,066	-2%	11
Ly13976	6,017	54%	13
Ly13693	4,796	58%	22
Ly14862	0	83%	11

Ví dụ 10: IgG1-C-E430G cảm ứng độc tính tế bào qua trung gian bổ thể mạnh trong tế bào đơn nhân tủy xương từ bệnh nhân MM mới được chẩn đoán

Tế bào đơn nhân tủy xương (BM-MNC) được phân lập bằng gradient mật độ Ficoll-Hypaque từ dịch hút toàn bộ tủy xương từ 3 bệnh nhân MM mới được chẩn đoán và 1 bệnh nhân MM tái phát/kháng và được đông lạnh ở -80°C cho đến khi sử dụng. Vào ngày sử dụng, BM-MNC đã được rã đông, các tế bào sống sót được đếm và mạ trong các đĩa 96 lỗ. Tế bào được ủ với các dung dịch pha loãng nối tiếp (0,01 - 10 µg/mL) IgG1-C-E430G hoặc Darzalex® trong 15 phút ở nhiệt độ phòng trên máy lắc đĩa. Là đối

chứng âm, các tế bào không được điều trị hoặc được ủ với 10 µg/mL IgG1-b12. Là nguồn bổ sung, 20% huyết thanh người bình thường được thêm vào 45 phút trước khi đo FACS, trong đó số lượng tế bào tuyệt đối được xác định bằng cách sử dụng các hạt đếm tế bào dòng chảy làm hằng số. Để xác định phần trăm tổng thể của quá trình phân giải, các lỗ đối chứng chưa được xử lý được sử dụng làm giá trị đối chứng. Tỷ lệ phân giải tế bào đa u tủy được xác định so với đối chứng bằng cách sử dụng công thức sau:

$$\% \text{ phân giải tế bào} = (1 - (\text{số lượng tế bào sống sót trong các mẫu được xử lý bằng kháng thể} / \text{số lượng tế bào sống sót trong mẫu không được xử lý đối chứng})) \times 100\%$$

Fig. 22A và Fig. 22B thể hiện rằng IgG1-C-E430G gây ra mức độ phân giải cao hơn trong hai mẫu BM-MNC từ bệnh nhân MM mới được chẩn đoán so với Darzalex®. Phân giải tối đa do IgG1-C-E430G gây ra nằm trong khoảng 84-90% so với phân giải tối đa trong khoảng 31-55% do Darzalex® gây ra. Trong hai mẫu BM-MNC khác, một mẫu từ bệnh nhân MM tái phát/kháng không dùng Darzalex® như một phần của liệu pháp điều trị trước (Fig. 22C) và một mẫu từ bệnh nhân MM mới được chẩn đoán (Fig. 22D), không ghi nhận CDC khởi phát với IgG-C-E430G hoặc Darzalex® (Fig. 22C và Fig. 22D).

Danh mục tài liệu tham khảo

Mỗi tài liệu tham khảo trong danh sách này, hoặc được trích dẫn ở nơi khác trong bản mô tả này, theo đây, được kết hợp cụ thể bằng cách tham chiếu toàn bộ nội dung của nó.

Antonelli, A., P. Fallahi, et al. (2001). "Anti-CD38 autoimmunity in patients with chronic autoimmune thyroiditis or Graves' disease." *Clin Exp Immunol* 126(3): 426-431.

Ausiello, C. M., F. Urbani, et al. (2000). "Functional topography of discrete domains of human CD38." *Tissue Antigens* 56(6): 539-547.

Brezski, R. J. and G. Georgiou (2016). "Immunoglobulin isotype knowledge and application to Fc engineering." *Curr Opin Immunol* 40: 62-69.

Chatterjee, S., A. Daenthanasanmak, et al. (2018). "CD38-NAD(+)Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response." *Cell Metab* 27(1): 85-100 e108.

Cotner, T., M. Hemler, et al. (1981). "Human T cell proteins recognized by rabbit heteroantisera and monoclonal antibodies." *Int J Immunopharmacol* 3(3): 255-268.

Dall'Acqua, W. F., K. E. Cook, et al. (2006). "Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region." *J Immunol* 177(2): 1129-1138.

Damle, R. e. a. (1999). "Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 94(6): 1840-1847.

de Weers, M., Y. T. Tai, et al. (2011). "Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors." *J Immunol* 186(3): 1840-1848.

Deckert, J., M. C. Wetzel, et al. (2014). "SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies." *Clin Cancer Res* 20(17): 4574-4583.

Deshpande, D. A., T. A. White, et al. (2005). "Altered airway responsiveness in CD38-deficient mice." *Am J Respir Cell Mol Biol* 32(2): 149-156.

Desjarlais, J. R. and G. A. Lazar (2011). "Modulation of antibody effector function." *Exp Cell Res* 317(9): 1278-1285.

Eissler, N., S. Filosto, et al. (2018). "A best in class anti-CD38 antibody with antitumor and immune-modulatory properties." AACR annual meeting 2018: Abstract #3812.

Feng X., Zhang L., et al. (2017). "Targeting CD38 Suppresses Induction and Function of T Regulatory Cells to Mitigate Immunosuppression in Multiple Myeloma." Clin Cancer Res 23:4290-4300.

Ho, H. N., L. E. Hultin, et al. (1993). "Circulating HIV-specific CD8+ cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens." J Immunol 150(7): 3070-3079.

Kaneko, E. and R. Niwa (2011). "Optimizing therapeutic antibody function: progress with Fc domain engineering." BioDrugs 25(1): 1-11.

Karakasheva T. A., Waldron T. J., et al., (2015). "CD38-Expressing Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Tumor Growth in a Murine Model of Esophageal Cancer." Cancer Res 75(19):4074-85

Kestens, L., G. Vanham, et al. (1992). "Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection." AIDS 6(8): 793-797.

Keyhani, A., Y. O. Huh, et al. (2000). "Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia." Leuk Res 24(2): 153-159.

Konoplev, S., L. J. Medeiros, et al. (2005). "Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia." Am J Clin Pathol 124(3): 414-420.

Krejcik, J., T. Casneuf, et al. (2016). "Daratumumab depletes CD38+ immune-regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma." Blood 128: 384-394.

Krejcik, J., K. A. Frerichs, et al. (2017). "Monocytes and Granulocytes Reduce CD38 Expression Levels on Myeloma Cells in Patients Treated with Daratumumab." Clin Cancer Res 23(24): 7498-7511.

Lammerts van Bueren, J., D. Jakobs, et al. (2014). "Direct in Vitro Comparison of Daratumumab with Surrogate Analogs of CD38 Antibodies MOR03087, SAR650984 and Ab79." *Blood* 124(21): 3474.

Lande, R., F. Urbani, et al. (2002). "CD38 ligation plays a direct role in the induction of IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in resting human monocytes." *Cell Immunol* 220(1): 30-38.

Lee, H. C. and R. Aarhus (1993). "Wide distribution of an enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic ADP-ribose." *Biochim Biophys Acta* 1164(1): 68-74.

Lin, P., R. Owens, et al. (2004). "Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma." *Am J Clin Pathol* 121(4): 482-488.

Malavasi, F., A. Funaro, et al. (1994). "Human CD38: a glycoprotein in search of a function." *Immunol Today* 15(3): 95-97.

Mallone, R. and P. C. Perin (2006). "Anti-CD38 autoantibodies in type 2 diabetes." *Diabetes Metab Res Rev* 22(4): 284-294.

Marinov, J., K. Koubek, et al. (1993). "Immunophenotypic Significance of the Lymphoid Cd38 Antigen in Myeloid Blood Malignancies." *Neoplasma* 40(6): 355-358.

Morandi F., Horenstein A. L., et al. (2015). "CD56^{bright}CD16⁻ NK Cells Produce Adenosine through a CD38-Mediated Pathway and Act as Regulatory Cells Inhibiting Autologous CD4⁺ T Cell Proliferation." *J Immunol* 195:965-972.

Moore, G. L., H. Chen, et al. (2010). "Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions." *MAbs* 2(2): 181-189.

Patton, D. T., Wilson M. D., et al. (2011). "The PI3K p110 δ Regulates Expression of CD38 on Regulatory T cells." *PLoS ONE* 6(3): 1-8

Parry-Jones, N., E. Matutes, et al. (2007). "Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and may influence prognosis: a study of 60 cases by FISH." *Br J Haematol* 137(2): 117-124.

Perfetti, V., V. Bellotti, et al. (1994). "AL amyloidosis. Characterization of amyloidogenic cells by anti-idiotypic monoclonal antibodies." *Lab Invest* 71(6): 853-861.

Raab, M. S., H. Goldschmidt, et al. (2015). "A phase I/IIa study of the human anti-CD38 antibody MOR202 (MOR03087) in relapsed or refractory multiple myeloma (rrMM)." *J Clin Oncol* 33: A8574.

Ramaschi, G., M. Torti, et al. (1996). "Expression of cyclic ADP-ribose-synthetizing CD38 molecule on human platelet membrane." *Blood* 87(6): 2308-2313.

Roepcke, S., N. Plock, et al. (2018). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the cytolytic anti-CD38 human monoclonal antibody TAK-079 in monkey - model assisted preparation for the first in human trial." *Pharmacol Res Perspect* 6(3): e00402.

Schooten, W. v. (2018). "Multispecific antibodies targeting CD38 and PD-L1 show potent tumor cytotoxicity." *AACR annual meeting 2018: Abstract #5620*.

Sondermann, P. and D. E. Szymkowski (2016). "Harnessing Fc receptor biology in the design of therapeutic antibodies." *Curr Opin Immunol* 40: 78-87.

Song, A., K. Myojo, et al. (2014). "Evaluation of a fully human monoclonal antibody against multiple influenza A viral strains in mice and a pandemic H1N1 strain in nonhuman primates." *Antiviral Res* 111: 60-68.

Suzuki, R., J. Suzumiya, et al. (2004). "Aggressive natural killer-cell leukemia revisited: large granular lymphocyte leukemia of cytotoxic NK cells." *Leukemia* 18(4): 763-770.

van de Donk (2018). "Immunomodulatory effects of CD38 targeting antibodies." Immunology Letters 199:16-22

van de Donk, N. W., M. L. Janmaat, et al. (2016). "Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond." Immunol Rev 270(1): 95-112.

van de Donk, N. W., H. M. Lokhorst, et al. (2012). "How I treat plasma cell leukemia." Blood 120(12): 2376-2389.

Wang, L., H. Wang, et al. (2015). "CD38 expression predicts poor prognosis and might be a potential therapy target in extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type." Ann Hematol 94(8): 1381-1388.

