



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0052911
(51)^{2020.01} C07K 14/475; C07K 16/28; A61K (13) B
38/18; A61P 9/00

(21) 1-2020-06528 (22) 11/04/2019
(86) PCT/US2019/026889 11/04/2019 (87) WO 2019/200033 17/10/2019
(30) 62/656,246 11/04/2018 US
(45) 25/11/2025 452 (43) 27/12/2021 405A
(73) 1. Salubris Biotherapeutics, Inc. (US)
45 West Watkins Mill Road, Suite E, Gaithersburg, Maryland 20878, United States
of America
2. Salubris (Chengdu) Biotech Co., Ltd. (CN)
88 S. Keyuan Road, Building 10, Suite 2-203, Gao-Xin District, Chengdu, China
(72) LI, John (US); LI, Shengwei (CN); LUO, Dixiang (CN); WU, Yiran (CN); ZHOU,
Ming (CN); ZHUANG, Xiaolei (CN); HUA, Liang (CN); LUO, Pengyi (CN);
WANG, Yang (CN).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PROTEIN DUNG HỢP TÁI TỔ HỢP, DƯỢC PHẨM VÀ BỘ KIT CÓ CHỨA
PROTEIN TÁI TỔ HỢP NÀY

(21) 1-2020-06528

(57) Sáng chế đề cập đến protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với khung kháng thể đơn dòng (mAb), dược phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp và bộ kit có chứa protein dung hợp tái tổ hợp này.

Sơ đồ phân tử của protein
dung hợp mAb kháng-HER3/NRG-1

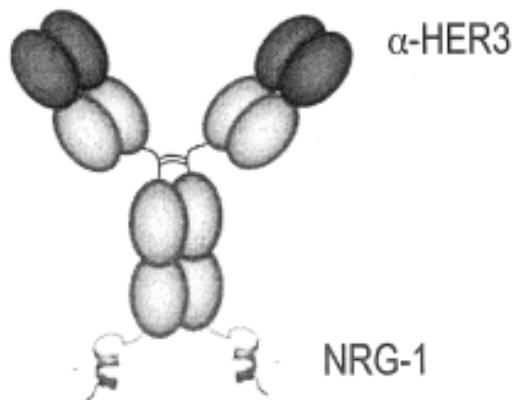


Fig. 2A

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với khung kháng thể đơn dòng (mAb), dược phẩm và bộ kit có chứa protein tái tổ hợp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Neuregulin (NRG; heregulin, HRG), còn gọi là yếu tố sinh trưởng thần kinh đệm (glial growth factor - GGF) và yếu tố biệt hóa mới (new differentiation factor - NDF), là loại glycoprotein có khối lượng phân tử bằng 44 KD. Họ protein NRG có bốn thành viên: NRG-1, NRG-2, NRG-3 và NRG-4. NRG (bao gồm NRG-1) đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong sự phát triển của tim. Dưới dạng phối tử của thụ thể tyrosin kinaza của họ ErbB, NRG-1 liên kết trực tiếp với ErbB3 hoặc ErbB4 liên kết màng, gây cảm ứng sự dimer hóa để tạo ra các phức hợp ErbB2/ErbB4, ErbB2/ErbB3, ErbB3/ErbB3 và ErbB4/ErbB4, và sự truyền tín hiệu nội bào tiếp đó. Trong các mô hình động vật, sự biểu hiện của NRG gây cảm ứng sự truyền tín hiệu paracrin để thúc đẩy sự sinh trưởng và sự biệt hóa trong mô tim trong quá trình phát sinh phôi, với sự làm khuyết của bất kỳ trong số ErbB2, ErbB4 hoặc NRG-1 dẫn đến sự chết phôi. Ngoài ra, liệu pháp ung thư phong bế sự truyền tín hiệu thụ thể ErbB2 đã được chứng minh là có tác dụng phụ gây độc tim đáng kể, chứng tỏ ở người rằng sự truyền tín hiệu qua trung gian ErbB2 là thiết yếu không chỉ đối với sự phát triển mà còn đối với nội cân bằng của mô tim khỏe mạnh.

Bằng chứng cũng cho thấy rằng sự truyền tín hiệu NRG-1 có một phần vai trò trong sự phát triển và chức năng của các hệ cơ quan khác, cũng như là trong sự phát sinh bệnh của bệnh ở người (bao gồm bệnh tâm thần phân liệt và ung thư đầu và cổ). NRG-1 có nhiều đồng phân. Nghiên cứu ở chuột nhắt đột biến gen (chuột nhắt bị bất hoạt gen) chỉ ra rằng các đồng phân với các vùng đầu tận cùng N hoặc các miền giống EGF khác nhau có chức năng in vivo khác nhau. Sáng chế này dựa trên đồng phân NRG-1 β a2.

NRG-1 nội sinh liên kết với và gây cảm ứng sự truyền tín hiệu thông qua cả ErbB3 (HER3) và ErbB4 (HER4). Nhiều nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng đã cho thấy tiềm năng trị liệu của NRG-1 ở nhiều chỉ định tim mạch, chủ yếu thông qua sự tương tác của nó với ErbB4 được biểu hiện ở tế bào cơ tim (HER4). Tuy nhiên, có ba yếu tố chính giới hạn

việc ứng dụng và sử dụng lâm sàng của NRG-1 người tái tổ hợp (rhNRG-1). Thứ nhất, sự truyền tín hiệu của NRG-1 qua HER3 có thể thúc đẩy sự phát triển và/hoặc sự tiến triển ung thư, làm nảy sinh sự quan ngại đáng kể đối với ứng dụng bất kỳ đòi hỏi việc dùng mãn tính hoặc không có yếu tố nguy cơ tim mạch (CV) trầm trọng. Thứ hai, sự hoạt hóa quá mức của HER3 bằng NRG-1 có thể phá vỡ tính toàn vẹn biểu mô dạ dày-ruột (GI) và nội cân bằng, dẫn đến sự gây độc GI nghiêm trọng và do đó mất cửa sổ điều trị đối với NRG-1. Thứ ba, cả hai mảnh protein hoạt tính giai đoạn lâm sàng của rhNRG-1 đã thể hiện thời gian bán thải ngắn, chỉ ra rằng phác đồ liều lượng và dùng thuốc nặng nề có thể cần thiết để đạt được mức độ phơi nhiễm trị liệu mong muốn. Do đó, có nhu cầu tạo ra trị liệu dựa trên NRG-1 mà giữ lại tiềm năng trị liệu đáng kể về mặt lâm sàng ở nhiều chỉ định tim mạch, nhưng có nguy cơ gây ung thư hoặc thúc đẩy sự tiến triển ung thư thấp hơn, khả năng dung chịu GI tốt hơn, và biên dạng được động học (PK) phù hợp hơn.

Sáng chế này nhắm đến các nhu cầu này bằng cách đề xuất protein tái tổ hợp có chứa thể dung hợp của miền hoạt tính rhNRG-1 với kháng thể đối kháng đặc hiệu HER3: Sự truyền tín hiệu HER3 bị phong bế theo cách mà làm giảm bớt nguy cơ gây ung thư và sự gây độc GI của rhNRG-1, và cùng lúc đó định dạng khung kháng thể mang lại thời gian bán thải phân tử của kháng thể đơn dòng thông thường, làm cho việc dùng liều lượng và sử dụng sản phẩm này thuận tiện hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với khung kháng thể đơn dòng (mAb). Theo khía cạnh liên quan, mảnh NRG-1 được dung hợp với đầu tận cùng C của chuỗi nặng kháng thể thông qua cầu nối. Theo khía cạnh liên quan khác, NRG-1 được gắn vào cầu nối thông qua axit amin thứ nhất (thứ 1) trên đầu tận cùng N của NRG-1, mà theo một phương án là axit amin Serin (S hoặc Ser). Theo khía cạnh liên quan, mảnh này là mảnh hoạt tính mà có chứa miền hoạt tính của NRG-1. Theo khía cạnh liên quan khác mAb là đơn đặc hiệu đối với ErbB3 (HER3). Theo khía cạnh liên quan khác, NRG-1 là đồng phân NRG-1 β 2a.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến được phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với khung kháng thể đơn dòng kháng-HER3 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dùng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh ở đối tượng cần chúng, phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc dược phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa, ức chế, kìm hãm hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến CNS ở đối tượng cần chúng, phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của protein dung hợp tái tổ hợp.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa, ức chế, kìm hãm hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến CNS ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của protein dung hợp tái tổ hợp.

Theo khía cạnh liên quan khác, NRG-1 liên kết với và gây cảm ứng sự truyền tín hiệu qua ErbB4 (HER4). Theo khía cạnh liên quan khác, mAb ức chế sự truyền tín hiệu NRG-1 qua ErbB3 (HER3).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến bộ kit có chứa lượng hữu hiệu của protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế hoặc dược phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế.

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả chi tiết, các ví dụ và hình vẽ sau đây. Tuy nhiên, cần hiểu rằng phần mô tả chi tiết và các ví dụ cụ thể mặc dù chỉ ra các phương án theo sáng chế nhưng chỉ để minh họa, vì các thay đổi và cải biến khác nhau trong tinh thần và phạm vi của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực dựa trên phần mô tả chi tiết.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các mục đích và ưu điểm khác nhau và việc hiểu toàn diện hơn về sáng chế sẽ rõ ràng và được hiểu dễ dàng hơn bằng cách tham chiếu đến phần Mô Tả Chi Tiết Sáng Chế và các yêu cầu bảo hộ kèm theo khi kết hợp với các Hình vẽ kèm theo trong đó:

Fig. 1 thể hiện Cấu trúc của plasmit biểu hiện để biểu hiện protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Fig. 2A-D minh họa sơ đồ cấu tạo của protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Fig. 2A minh họa sơ đồ phân tử của protein dung hợp mAb kháng-HER3/NGR-1 theo sáng chế. Fig. 2B thể hiện dữ liệu đại diện được tạo ra bằng phân tích SDS-PAGE. Fig. 2C thể hiện kết quả thẩm tách Western được phát hiện bằng kháng thể sơ cấp đặc hiệu đối với mảnh hoạt tính có 61 axit amin của NRG-1 có chứa miền liên kết HER3/4 ("NRG-1", R&D Systems, Minneapolis, MN). Fig. 2D thể hiện kết quả thẩm tách Western được phát hiện bằng kháng thể sơ cấp đặc hiệu đối với IgG.

Fig. 3 minh họa phân tích liên kết cho thấy rằng protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này liên kết với protein HER3 (Đường cong 1, Bước 2) và có thể liên kết đồng thời kháng thể kháng-NGR-1 (Đường cong 1, Bước 3). Lưu ý rằng các đột biến Fc được đưa vào trong protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này để làm bất hoạt chức năng tác động Fc của trình tự kháng thể mẹ mã hóa cho kháng thể đặc hiệu HER3, mà có thể làm giảm nhẹ sự gây độc tế bào không mong muốn về phía các mô bình thường biểu hiện thụ thể HER3.

Fig. 4A-D thể hiện các đồ thị đại diện thể hiện tốc độ sinh trưởng tương đối trung bình $\pm$ SEM ($n = 3$) đối với các dòng tế bào ung thư khác nhau được điều trị bằng protein dung hợp mAb kháng-HER3/NGR-1 hoặc đối chứng. Fig. 4A thể hiện tốc độ sinh trưởng tương đối trung bình ở dòng tế bào ung thư dạ dày NCI-N87. Fig. 4B thể hiện tốc độ sinh trưởng tương đối trung bình ở dòng tế bào ung thư vú MCF-7. Fig. 4C thể hiện tốc độ sinh trưởng tương đối trung bình ở dòng tế bào ung thư bàng quang RT-112. Fig. 4D thể hiện tốc độ sinh trưởng tương đối trung bình ở dòng tế bào ung thư vú T47D. So với peptit NRG-1 và protein dung hợp mAb GP120/NGR-1 đối chứng, protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây thể hiện hoạt tính thấp hơn đáng kể trong việc thúc đẩy sự tăng sinh tế bào ung thư.

Fig. 5A-B minh họa rằng mặc dù tiềm năng sinh trưởng tế bào ung thư giảm đi, protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây bảo toàn đầy đủ khả năng gây cảm ứng sự truyền tín hiệu PI3K/AKT ở tế bào cơ tim – thể hiện hoạt tính có thể so sánh được đối với protein dung hợp mAb NRG-1 và GP120/NGR-1 tái tổ hợp. Fig. 5A là đồ thị thể hiện tỉ lệ tương đối của phospho-AKT (pAKT) với AKT tổng số (tAKT) so với nồng độ kháng thể (theo nM) ở tế bào cơ tim người được điều trị bằng protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế và đối chứng. Fig.

5B là phân tích Thẩm tách Western của sự phosphoryl hóa AKT ở tế bào cơ tim người được điều trị bằng protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế và đối chứng.