Wang, X., M. Mathieu, et al. (2018). "IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions." Protein & Cell 9(1): 63-73.

Zhang, D., A. A. Armstrong, et al. (2017). "Functional optimization of agonistic antibodies to OX40 receptor with novel Fc mutations to promote antibody multimerization." MAbs 9(7): 1129-1142.

Zocchi, E., L. Franco, et al. (1993). "A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD⁺ glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes." Biochem Biophys Res Commun 196(3): 1459-1465.

Nijhof et al., Blood 2016; 128(7):959-970

"Supplemental Methods" to Nijhof et al., 2016

WO 2006/099875 A1 (Genmab A/S)

WO 2007/042309 A1 (Morphosys AG)

WO 2008/047242 A1 (Sanofi Aventis)

WO 2011/154453 A1 (Genmab A/S)

WO 2012/092612 A1 (Takeda Pharmaceutical)

WO 2013/004842 A2 (Genmab A/S)

WO 2014/108198 A1 (Genmab B.V.)

WO 2016/210223 A1 (Janssen Biotech, Inc.)

WO 2018/031258 A1 (Janssen Biotech, Inc.)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Biện thể kháng thể gắn kết với CD38 của người, biện thể kháng thể này chứa vùng chuỗi nặng biến đổi (VH) chứa SEQ ID NO:1, vùng chuỗi nhẹ biến đổi (VL) chứa SEQ ID NO:5, vùng CH chứa SEQ ID NO: 46 và vùng CL chứa SEQ ID NO:37.
2. Biện thể kháng thể theo điểm 1, là kháng thể hóa trị hai.
3. Biện thể kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó biện thể kháng thể này là kháng thể đơn đặc hiệu, hoặc kháng thể đặc hiệu kép.
4. Biện thể kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-3, có hiệu quả ức chế hoạt tính xyclaza của CD38 của người, và/hoặc cảm ứng sự chết theo chương trình khi có mặt, mà không vắng mặt, kháng thể liên kết ngang với Fc.
5. Biện thể kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-4, trong đó biện thể kháng thể này cảm ứng CDC, ADCC, thực bào tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP), trogocytosis, hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng, của tế bào biểu hiện CD38 của người.
6. Biện thể kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-5, trong đó biện thể kháng thể này được liên hợp với chất gây độc tế bào, đồng vị phóng xạ hoặc thuốc.
7. Axit nucleic hoặc hỗn hợp axit nucleic mã hóa biện thể kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-5.
8. Vector biểu hiện chứa (các) axit nucleic theo điểm 7.
9. Vật truyền phân phối chứa (các) axit nucleic theo điểm 7.
10. Tế bào chủ tái tổ hợp sản xuất biện thể kháng thể như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó tế bào chủ này chứa axit nucleic theo điểm 7 hoặc vector biểu hiện theo điểm 8.
11. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 10, tế bào chủ này là tế bào sinh vật có nhân điển hình hoặc không có nhân điển hình.
12. Phương pháp sản xuất biện thể kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, bao gồm nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 10 hoặc 11 ở môi trường nuôi

cây và trong điều kiện thích hợp để sản xuất biến thể kháng thể.

13. Phương pháp theo điểm 12, phương pháp này còn bao gồm bước tinh chế hoặc phân lập biến thể kháng thể từ môi trường nuôi cấy.

14. Hợp phần chứa biến thể kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, axit nucleic hoặc hỗn hợp axit nucleic theo điểm 7, vector biểu hiện theo điểm 8, vật truyền phân phối theo điểm 9, hoặc tế bào chủ theo điểm 10 hoặc 11.

15. Dược phẩm chứa biến thể kháng thể như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, axit nucleic hoặc hỗn hợp axit nucleic theo điểm 7, vector biểu hiện như được xác định theo điểm 8, hoặc vật truyền phân phối theo điểm 9, và chất mang dược dụng.

1/20

FIG. 1

```

IgG1  247  PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  306
IgG1f 247  PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  306
IgG2   PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
IgG3   PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
IgG4   PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
      *****:*****:*****:*****:*****

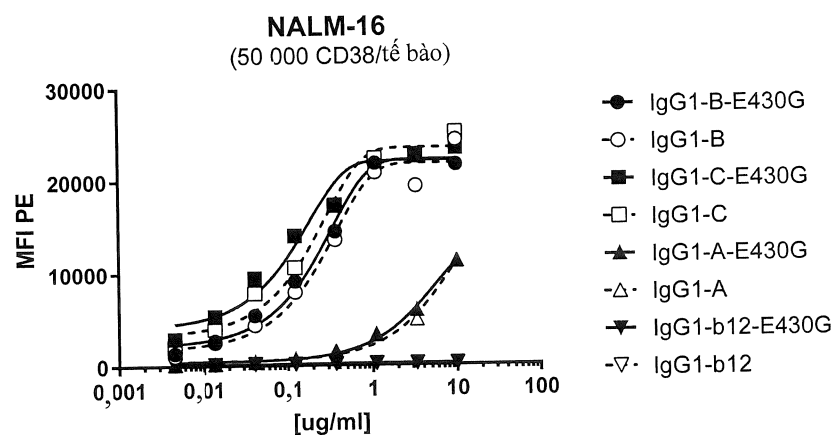
IgG1  307  TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT  366
IgG1f 307  TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT  366
IgG2   TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
IgG3   TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
IgG4   TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
      **:*****:*****:*****:*****:*****

IgG1  367  CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  426
IgG1f 367  CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  426
IgG2   CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
IgG3   CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
IgG4   CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
      *****:*****:*****:*****:*****

IgG1  427  VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  447
IgG1f 427  VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  447
IgG2   VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG3   VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG4   VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
      *****:***** **

```

FIG. 2



2/20

FIG. 3A

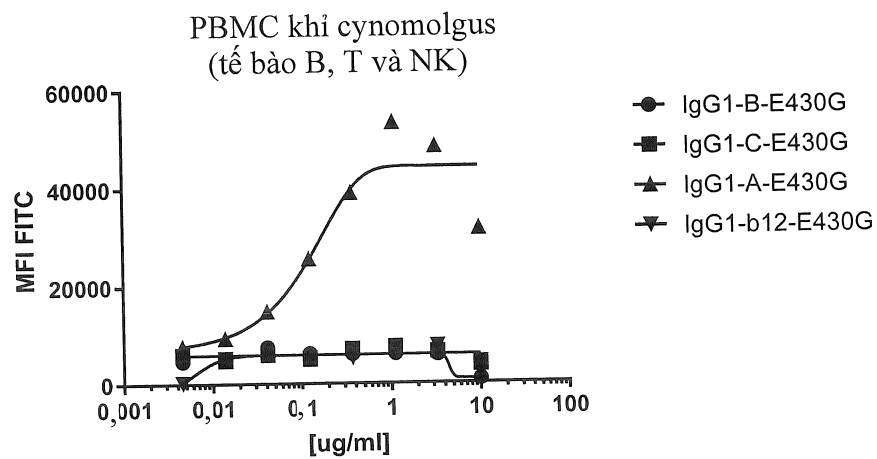
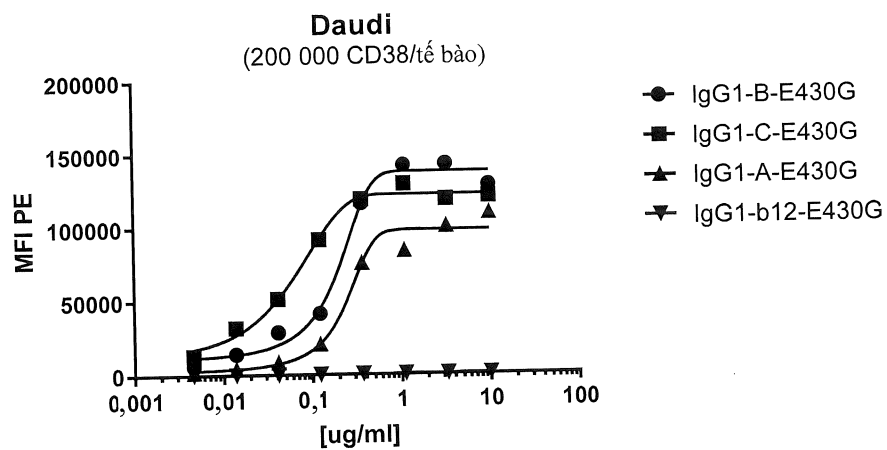
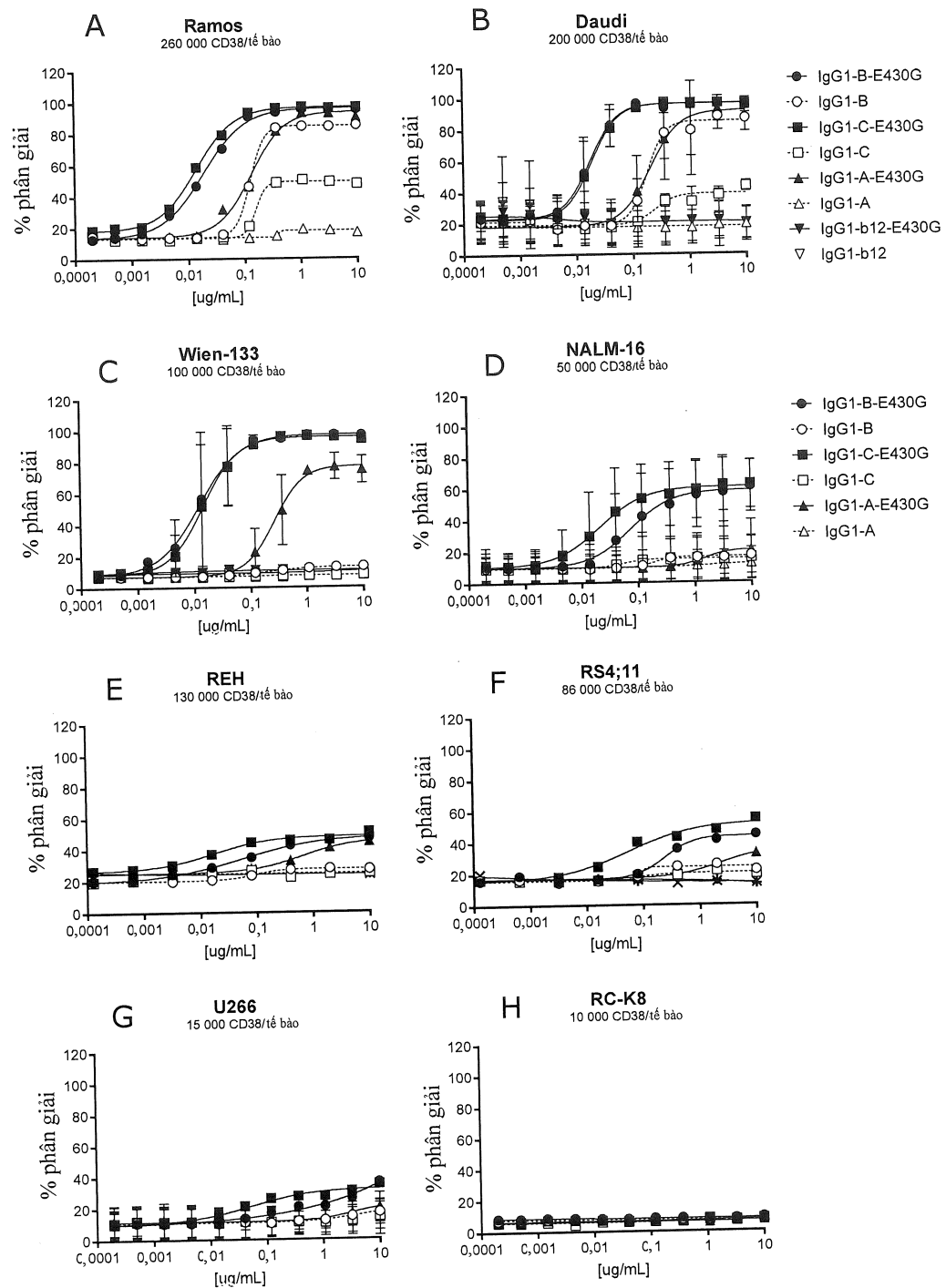