Fig. 6A-C thể hiện sự so sánh trực tiếp của sự dime hóa HER2/4 và HER2/3 trong sự có mặt của protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này và đối chứng. Fig. 6A thể hiện nguyên tắc thử nghiệm để phát hiện sự dime hóa gây ra bởi phối tử. Thử Nghiệm Dime Hóa PathHunter phát triển bởi Eurofins DiscoverX (Fremont, CA) được sử dụng để phát hiện sự dime hóa gây ra bởi phối tử của hai tiểu đơn vị của cặp thụ thể-dime. Enzym β -gal được chia thành hai mảnh, ProLink (PK) và thụ thể enzym (EA). Các tế bào đã được thiết kế để đồng biểu hiện protein đích 1 dung hợp với thể cho enzym PK, và protein đích 2 dung hợp với thể nhận enzym EA. Sự liên kết của phối tử với một protein đích làm cho nó tương tác với protein đích kia, buộc xảy ra sự bổ sung của hai mảnh enzym và dẫn đến phản ứng enzym để giải phóng tín hiệu phát quang hóa học mà được phát hiện dưới dạng Đơn Vị Huỳnh Quang Tương Đối hay RFU. Fig. 6B là đồ thị minh họa rằng protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây có thể gây cảm ứng sự dime hóa HER2/HER4 với hiệu lực có thể so sánh được với NRG-1. Fig. 6C là đồ thị minh họa rằng protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây có hiệu lực nhỏ hơn đáng kể so với NRG-1 trong việc gây cảm ứng sự dime hóa HER2/HER3. Các phát hiện này xác nhận thêm rằng protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây bảo toàn tiềm năng truyền tín hiệu HER2/4 đầy đủ của NRG-1 trong khi làm giảm đáng kể sự cảm ứng truyền tín hiệu HER2/3.

Fig. 7 minh họa ái lực liên kết của protein dung hợp mAb kháng-HER3/NGR-1 theo sáng chế với kháng nguyên HER3 giữa các loài khác nhau bao gồm người, khỉ, chuột cống và chuột nhắt. Tốc độ phân ly cân bằng (KD) xác định bằng phân tích BIAcore lần lượt là $3,13 \times 10^{-10}$ (người), $3,97 \times 10^{-10}$ (khỉ), $2,68 \times 10^{-9}$ (chuột cống) và $2,77 \times 10^{-9}$ (chuột nhắt). Dữ liệu này chỉ ra rằng protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế có ái lực liên kết tương tự với HER3 người và khỉ, trong khi ái lực của nó với HER3 động vật gặm nhấm (chuột cống và chuột nhắt) thấp hơn xấp xỉ một bậc về độ lớn.

Fig. 8 là đồ thị mà minh họa tác dụng của protein dung hợp tái tổ hợp lên phân suất tổng máu (ejection fraction - EF) ở mô hình chuột cống của suy tim tâm thu gây ra bởi sự nổi động mạch vành.

Fig. 9A-F là loạt 6 ảnh thể hiện sự thay đổi mô bệnh học ở cấu trúc cơ tim trong mô hình chuột cống của suy tim tâm thu gây ra bởi sự nổi động mạch vành. Các mô tim ở gần vị

trí phẫu thuật được thu lấy và được cố định trong formaldehyt 4%, sau đó các phần parafin được điều chế và được nhuộm màu bằng H&E. Fig. 9A thể hiện mô tim từ chuột cống đối chứng phẫu thuật vờ. Fig. 9B thể hiện mô tim từ chuột cống mô hình suy tim tâm thu được điều trị bằng đối chứng tá được lỏng. Fig. 9C thể hiện mô tim từ chuột cống mô hình suy tim tâm thu được điều trị bằng mAb GP120/NRG-1 (10 mg/kg). Fig. 9D thể hiện mô tim từ chuột cống mô hình suy tim tâm thu được điều trị bằng mAb kháng-HER3/NRG-1 (1 mg/kg). Fig. 9E thể hiện mô tim từ chuột cống mô hình suy tim tâm thu được điều trị bằng mAb kháng-HER3/NRG-1 (3 mg/kg). Fig. 9F thể hiện mô tim từ chuột cống mô hình suy tim tâm thu được điều trị bằng mAb kháng-HER3/NRG-1 (10 mg/kg).

Fig. 10 là đồ thị minh họa sự đánh giá của hoạt tính kháng khối u in vivo bằng cách sử dụng mô hình mảnh ghép khác loài ung thư biểu mô FaDu dưới da ở chuột nhắt NOD/SCID.

Fig. 11 là đồ thị minh họa sự thay đổi khối lượng cơ thể ở chuột nhắt mang khối u được điều trị bằng protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế và đối chứng.

Fig. 12 là đồ thị minh họa biên dạng dược động học của protein dung hợp tái tổ hợp ở khỉ cynomolgus (macaque).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế này sử dụng protein dung hợp tái tổ hợp có chứa thể dung hợp giữa kháng thể đơn dòng dung hợp với mảnh hoạt tính của đồng phân protein neuregulin-1 ở nhiều chỉ định tim mạch và hệ thần kinh trung ương (central nervous system - CNS).

Định nghĩa

Trừ khi có chỉ dẫn khác, các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học dùng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về.

Nhằm mục đích giải thích cho bản mô tả này, các định nghĩa sau đây được áp dụng và bất cứ khi nào thích hợp, thuật ngữ ở dạng số ít cũng bao gồm nghĩa số nhiều và ngược lại. Trong trường hợp mà định nghĩa bất kỳ nêu dưới đây mâu thuẫn với tài liệu bất kỳ được kết hợp ở đây để tham khảo, thì hiểu theo định nghĩa nêu dưới đây.

“Neuregulin hoặc chất tương tự neuregulin” là các phân tử mà có thể hoạt hóa các protein dimeric loại tyrosin kinaza ErbB2/ErbB4 hoặc ErbB2/ErbB3, chẳng hạn như tất cả các đồng phân neuregulin, một mảnh miền EGF neuregulin, thể đột biến neuregulin, và loại

bất kỳ của sản phẩm gen giống neuregulin mà cũng hoạt hóa thụ thể nêu trên. “Neuregulin” được ưu tiên dùng trong sáng chế này là mảnh polypeptit của đồng phân neuregulin 1 β 2 người chứa miền giống EGF và miền liên kết thụ thể. Theo một phương án, mảnh neuregulin là mảnh hoạt tính. Neuregulin-1 (NRG-1) và các đồng phân của chúng còn được biết đến trong lĩnh vực này dưới dạng neuregulin 1 (NRG1), yếu tố sinh trưởng thần kinh đệm (GGF), Heregulin (HGL), HRG, yếu tố biệt hóa mới (NDF), ARIA, GGF2, HRG1, HRGA, SMDF, MST131, MSTP131 và bản phiên mã intron NRG1 2 (NRG1-IT2).

Các thuật ngữ “ErbB3”, “ErbB3 (HER3)”, “HER3” dùng để chỉ cùng protein (hoặc cùng gen khi đề cập đến nó) và được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này. Theo một số phương án, thể dung hợp tái tổ hợp có chứa phần kháng thể đơn dòng mà đặc hiệu đối với ErbB3. ErbB3 (tyrosin kinaza thụ thể erb-b2 3) còn được biết đến trong lĩnh vực này dưới dạng FERLK, LCCS2, ErbB-3, c-erbB3, erbB3-S, MDA-BF-1, c-erbB-3, p180-ErbB3, p45-sErbB3 và p85-sErbB3.

Theo một phương án, các thuật ngữ “ErbB4”, “ErbB4 (HER4)”, “HER4” dùng để chỉ cùng protein (hoặc cùng gen khi đề cập đến nó) và được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này. ErbB4 (tyrosin kinaza thụ thể erb-b2 4) còn được biết đến trong lĩnh vực này dưới dạng ALS19 và p180erbB4.

Theo một phương án, các thuật ngữ “ErbB2”, “ErbB2 (HER2)”, “HER2” dùng để chỉ cùng protein (hoặc cùng gen khi đề cập đến nó) và được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này. ErbB2 (tyrosin kinaza thụ thể erb-b2 2) còn được biết đến trong lĩnh vực này dưới dạng NEU, NGL, TKR1, CD340, HER-2, MLN 19 và HER-2/neu.

Thuật ngữ “hoạt tính,” như dùng trong bản mô tả này, dùng để chỉ mảnh có hoạt tính sinh học hoặc chức năng sinh học. Theo một số phương án, hoạt tính này bằng hoặc xấp xỉ hoạt tính của protein kiểu đại.

Thuật ngữ “đối tượng” như dùng trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật có vú, bao gồm, ví dụ như, người, động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ như, khỉ), chuột nhắt, lợn, bò, dê, thỏ, chuột cống, chuột lang, chuột đồng, ngựa, khỉ, cừu, hoặc động vật có vú không phải là người khác, động vật không phải là động vật có vú, bao gồm, ví dụ như, động vật có xương sống không phải là động vật có vú, chẳng hạn như chim (ví dụ như, gà hoặc vịt) hoặc cá; và động vật không xương sống không phải là động vật có vú. Theo một số phương án, phương pháp và được phẩm theo sáng chế được sử dụng để điều

trị (cả phòng ngừa và/hoặc trị liệu) động vật không phải là người. Thuật ngữ “đối tượng” cũng có thể dùng để chỉ bệnh nhân, tức là cá thể đang đợi hoặc đang tiếp nhận sự chăm sóc y tế.

Thuật ngữ “dược phẩm” trong bản mô tả này có nghĩa là hợp phần thích hợp để sử dụng làm dược phẩm ở đối tượng, bao gồm động vật hoặc con người. Dược phẩm thường có chứa lượng hữu hiệu của tác nhân hoạt tính (ví dụ như, protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế) và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng (ví dụ như, chất đệm, chất bổ trợ, hoặc dạng tương tự).

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” có nghĩa là liều lượng hoặc lượng đủ để tạo ra kết quả mong muốn. Kết quả mong muốn có thể có chứa sự cải thiện khách quan hoặc chủ quan ở thể nhận của liều lượng hoặc lượng (ví dụ như, sống sót trong thời gian dài, giảm số lượng và/hoặc kích thước khối u, ngăn ngừa hữu hiệu tình trạng bệnh, v.v.).

“Việc điều trị phòng ngừa” là việc điều trị được dùng cho đối tượng không thể hiện dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh, bệnh lý, hoặc rối loạn y học, hoặc chỉ thể hiện dấu hiệu hoặc triệu chứng sớm của bệnh, bệnh lý, hoặc rối loạn, sao cho việc điều trị được dùng nhằm mục đích giảm bớt, ngăn ngừa, hoặc làm giảm nguy cơ phát triển bệnh, bệnh lý, hoặc rối loạn y học. Việc điều trị phòng ngừa hoạt động dưới dạng việc điều trị ngăn ngừa chống lại bệnh hoặc rối loạn. “Hoạt tính phòng ngừa” là hoạt tính của tác nhân, chẳng hạn như protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế, hoặc hợp phần của chúng, mà, khi được dùng cho đối tượng không thể hiện dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh lý, bệnh hoặc rối loạn (hoặc chỉ thể hiện dấu hiệu hoặc triệu chứng sớm của bệnh lý, bệnh, hoặc rối loạn) làm giảm bớt, ngăn ngừa, hoặc làm giảm nguy cơ phát triển bệnh lý, bệnh, hoặc rối loạn của đối tượng. Tác nhân hoặc hợp chất “hữu dụng để phòng ngừa” (ví dụ như, protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế) dùng để chỉ tác nhân hoặc hợp chất mà hữu dụng trong việc giảm bớt, ngăn ngừa, điều trị, hoặc làm giảm sự phát triển của bệnh lý, bệnh hoặc rối loạn.

“Việc điều trị trị liệu” là việc điều trị được dùng cho đối tượng thể hiện triệu chứng hoặc dấu hiệu của bệnh lý, bệnh, hoặc rối loạn, trong đó việc điều trị được dùng cho đối tượng nhằm mục đích giảm bớt hoặc triệt tiêu các dấu hiệu hoặc triệu chứng này của bệnh lý, bệnh, hoặc rối loạn. “Hoạt tính trị liệu” là hoạt tính của tác nhân, protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế, hoặc hợp phần của chúng, mà triệt tiêu hoặc làm giảm bớt dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh lý, bệnh hoặc rối loạn, khi được dùng cho đối tượng mắc các dấu hiệu hoặc triệu chứng này. Tác nhân hoặc hợp chất “hữu dụng để trị liệu” (ví dụ như, protein dung hợp tái tổ

hợp theo sáng chế) chỉ ra rằng tác nhân hoặc hợp chất hữu dụng trong việc giảm bớt, điều trị, hoặc triệt tiêu dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh lý, bệnh hoặc rối loạn.

Thuật ngữ "điều trị ung thư" như dùng trong bản mô tả này, trừ khi có chỉ dẫn khác, có nghĩa là làm đảo ngược, làm nhẹ bớt, ức chế sự tiến triển, hoặc ngăn ngừa, một phần hoặc toàn bộ, sự phát triển của khối u, sự di căn khối u, hoặc tế bào gây ung thư hoặc tạo u khác ở đối tượng. Thuật ngữ "việc điều trị" như dùng trong bản mô tả này, trừ khi có chỉ dẫn khác, dùng để chỉ hoạt động điều trị.