FIG. 3B



3/20

FIG. 4



4/20

FIG. 5

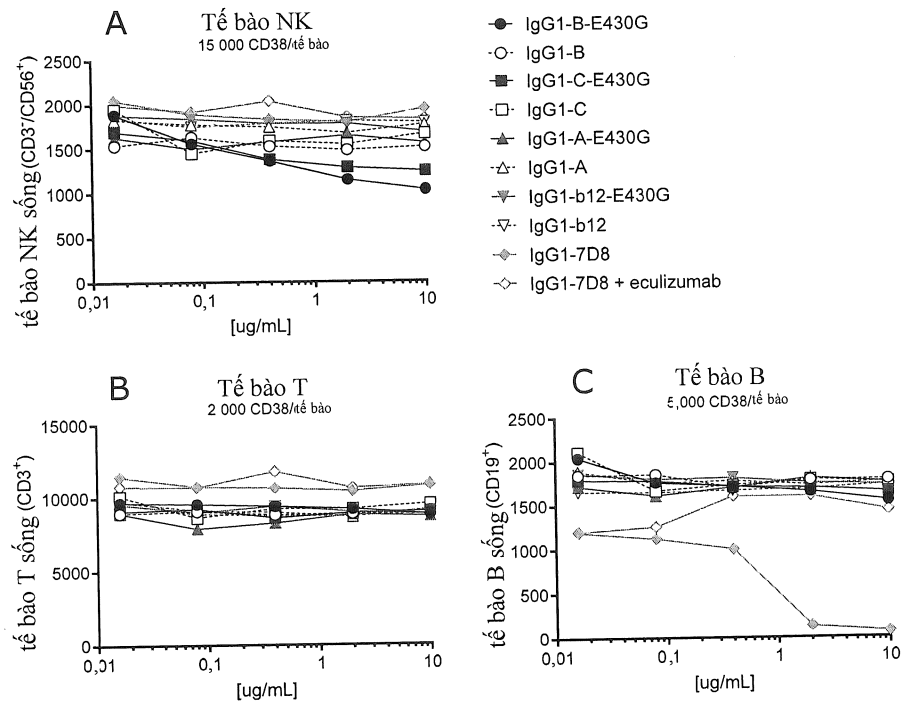
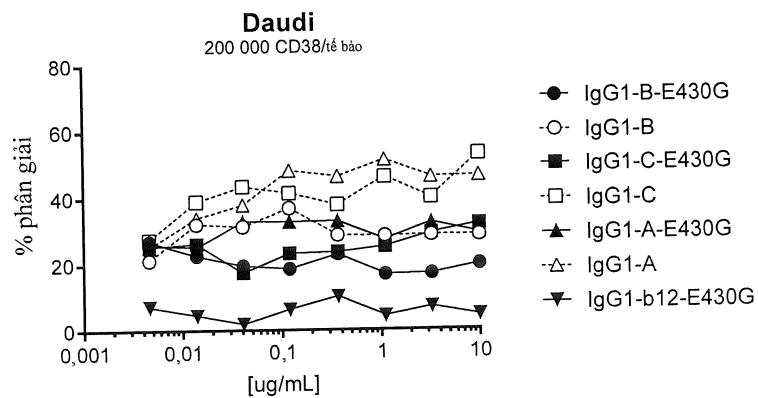


FIG. 6



5/20

FIG. 7

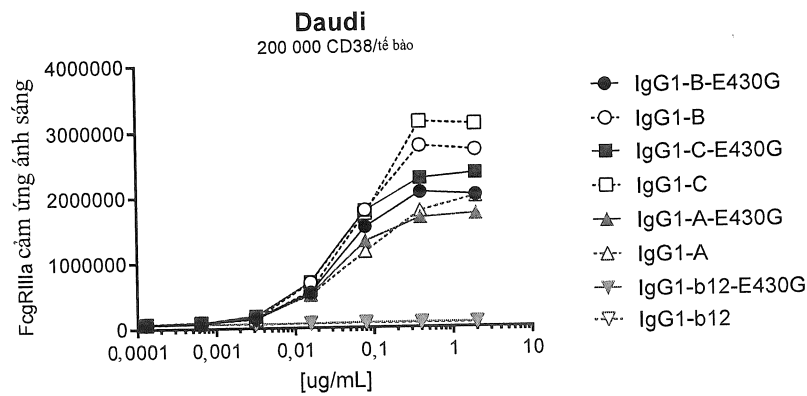


FIG. 8

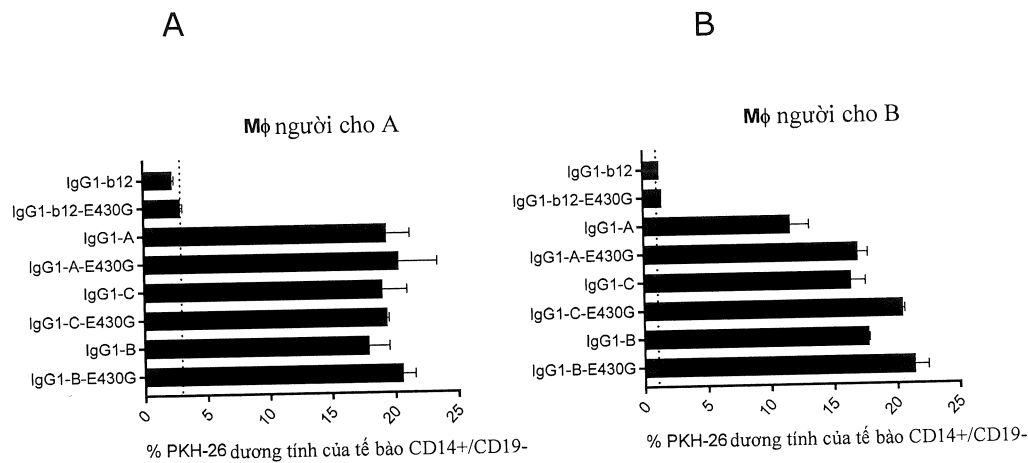
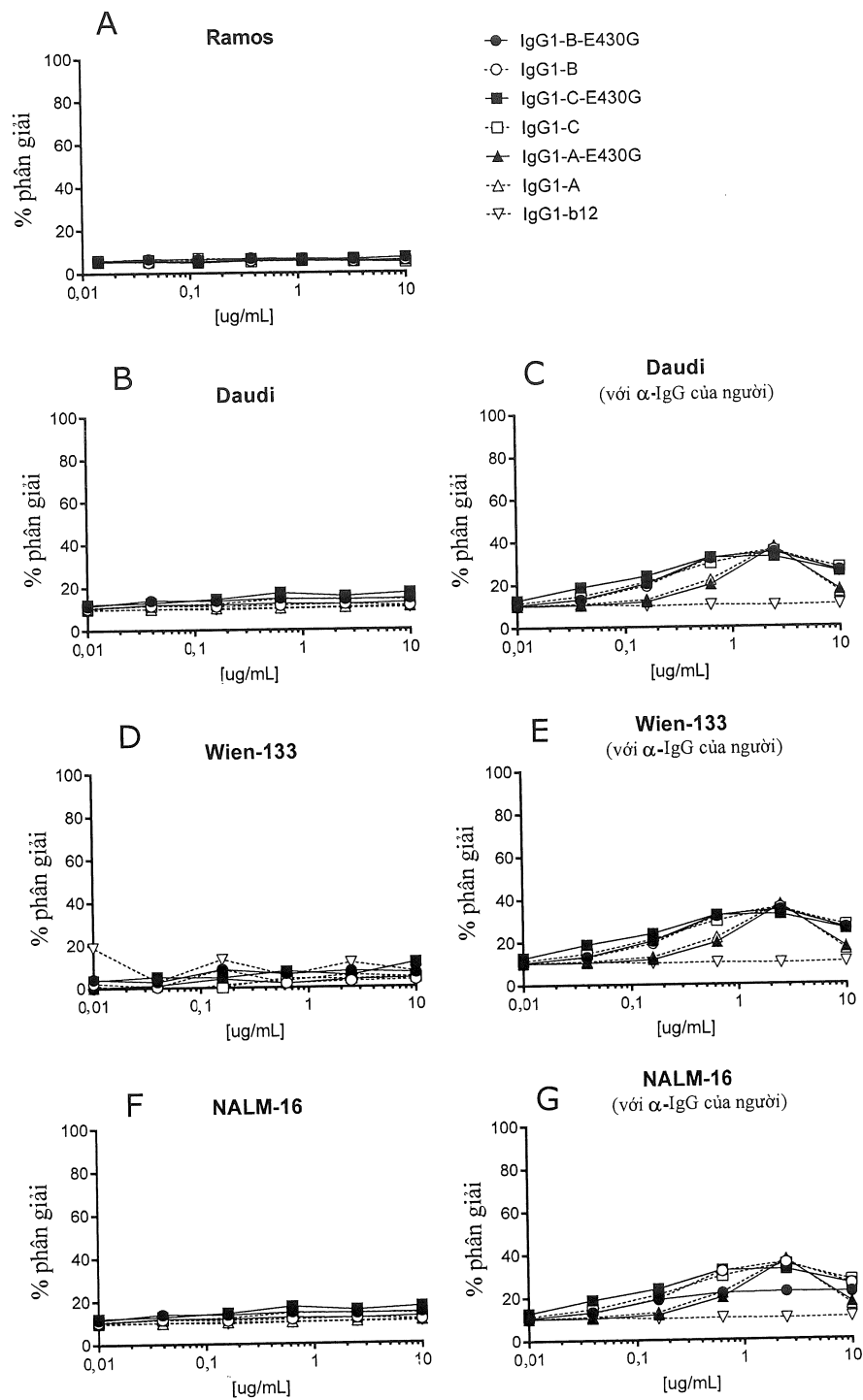