Thuật ngữ “điều trị bệnh tim mạch” như dùng trong bản mô tả này, trừ khi có chỉ dẫn khác, có nghĩa là ngăn ngừa, ức chế, kìm hãm, làm chậm, làm đảo ngược, hoặc làm nhẹ bớt, một phần hoặc toàn bộ, sự khởi phát của bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch ở đối tượng, hoặc sự tiến triển của bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch đã tồn tại từ trước, hoặc triệu chứng của chúng, ở đối tượng. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế về bệnh tim mạch mà có thể được điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm suy tim mãn tính / suy tim sung huyết (congestive heart failure - CHF), suy tim cấp tính / nhồi máu cơ tim (myocardial infarction - MI), loạn chức năng tâm thu tâm thất trái, tổn thương tái tưới máu kết hợp với MI, sự gây độc tim do hóa trị liệu gây ra (người lớn hoặc trẻ em), sự gây độc tim do xạ trị gây ra, phụ thêm vào sự can thiệp phẫu thuật ở bệnh tim bẩm sinh ở trẻ em. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế về triệu chứng của bệnh tim mạch bao gồm hơi thở ngắn, ho, tăng cân nhanh, sưng cẳng chân, mắt cá chân và bụng, hoa mắt, mệt mỏi, yếu ớt, hoa mắt, đau ngực, ngất (bất tỉnh), nhịp tim nhanh và nhịp tim chậm. Phương pháp xác định sự tiến triển của bệnh tim mạch và hiệu quả của việc điều trị là rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ như, sự tiến triển của các bệnh tim mạch khác nhau có thể được xác định bằng phân suất tống máu, điện tâm đồ (ECG), theo dõi Holter, siêu âm tim đồ, thử nghiệm ứng suất, thủ thuật thông tim, quét xạ hình vi tính (computerized tomography - CT) tim và chụp cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging - MRI) tim.

Thuật ngữ “điều trị bệnh liên quan đến hệ thần kinh trung ương (CNS)” như dùng trong bản mô tả này, trừ khi có chỉ dẫn khác, có nghĩa là phương pháp ngăn ngừa, ức chế, kìm hãm, làm chậm, làm đảo ngược hoặc làm nhẹ bớt, một phần hoặc toàn bộ, sự khởi phát của bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến CNS ở đối tượng. Thuật ngữ “điều trị bệnh liên quan đến CNS” cũng có thể có nghĩa là làm đảo ngược, làm chậm hoặc theo cách khác làm nhẹ bớt bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến CNS đã tồn tại từ trước, hoặc triệu chứng của chúng. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế về bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến CNS mà

có thể được điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm chứng xơ cứng teo cơ một bên (amyotrophic lateral sclerosis - ALS), bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, chứng liệt Bell, chứng động kinh và co giật, Hội chứng Guillain-Barre, đột quỵ, chấn thương sọ não, đa xơ cứng hoặc dạng kết hợp. Việc điều trị bệnh liên quan đến CNS có thể cải thiện hoặc ngăn ngừa triệu chứng chẳng hạn như run, vận động chậm, căng cơ, mất cân bằng, tư thế suy yếu, thay đổi giọng nói, mất kiểm soát vận động, bại liệt, khó nuốt, chuột rút, co giật, mất trí nhớ và lú lẫn.

Các thuật ngữ “tương đồng” hoặc “tỉ lệ phần trăm tương đồng,” trong ngữ cảnh của hai hoặc hơn hai axit nucleic hoặc trình tự polypeptit, dùng để chỉ hai hoặc hơn hai trình tự hoặc trình tự con mà giống nhau hoặc có tỉ lệ phần trăm xác định của các nucleotit hoặc các gốc axit amin mà giống nhau, khi được so sánh và được sắp xếp thẳng hàng để tương ứng tối đa. Để xác định tỉ lệ phần trăm tương đồng, các trình tự được sắp xếp thẳng hàng nhằm mục đích so sánh tối ưu (ví dụ như, các chỗ cách quãng có thể được đưa vào trong trình tự của trình tự axit amin hoặc axit nucleic thứ nhất để sắp xếp thẳng hàng tối ưu với trình tự axit amin hoặc axit nucleic thứ hai). Sau đó các gốc axit amin hoặc các nucleotit ở các vị trí axit amin hoặc các vị trí nucleotit tương ứng được so sánh. Khi vị trí trong trình tự thứ nhất được chiếm giữ bởi cùng gốc axit amin hoặc nucleotit như vị trí tương ứng trong trình tự thứ hai, thì các phân tử tương đồng nhau ở vị trí đó. Tỉ lệ phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là hàm số của số lượng vị trí giống nhau giữa các trình tự (tức là, % tương đồng = $\frac{\text{số vị trí tương đồng}}{\text{tổng số vị trí}} \times 100$) (ví dụ như, các vị trí gộp lên nhau) $\times 100$). Theo một số phương án, hai trình tự có cùng chiều dài.

Thuật ngữ “về cơ bản tương đồng,” trong ngữ cảnh của hai axit nucleic hoặc polypeptit, dùng để chỉ hai hoặc hơn hai trình tự hoặc trình tự con mà có độ tương đồng ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, hoặc độ tương đồng ít nhất là 99% (ví dụ như, như được xác định bằng cách sử dụng một trong các phương pháp được nêu dưới đây).

Như dùng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “liên kết”, “liên kết đặc hiệu với” hoặc “đặc hiệu đối với” dùng để chỉ các tương tác có thể đo được và có thể tạo lại được chẳng hạn như sự liên kết giữa đích và kháng thể, mà xác định sự có mặt của đích trong sự có mặt của quần thể dị loại của các phân tử bao gồm các phân tử sinh học. Ví dụ như, kháng thể mà liên kết đặc hiệu với đích (mà có thể là epitop) là kháng thể mà liên kết đích này với ái lực lớn hơn, ái tính lớn hơn, dễ dàng hơn, và/hoặc với khoảng thời gian lớn hơn khi nó liên kết với

đích khác. Theo một phương án, mức độ của sự liên kết của kháng thể với đích không liên quan nhỏ hơn khoảng 10% của sự liên kết của kháng thể với đích như được đo, ví dụ như, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay: RIA). Theo các phương án nhất định, kháng thể mà liên kết đặc hiệu với đích có hằng số phân ly (K_d) $< 1 \mu\text{M}$, $< 100 \text{ nM}$, $< 10 \text{ nM}$, $< 1 \text{ nM}$, hoặc $< 0,1 \text{ nM}$.

Theo các phương án nhất định, kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop trên protein mà được bảo toàn giữa protein từ các loài khác nhau. Theo phương án khác, sự liên kết đặc hiệu có thể bao gồm, nhưng không đòi hỏi sự liên kết độc quyền.

Như dùng trong bản mô tả này, các danh từ ở dạng số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều trừ khi ngữ cảnh chỉ ra rõ ràng theo cách khác. Do đó, ví dụ như, việc đề cập đến “neuregulin” hoặc “peptit neuregulin” bao gồm hỗn hợp của các neuregulin này, các đồng phân neuregulin, và/hoặc các polypeptit giống neuregulin. Việc đề cập đến “chế phẩm” hoặc “phương pháp” bao gồm một hoặc nhiều chế phẩm, phương pháp, và/hoặc bước của kiểu được mô tả trong bản mô tả này và/hoặc sẽ trở nên rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực khi đọc phần bộc lộ này.