FIG. 9

6/20



7/20

FIG. 10

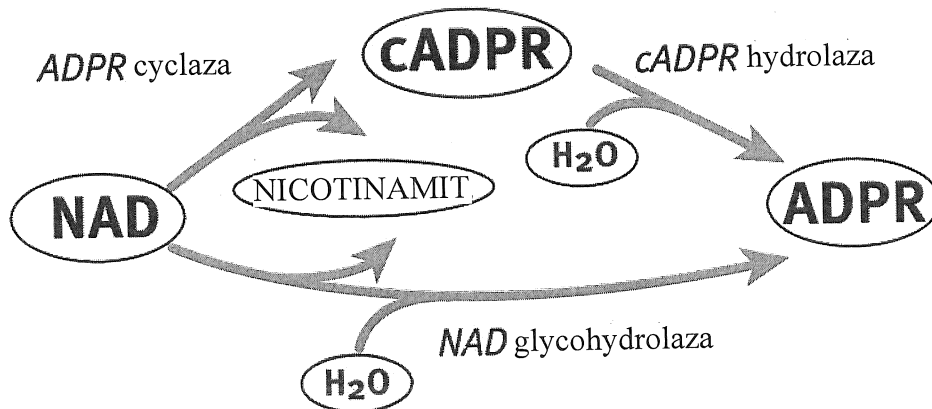
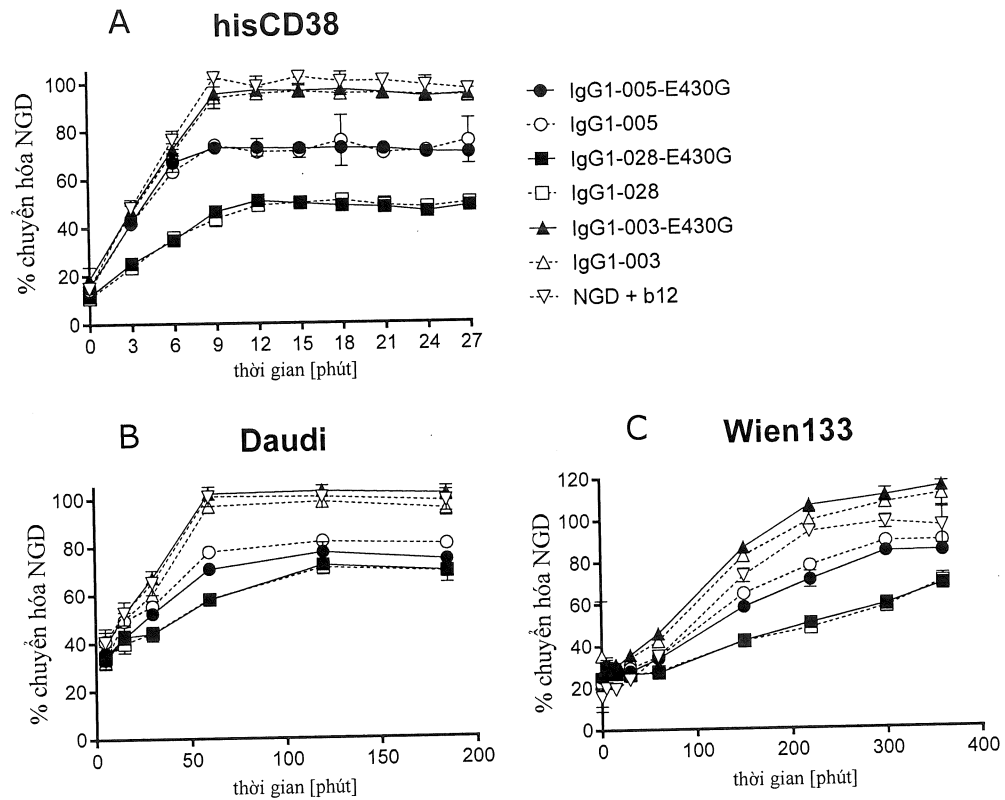


FIG. 11



8/20

FIG. 12

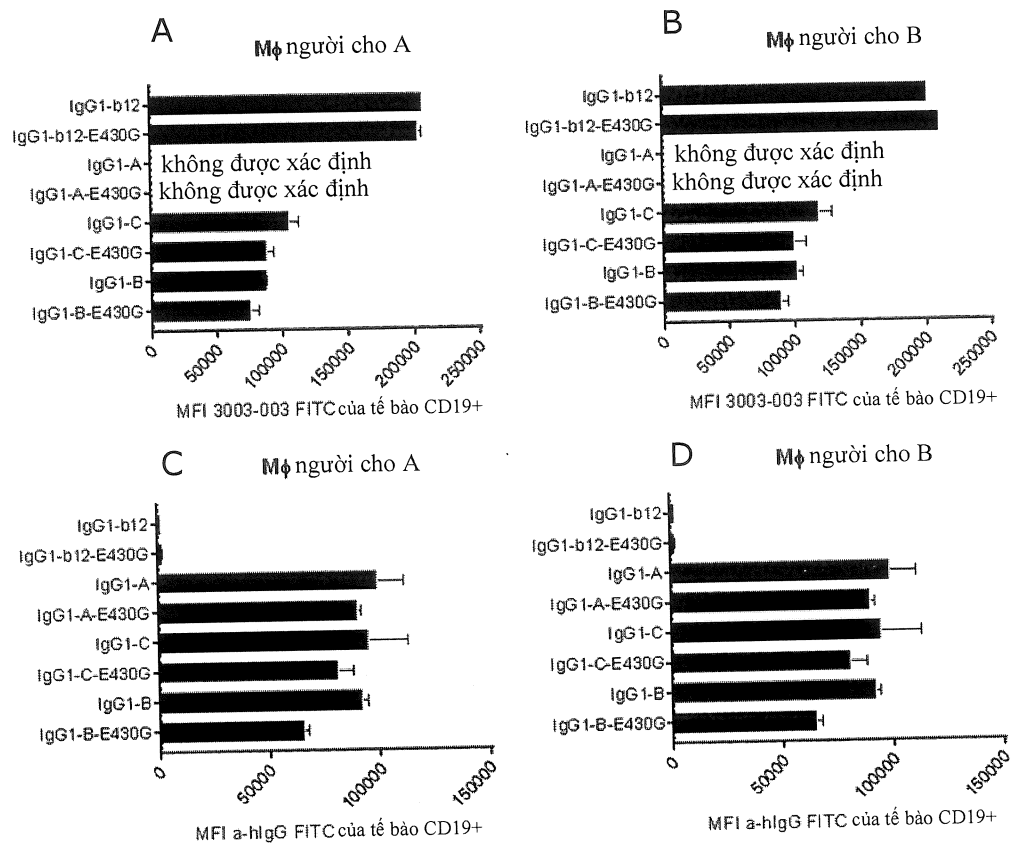


FIG. 13

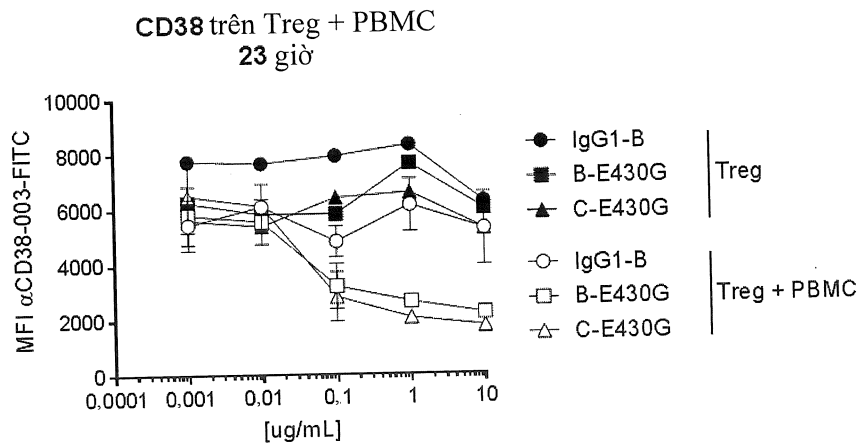
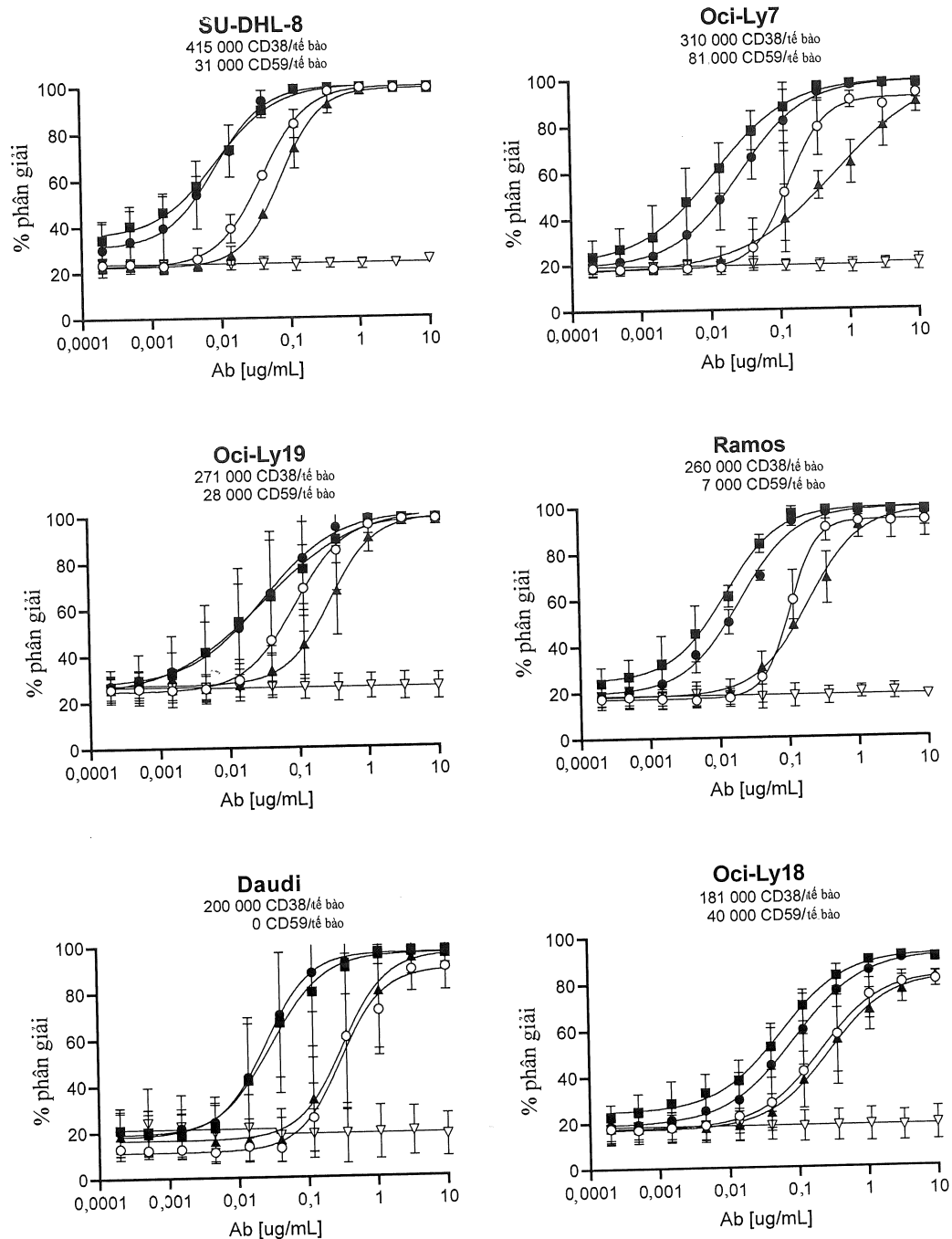


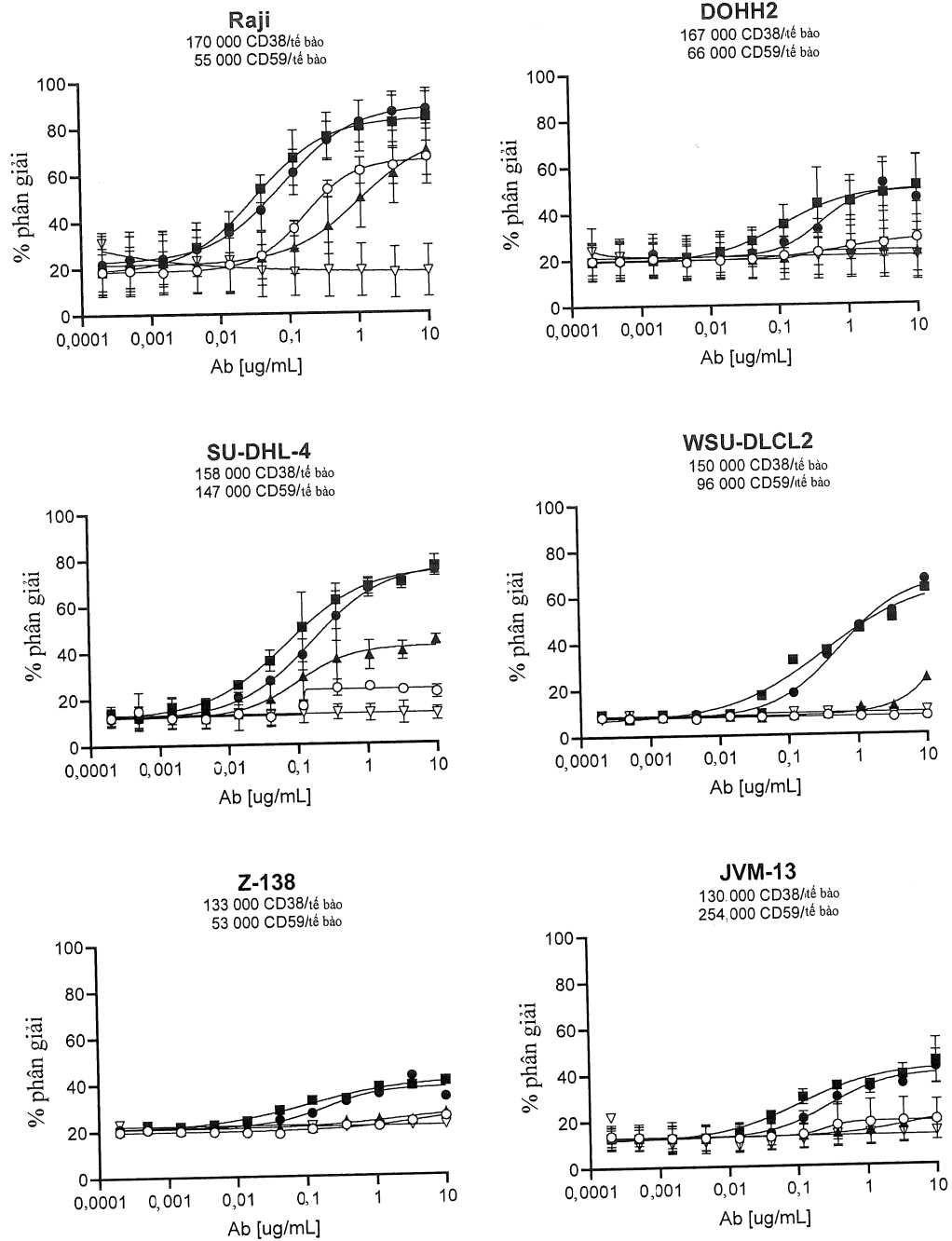
FIG. 14

9/20



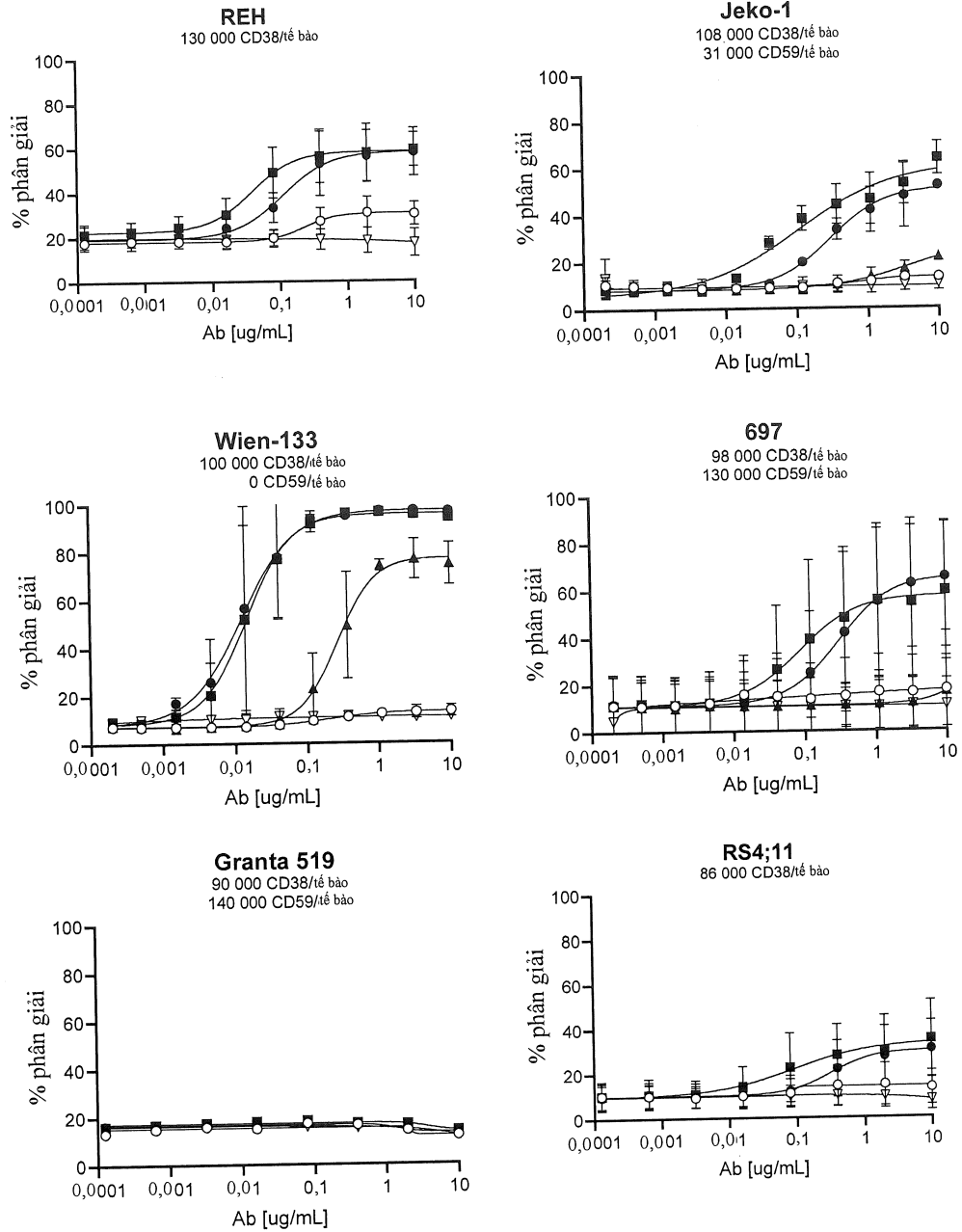
10/20

FIG. 14 tiếp



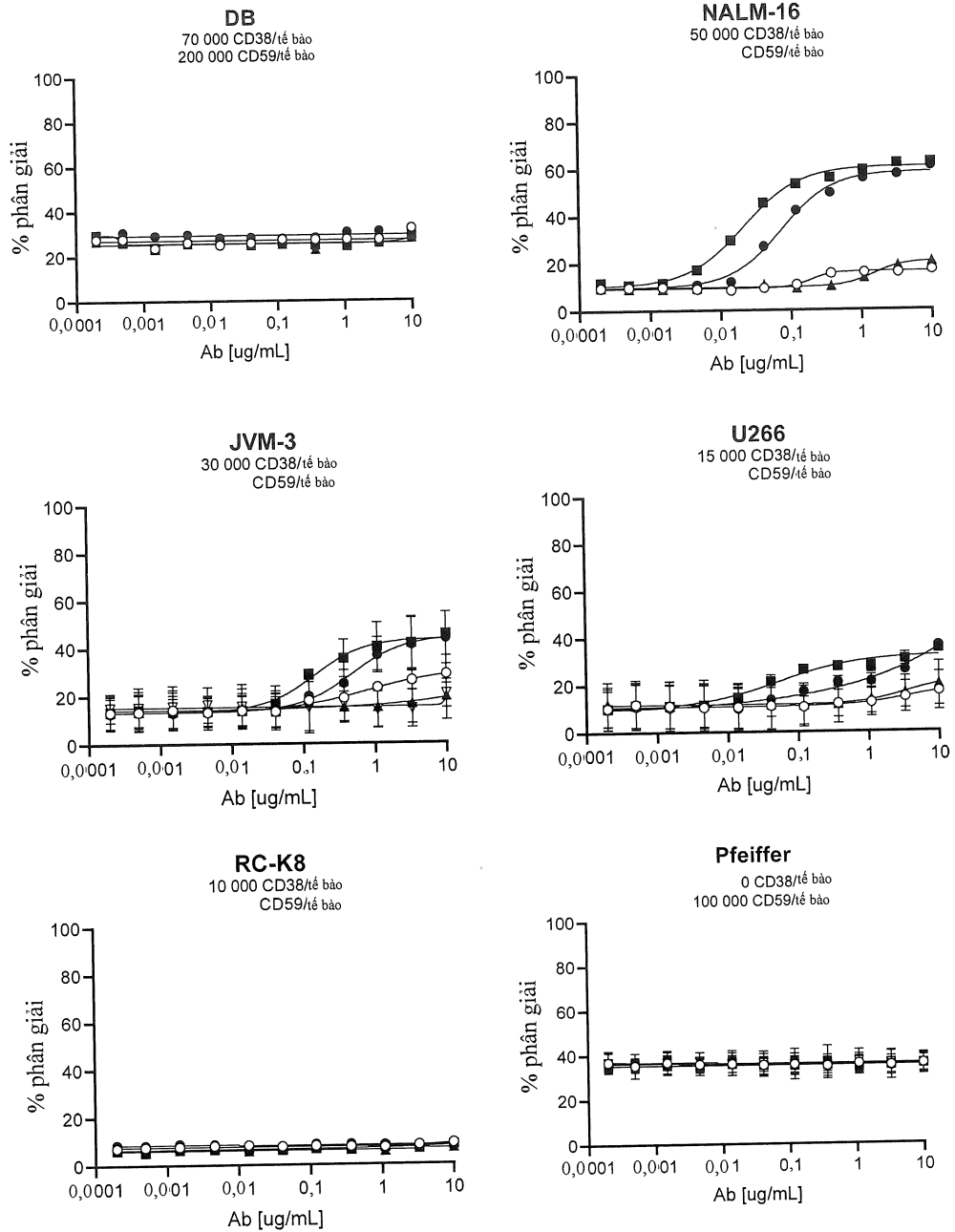
11/20

FIG. 14 tiếp



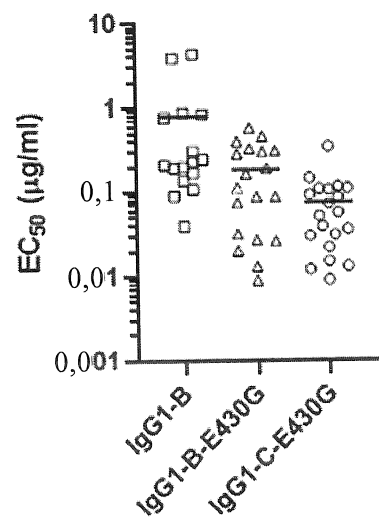
12/20

FIG. 14 tiếp



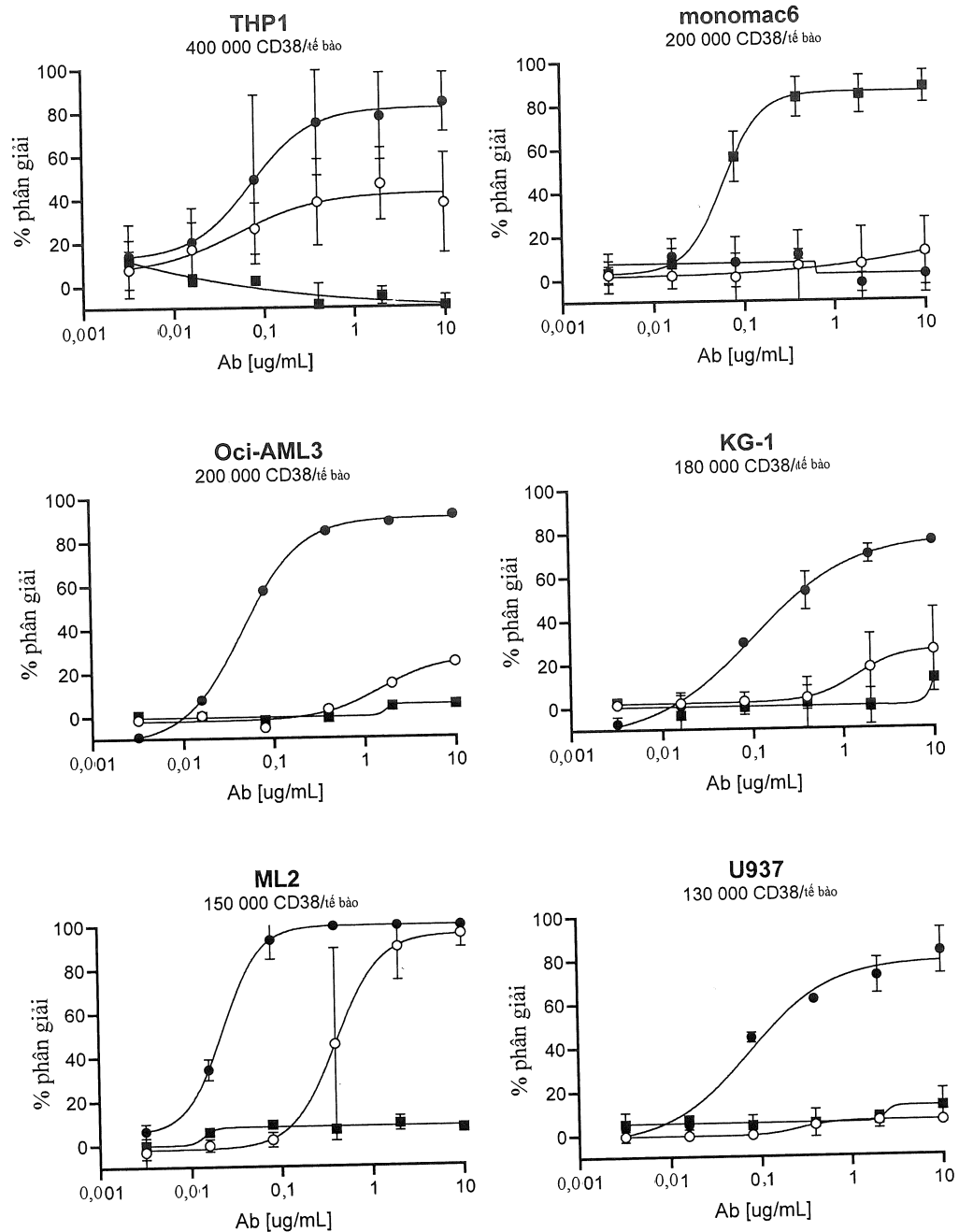
13/20

FIG. 15



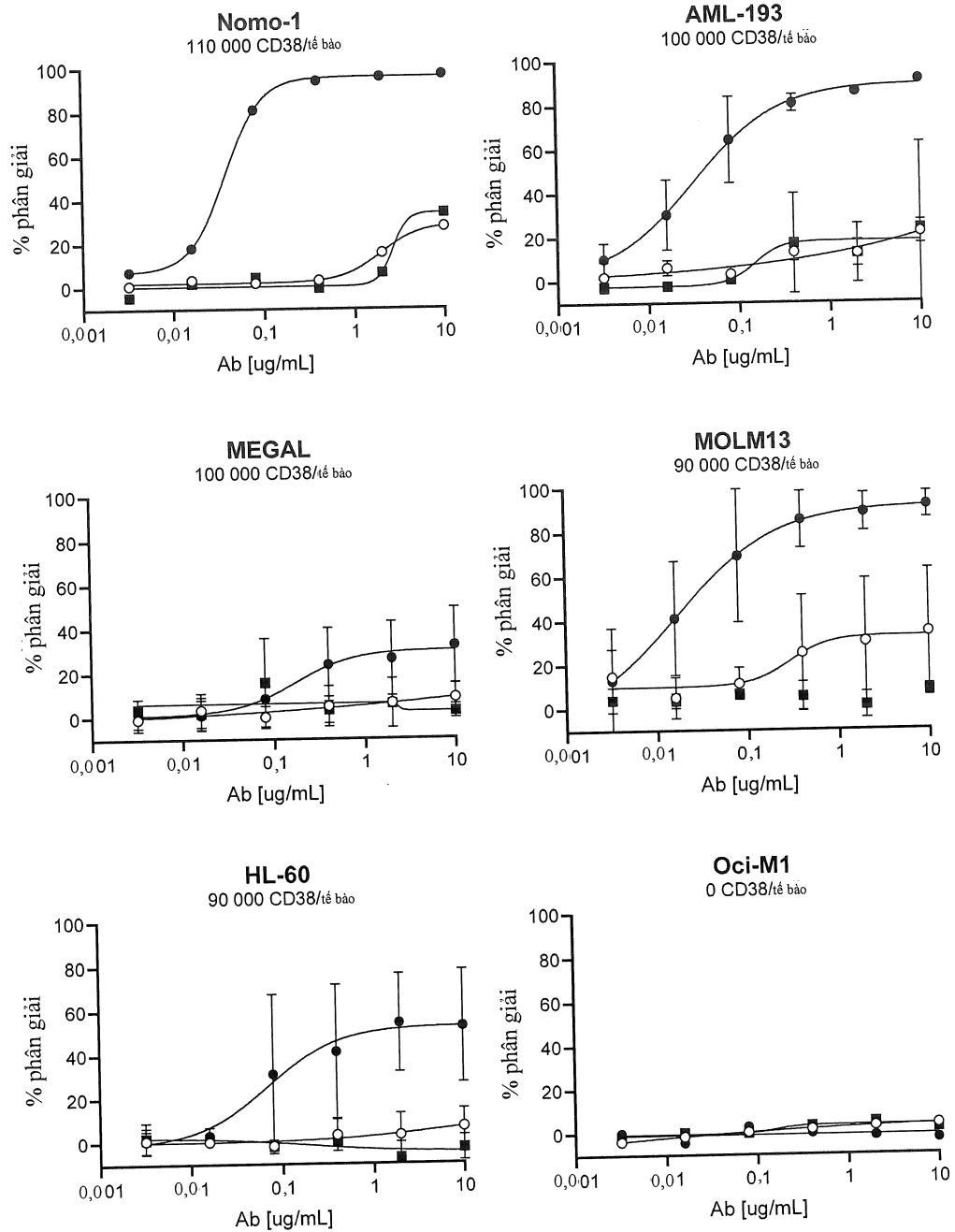
14/20

FIG. 16



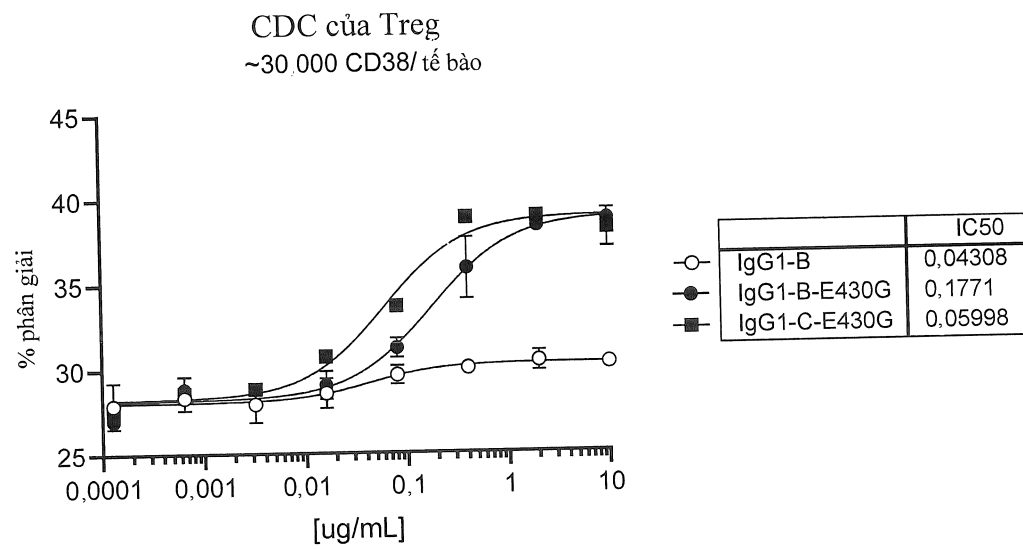
15/20

FIG. 16 tiếp



16/20

FIG. 17



17/20

FIG. 18

Thử cho B

Thử cho C

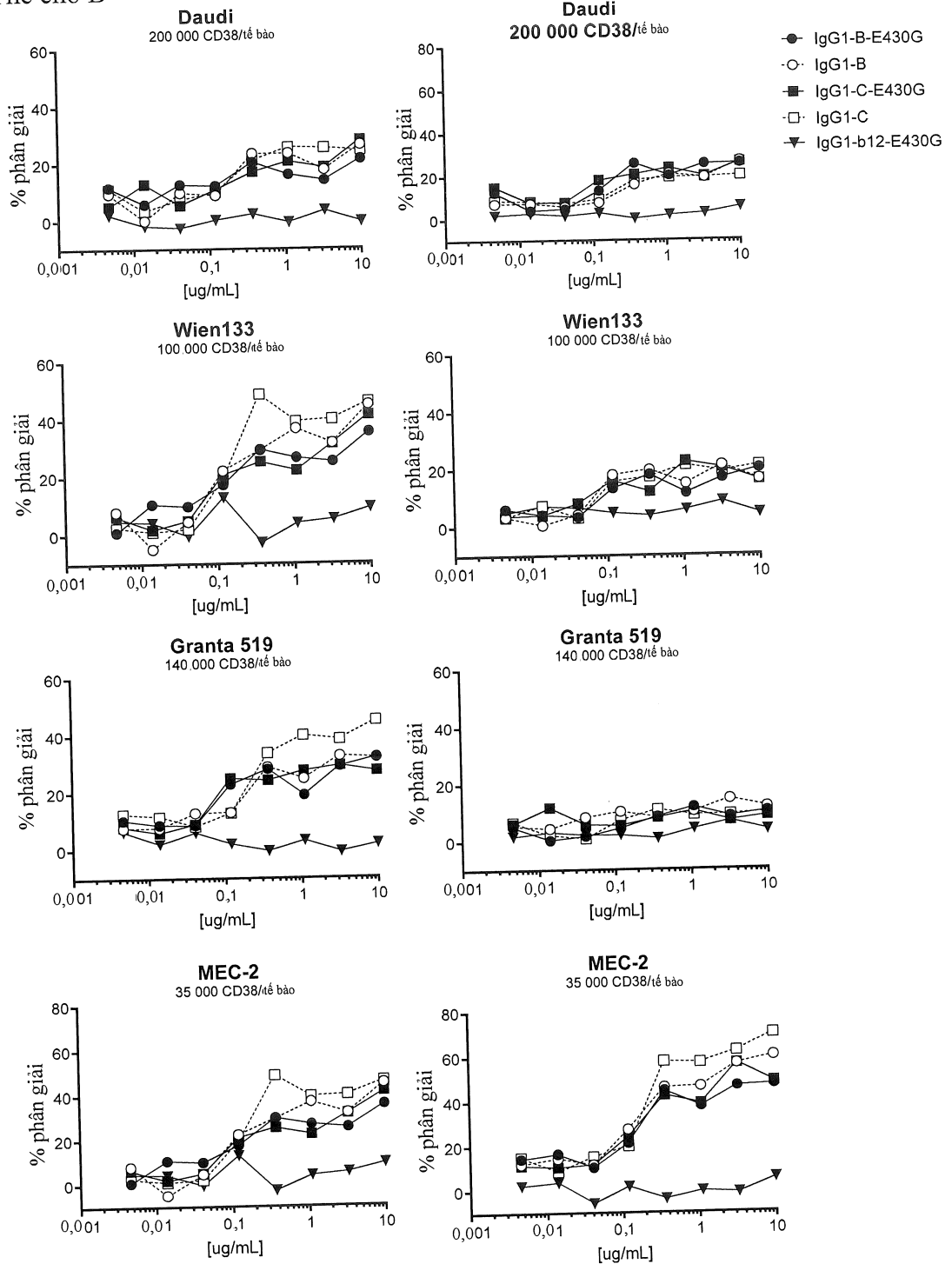


FIG. 19

18/20

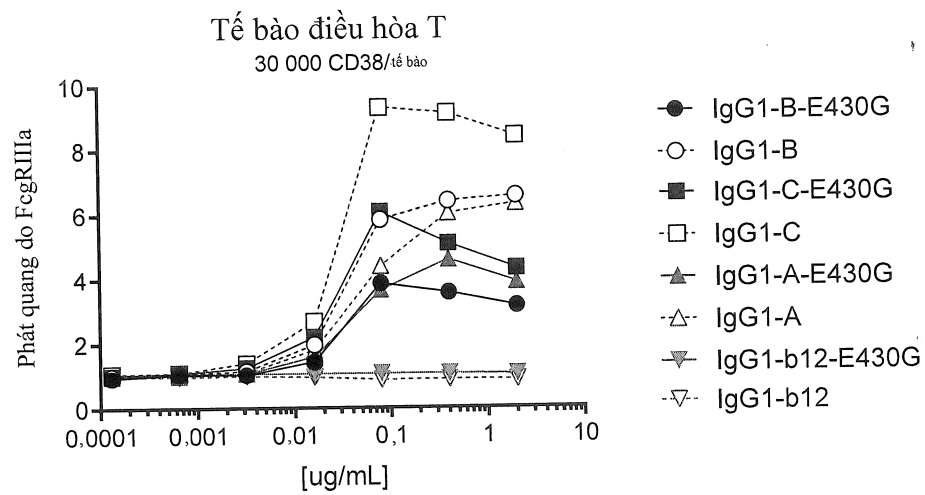


FIG. 20

19/20

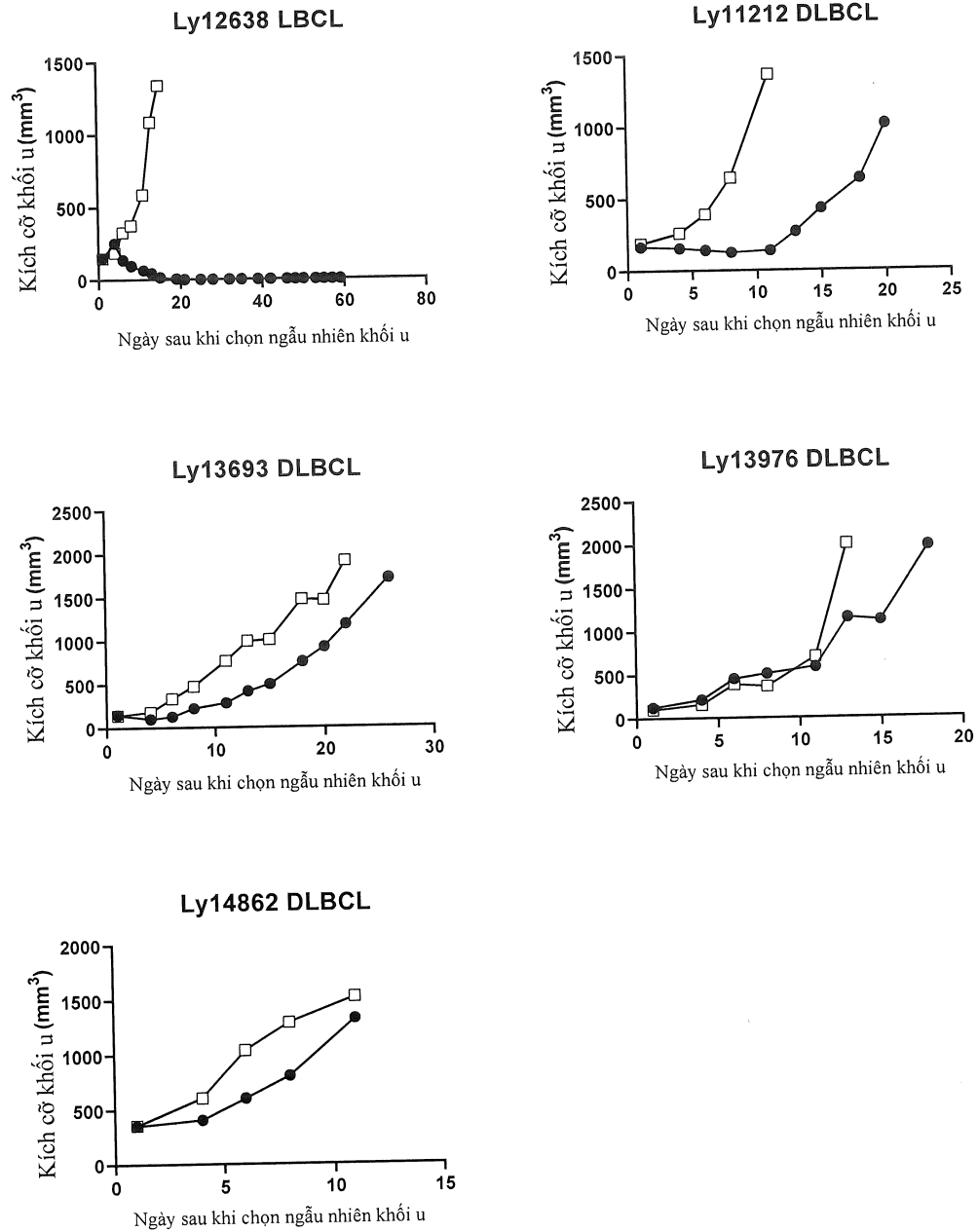


FIG. 21

20/20

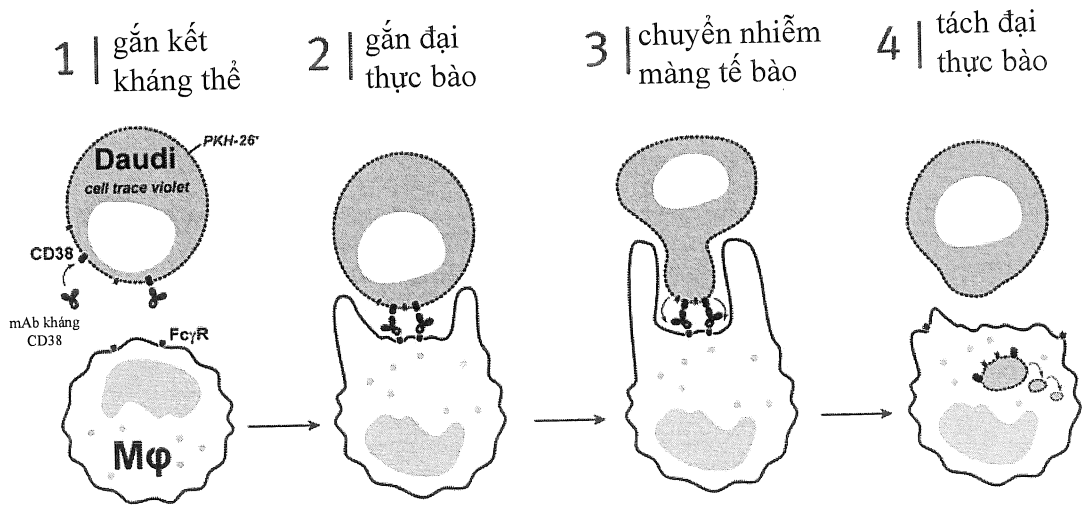
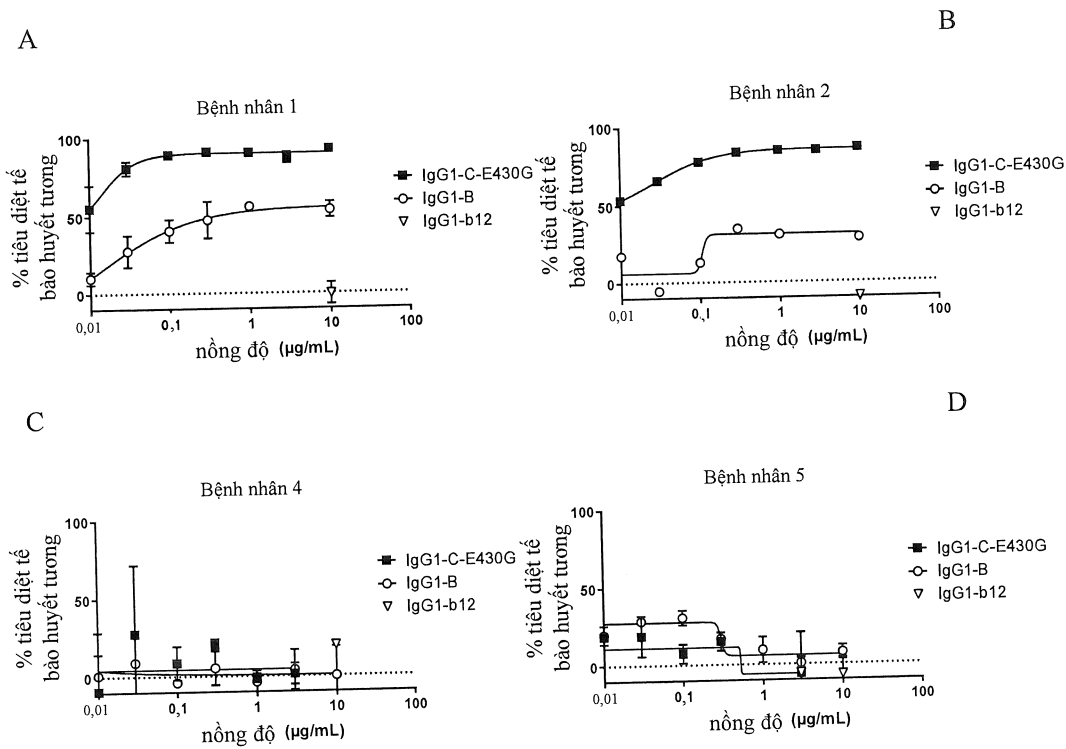


FIG. 22



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Genmab A/S

<120> BIẾN THỂ KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI CD38 CỦA NGƯỜI, AXIT NUCLEIC MÃ HÓA BIẾN THỂ KHÁNG THỂ NÀY, VÀ VECTO BIỂU HIỆN HOẶC VẬT TRUYỀN PHÂN PHỐI CHỨA AXIT NUCLEIC NÀY

<130> P/0134.WO

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 1

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

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

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

Gly	Arg	Ile	Ile	Arg	Phe	Leu	Gly	Ile	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Ile	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Asn	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	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Arg	Asp	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Ile	Trp	Gly
			100					105					110		

Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			115				120	

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 2

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 3

Ile Ile Arg Phe Leu Gly Ile Ala
1 5

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 4

Ala Gly Glu Pro Gly Glu Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile
1 5 10

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 5

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 6

Gln Gly Ile Arg Ser Trp
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 7

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 8
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 8

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 Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe
 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 Gly 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 Phe Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 9

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Một phần của trình tự

<400> 10