Thuật ngữ “polypeptit” dùng để chỉ polyme của axit amin và dạng tương đương của nó và không dùng để chỉ chiều dài cụ thể của sản phẩm; do đó, “peptit” và “protein” được bao gồm trong định nghĩa của polypeptit. Cũng được bao gồm trong định nghĩa của polypeptit là “kháng thể” như được định nghĩa trong bản mô tả này. “Vùng polypeptit” dùng để chỉ đoạn của polypeptit, đoạn này có thể chứa, ví dụ như, một hoặc nhiều miền hoặc mô típ (ví dụ như, vùng polypeptit của kháng thể có thể chứa, ví dụ như, một hoặc nhiều vùng xác định bổ sung (complementarity determining region - CDR)). Thuật ngữ “mảnh” dùng để chỉ phần của polypeptit tốt hơn là có ít nhất là 20 axit amin liên kề hoặc ít nhất là 50 axit amin liên kề của polypeptit.

Trừ khi có chỉ dẫn khác bởi ngữ cảnh, “dẫn xuất” là polypeptit hoặc mảnh của chúng có một hoặc nhiều sự thay đổi axit amin không bảo toàn hoặc bảo toàn tương quan với polypeptit thứ hai (còn được đề cập đến dưới dạng “biến thể”); hoặc polypeptit hoặc mảnh của chúng mà được cải biến bằng sự gắn cộng hóa trị của phân tử thứ hai chẳng hạn như, ví dụ như, bằng sự gắn của polypeptit khác loại, hoặc bằng sự glycosyl hóa, sự axetyl hóa, sự phosphoryl hóa, và dạng tương tự. Cũng được bao gồm trong định nghĩa của “dẫn xuất” là, ví dụ như, polypeptit chứa một hoặc nhiều chất tương tự của axit amin (ví dụ như, axit amin không tự

nhiên và dạng tương tự), polypeptit với các liên kết không được thể, cũng như là các cải biến khác đã biết trong lĩnh vực, cả có trong tự nhiên và không có trong tự nhiên.

Polypeptit "được phân lập" là polypeptit mà đã được nhận diện và được phân tách và/hoặc được thu hồi từ thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Thành phần tạp chất của môi trường tự nhiên của nó là nguyên liệu mà gây trở ngại cho việc sử dụng để chẩn đoán hoặc trị liệu đối với polypeptit, và có thể bao gồm enzym, hormon, và các chất tan là protein hoặc không là protein khác. Polypeptit đã được phân lập bao gồm kháng thể đã được phân lập, hoặc mảnh hoặc dẫn xuất của chúng.

Thuật ngữ "khoảng" như dùng trong bản mô tả này có nghĩa là trong thuật ngữ định lượng cộng hoặc trừ 5%, hoặc theo phương án khác cộng hoặc trừ 10%, hoặc theo phương án khác cộng hoặc trừ 15%, hoặc theo phương án khác cộng hoặc trừ 20%.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học dùng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về. Mặc dù phương pháp hoặc nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với những gì được mô tả ở đây có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên được mô tả dưới đây. Tất cả các tài liệu công bố được đề cập trong bản mô tả này được kết hợp ở đây để tham khảo nhằm mục đích bộc lộ và mô tả nguyên liệu mà tài liệu tham khảo này được viện dẫn liên quan đến nó.

Protein dung hợp tái tổ hợp – Kháng thể

Sáng chế này sử dụng protein dung hợp tái tổ hợp có chứa thể dung hợp giữa kháng thể đơn dòng dung hợp với mảnh của đồng phân protein neuregulin-1 để sử dụng ở nhiều chỉ định tim mạch và thần kinh. Theo các phương án điển hình, kháng thể này đặc hiệu đối với ERBB3 (HER3).

Như sử dụng trong bản mô tả này, "kháng thể" dùng để chỉ protein có chứa một hoặc nhiều polypeptit về cơ bản hoặc một phần được mã hóa bởi các gen globulin miễn dịch hoặc mảnh của các gen globulin miễn dịch. Gen globulin miễn dịch được nhận diện bao gồm các gen vùng không đổi kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon, và mu, cũng như là vô số gen vùng biến đổi globulin miễn dịch. Chuỗi nhẹ được phân loại thành kappa hoặc lambda. Chuỗi nặng được phân loại thành gamma, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, mà đến lượt nó lần lượt xác định lớp globulin miễn dịch, IgG, IgM, IgA, IgD và IgE. Đơn vị cấu trúc globulin miễn dịch điển hình (ví dụ như kháng thể) có chứa tetrame. Mỗi tetrame được tạo thành bởi

hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (khoảng 25 kD) và một chuỗi "nặng" (khoảng 50-70 kD). Đầu tận cùng N của mỗi chuỗi xác định vùng biến đổi có khoảng từ 100 đến 110 hoặc nhiều axit amin hơn chịu trách nhiệm chính cho sự nhận diện kháng nguyên. Các thuật ngữ vùng chuỗi nhẹ biến đổi (VL) và vùng chuỗi nặng biến đổi (VH) lần lượt dùng để chỉ chuỗi nhẹ và chuỗi nặng.

Kháng thể tồn tại dưới dạng globulin miễn dịch nguyên vẹn hoặc dưới dạng một số mảnh đã được xác định rõ đặc điểm được tạo ra bằng cách phân giải bằng các peptidaza khác nhau. Do đó, ví dụ, pepsin phân giải kháng thể dưới liên kết disulfua trong vùng bản lề để tạo ra $F(ab')_2$, đime của Fab mà bản thân nó là chuỗi nhẹ được kết hợp với VH-CH1 bằng liên kết disulfua. $F(ab')_2$ có thể bị khử trong điều kiện dạn để phá vỡ liên kết disulfua trong vùng bản lề, bằng cách đó biến đổi đime $F(ab')_2$ thành monome Fab'. Monome Fab' về cơ bản là Fab với một phần của vùng bản lề (xem, *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed., Raven Press, New York (1999), về phần mô tả chi tiết hơn về mảnh kháng thể khác). Mặc dù các mảnh kháng thể khác nhau được xác định tạo ra từ sự phân giải của kháng thể nguyên vẹn, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rõ rằng mảnh Fab' này, v.v. có thể được tổng hợp mới bằng phương pháp hóa học hoặc bằng cách sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp. Do đó, thuật ngữ kháng thể, như dùng trong bản mô tả này còn bao gồm mảnh kháng thể được sản xuất bằng sự cải biến của kháng thể nguyên vẹn hoặc được tổng hợp de novo bằng cách sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp. Kháng thể bao gồm kháng thể đơn chuỗi, bao gồm kháng thể Fv đơn chuỗi (sFv hoặc scFv) trong đó chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi được kết hợp với nhau (trực tiếp hoặc thông qua cầu nối peptit) để tạo thành polypeptit liên tục. Kháng thể bao gồm kháng thể đơn miền, mà có chứa mảnh kháng thể gồm có miền biến đổi kháng thể dạng monome đơn lẻ mà có thể liên kết một cách chọn lọc với miền kháng nguyên. Kháng thể đơn miền ví dụ bao gồm mảnh VHH, mà ban đầu được phân lập từ lạc đà.

Miền kháng thể của protein dung hợp tùy ý có chứa tất cả hoặc một phần của phân tử globulin miễn dịch và tùy ý chứa tất cả hoặc một phần của vùng biến đổi globulin miễn dịch (tức là, khu vực đặc hiệu đối với kháng nguyên liên quan đến bệnh) và tùy ý có chứa (các) vùng được mã hóa bằng gen V, và/hoặc gen D và/hoặc gen J.

Như giải thích ở trên (xem, Định nghĩa, ở trên) kháng thể dùng trong bản mô tả này tùy ý có chứa $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, Fab, Fab', scFv, kháng thể đơn miền, v.v. tùy thuộc vào các yêu cầu cụ thể của phương án. Một số phương án sử dụng protein dung hợp có chứa miền IgG. Tuy nhiên, các phương án khác có chứa các globulin miễn dịch khác chẳng hạn như

IgM, IgA, IgD, và IgE. Ngoài ra, tất cả các isotyp có thể có của các globulin miễn dịch khác nhau cũng được bao hàm ở trong các phương án này. Do đó, IgG1, IgG2, IgG3, v.v. là tất cả các phân tử có thể có trong miền kháng thể của protein dung hợp kháng thể-thể kích thích miễn dịch dùng trong sáng chế. Ngoài việc chọn trong việc lựa chọn loại globulin miễn dịch và isotyp, các phương án khác nhau của sáng chế có chứa các vùng bản lề khác nhau (hoặc dạng tương đương chức năng của chúng). Các vùng bản lề này tạo ra sự linh hoạt giữa các miền khác nhau của protein dung hợp kháng thể-thể kích thích miễn dịch. Xem, ví dụ như, Penichet, et al. 2001 “Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer” J Immunol Methods 248:91-101.

Theo một số phương án, mAb được chứa bởi protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế là đơn đặc hiệu đối với ErbB3 (HER3)).

HER3 người (ErbB-3, ERBB3, c-erbB-3, c-erbB3, thụ thể tyrosin-protein kinaza erbB-3) mã hóa cho thành viên của họ thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGFR) của thụ thể tyrosin kinaza mà còn bao gồm HER1 (còn gọi là EGFR), HER2, và HER4 (Kraus, M.H. et al, PNAS 86 (1989) 9193-9197; Plowman, G.D. et al, PNAS 87 (1990) 4905-4909; Kraus, M.H. et al, PNAS 90 (1993) 2900-2904). Giống như thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì nguyên mẫu, thụ thể HER3 xuyên màng gồm có miền liên kết phối tử ngoại bào (ECD), miền đime hóa ở trong ECD, miền xuyên màng, miền protein tyrosin kinaza nội bào (TKD) và miền phosphoryl hóa ở đầu tận cùng C. Protein HER3 liên kết màng này có miền liên kết Heregulin (HRG) ở trong miền ngoại bào mà không có miền kinaza hoạt tính. Do đó nó có thể liên kết phối tử này nhưng không truyền tín hiệu vào tế bào qua sự phosphoryl hóa protein. Tuy nhiên, nó tạo thành đime dị loại với các thành viên họ HER khác mà có hoạt tính kinaza. Sự đime hóa dị loại dẫn đến sự hoạt hóa của con đường truyền tín hiệu qua trung gian thụ thể và sự chuyển phosphoryl hóa của miền nội bào của nó. Sự tạo thành đime giữa các thành viên họ HER mở rộng tiềm năng truyền tín hiệu của HER3 và là phương tiện không chỉ để đa dạng hóa tín hiệu mà còn khuếch đại tín hiệu. Ví dụ như đime dị loại HER2/HER3 gây cảm ứng một trong số các tín hiệu phân bào quan trọng nhất thông qua con đường PI3K và AKT trong số các thành viên họ HER (Sliwkowski M.X., et al, J. Biol. Chem. 269 (1994) 14661-14665; Alimandi M, et al, Oncogene. 10 (1995) 1813- 1821; Hellyer, N.J., J. Biol. Chem. 276 (2001) 42153-4261; Singer, E., J. Biol.

Theo một phương án, protein ERBB3 người có chứa trình tự axit amin sau đây được cung cấp trong GenBank AAH02706.1 và được nêu trong SEQ ID NO: 1:

MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLY
 KLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVR
 GTQVYDYGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTID
 WRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCQTLTKTICAPQCNGH
 CFGPNPNQCCHDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQPLVYNKLTFFQLE
 PNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLC
 PKAF (SEQ ID NO: 1). Cần hiểu rằng trình tự ERBB3 (HER3) được nhắm đích bởi kháng
 thể của phương pháp và được phẩm này có thể là đồng phân, thể tương đồng, hoặc biến thể
 của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án, mAb của protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây là
 mAb kháng-HER3 mà ức chế sự truyền tín hiệu NRG-1 qua ErbB3 (HER3).

Theo phương án cụ thể, mAb được chứa bởi protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng
 chế có chứa mAb kháng-HER3. Kháng thể kháng-HER3 này có thể bao gồm, nhưng không
 giới hạn ở các chất sau đây: patritumab, seribantumab (mAb hoàn toàn ở người), LJM716,
 KTN3379, AV-203, REGN1400, GSK2849330, hoặc MM-141. Kháng thể này có thể còn
 được chọn từ dạng bất kỳ trong số các dạng sau đây, bao gồm, dạng khảm, dạng đặc hiệu kép,
 dạng không phải ở người, dạng hoàn toàn ở người, hoặc dạng được làm cho giống người,
 miễn là chúng liên kết với và ức chế sự truyền tín hiệu từ ERBB3 người (HER3). Theo một
 số phương án, kháng thể kháng-HER3 có nguồn gốc từ người.

Theo một số phương án, thuật ngữ "kháng thể" bao hàm các dạng khác nhau của cấu
 trúc kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể nguyên vẹn và mảnh kháng thể.
 Kháng thể theo sáng chế tốt hơn là kháng thể người, kháng thể được làm cho giống người,
 kháng thể khảm, hoặc kháng thể được thiết kế di truyền khác miễn là các tính chất đặc trưng
 theo sáng chế được giữ lại. "Mảnh kháng thể" có chứa phần của kháng thể chiều dài đầy đủ,
 tốt hơn là miền biến đổi của chúng, hoặc ít nhất là vị trí liên kết kháng nguyên của chúng. Ví
 dụ về mảnh kháng thể bao gồm diabody, phân tử kháng thể đơn chuỗi, và kháng thể đa đặc
 hiệu được tạo thành từ mảnh kháng thể. Kháng thể scFv, ví dụ như, được mô tả trong Huston,
 J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88. Ngoài ra, mảnh kháng thể có chứa polypeptit
 đơn chuỗi có các đặc điểm của miền V_H , cụ thể là có thể lắp ráp cùng với miền V_L , hoặc của
 miền V_L liên kết với kháng nguyên tương ứng có thể lắp ráp với miền V_H với vị trí liên kết
 kháng nguyên chức năng và bằng cách đó tạo ra các tính chất này của kháng thể theo sáng
 chế. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "hợp phần kháng thể đơn dòng" như được sử dụng

trong bản mô tả này dùng để chỉ chế phẩm của phân tử kháng thể của hợp phần axit amin đơn lẻ.