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Phe Leu Gly Ile Ala Asn Ser 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 Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Asp Ile Ala Ala Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Một phần của trình tự

<400> 11

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12

<211> 127

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 12

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 Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe
 20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
 100 105 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 13

Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe Val
 1 5

<210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 14

Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys
 1 5

<210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 15

Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr
 1 5 10 15

Tyr Met Asp Val
 20

<210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 16

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

Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg
 20 25 30

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

Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys
 100 105

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 17

His Ser Ile Arg Ser Arg Arg
 1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 18

Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 19

<211> 330

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 19

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 20
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 20

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 22
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 22

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Pro Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 23
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 23

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Pro Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 24

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 25

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 25

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Ser Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 26

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 26

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Phe Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 27

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 27

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Thr Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 28
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Lys Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 29

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 29

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Gln Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 30
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Arg Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 31

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 31

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Tyr Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 32

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Trp Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 33

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 33

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 34

<211> 326

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 34

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 35
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 36
<211> 327
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Một phần của trình tự

<400> 36

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 37

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 38
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
 1 5 10 15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val
 20 25 30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln
 35 40 45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu
 50 55 60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val
 65 70 75 80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys
 85 90 95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu
 100 105 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile
 115 120 125

Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr
 130 135 140

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys
 145 150 155 160

Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp
 165 170 175

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val
 180 185 190

Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu
 195 200 205

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

```

210
215
220
Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala
225 230 235 240
Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp
245 250 255
Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln
260 265 270
Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
275 280 285
Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
290 295 300
<210> 39
<211> 262
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự được đánh dấu
<400> 39
His His His His His His Arg Trp Arg Gln Thr Trp Ser Gly Pro Gly
1 5 10 15
Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr
20 25 30
Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp
35 40 45
Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys His Pro Cys Asn Ile Thr
50 55 60
Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro
65 70 75 80
Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile Lys Asp Leu Ala His Gln
85 90 95
Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr Leu Glu Asp Thr Leu Leu
100 105 110

```

Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys Gly Glu Phe Asn Thr Ser
 115 120 125

Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn
 130 135 140

Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu
 145 150 155 160

Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys
 165 170 175

Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser Val Glu Val His Asn Leu
 180 185 190

Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly
 195 200 205

Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu
 210 215 220

Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile
 225 230 235 240

Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser
 245 250 255

Ser Cys Thr Ser Glu Ile
 260

<210> 40
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<220>
 <221> X
 <222> (5)..(5)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X is Ser or Arg

<400> 40

Gly Gly Thr Phe Xaa Ser Tyr Ala
1 5

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Một phần của trình tự

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X is Arg or Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X is Ile or Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X is Ala, Tyr or Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X is Ala, Thr or Val

<400> 41

Ile Ile Xaa Phe Leu Gly Xaa Xaa
1 5

<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Một phần của trình tự

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X is Ala or Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X is Glu, Asp or Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> X is Val or Phe

<400> 42

Xaa Gly Glu Pro Gly Xaa Arg Asp Pro Asp Ala Xaa Asp Ile
 1 5 10

<210> 43
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 43

Gln Gly Ile Arg Ser Trp
 1 5

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X is Ser or Asn

<400> 44

Gln Gln Tyr Asn Xaa Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 45
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Một phần của trình tự

<400> 45

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 46

<211> 329

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Một phần của trình tự

<400> 46

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325