Theo một số phương án, kháng thể khảm có thể được sử dụng trong dược phẩm và phương pháp được đề xuất ở đây. Theo một phương án, thuật ngữ "kháng thể khảm" dùng để chỉ kháng thể đơn dòng có chứa vùng biến đổi, tức là, vùng liên kết, từ chuột nhắt và ít nhất là một phần của vùng không đổi có nguồn gốc từ nguồn hoặc loài khác, thường được điều chế bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Kháng thể khảm có chứa vùng biến đổi chuột nhắt và vùng không đổi người được đặc biệt ưu tiên. Kháng thể khảm chuột cống/người này là sản phẩm của các gen globulin miễn dịch được biểu hiện có chứa các đoạn ADN mã hóa cho vùng biến đổi globulin miễn dịch chuột cống và các đoạn ADN mã hóa cho vùng không đổi globulin miễn dịch người. Các dạng khác của "kháng thể khảm" bao hàm bởi sáng chế này là các dạng trong đó lớp hoặc phân lớp đã được cải biến hoặc được thay đổi từ lớp hoặc phân lớp của kháng thể ban đầu. Kháng thể "khảm" này còn được đề cập đến dưới dạng "kháng thể được chuyển đổi lớp." Phương pháp sản xuất kháng thể khảm bao gồm các kỹ thuật ADN tái tổ hợp và chuyển nạp gen thông thường đã biết hiện nay rõ trong lĩnh vực. Xem, ví dụ như, Morrison, S.L., et al, Proc. Natl. Acad Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238 và US 5,204,244.

Theo một phương án, kháng thể được làm cho giống người có thể được sử dụng trong dược phẩm và phương pháp được đề xuất ở đây. Theo một số phương án, thuật ngữ "kháng thể được làm cho giống người" hoặc "phiên bản được làm cho giống người của kháng thể" dùng để chỉ kháng thể trong đó khung hoặc "vùng xác định bổ sung" (CDR) đã được cải biến để có chứa các CDR của globulin miễn dịch có độ đặc hiệu khác nhau so với độ đặc hiệu của globulin miễn dịch mẹ. Theo các phương án khác, các CDR của VH và VL được ghép vào vùng khung của kháng thể người để điều chế "kháng thể được làm cho giống người." Xem ví dụ như Riechmann, L., et al, Nature 332 (1988) 323-327; và Neuberger, M.S., et al, Nature 314 (1985) 268-270. Các vùng khung biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể có nguồn gốc từ các trình tự kháng thể người giống nhau hoặc khác nhau. Trình tự kháng thể người có thể là trình tự của kháng thể người có trong tự nhiên. Các vùng khung biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được liệt kê ví dụ như trong Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology (2000) - Phụ lục IP A.1P,1-A.1P.37 và có thể tiếp cận được thông qua IMGT, hệ thống thông tin ImMunoGeneTics quốc tế® (<http://imgt.cines.fr>) hoặc thông qua <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>. Một cách tùy ý vùng khung có thể được cải biến bằng các đột biến khác nữa. Các CDR được đặc biệt ưu tiên tương ứng với các trình tự đại diện này

nhận diện các kháng nguyên được ghi chú ở trên đối với kháng thể khảm. Thuật ngữ "kháng thể được làm cho giống người" như dùng trong bản mô tả này còn chứa kháng thể mà được cải biến trong vùng không đổi để tạo ra các tính chất theo sáng chế, đặc biệt là đối với sự liên kết thành phần bổ thể 1q (C1q) và/hoặc sự liên kết thụ thể Fc (FcR), ví dụ như bằng cách "chuyển đổi lớp" tức là sự thay đổi hoặc đột biến của phần Fc (ví dụ như từ IgG1 thành IgG4 và/hoặc đột biến IgG1/IgG4). Thuật ngữ "kháng thể người", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và các vùng không đổi có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người. Kháng thể người đã được biết rõ trong lĩnh vực (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Kháng thể người cũng có thể được sản xuất ở động vật chuyển gen (ví dụ như, chuột nhắt) mà có khả năng, khi gây miễn dịch, sản xuất danh mục đầy đủ hoặc sự chọn lọc của kháng thể người khi không có mặt sự sản xuất globulin miễn dịch nội sinh. Việc chuyển của gen globulin miễn dịch dòng mầm người ở chuột nhắt đột biến dòng mầm sẽ dẫn đến sự sản xuất của kháng thể người khi thử thách kháng nguyên (xem, ví dụ như, Jakobovits, A., et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al, *Nature* 362 (1993) 255-258; Brueggemann, M.D., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40). Kháng thể người cũng có thể được sản xuất trong thư viện hiển thị phago (Hoogenboom, H.R., and Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581- 597). Các kỹ thuật của Cole, A. và cộng sự và Boerner, P. và cộng sự cũng có sẵn để điều chế kháng thể đơn dòng người (Cole, A., et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Liss, A.L., p. 77 (1985); và Boerner, P., et al, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Như đã được đề cập đối với kháng thể được làm cho giống người theo sáng chế thuật ngữ "kháng thể người" như dùng trong bản mô tả này còn chứa kháng thể mà được cải biến trong vùng không đổi để tạo ra các tính chất theo sáng chế.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, mAb được chứa bởi protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây có chứa ít nhất là một đột biến trong miền hoặc vùng Fc.

Thuật ngữ "kháng thể người tái tổ hợp", như dùng trong bản mô tả này, được dự định bao gồm tất cả các kháng thể người mà được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng phương thức tái tổ hợp, chẳng hạn như kháng thể được phân lập từ tế bào chủ, ví dụ như tế bào NS0 hoặc CHO hoặc từ động vật (ví dụ như chuột nhắt) mà là chuyển gen đối với các gen globulin miễn dịch người hoặc kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nạp vào tế bào chủ. Kháng thể người tái tổ hợp này

có các vùng biến đổi và không đổi ở dạng được sắp xếp lại. Kháng thể người tái tổ hợp theo sáng chế được đưa đi gây siêu đột biến sinh dưỡng in vivo. Do đó, trình tự axit amin của các vùng VH và VL của kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, mặc dù có nguồn gốc từ và có liên quan đến các trình tự VH và VL dòng mầm người, có thể không tồn tại trong tự nhiên ở trong danh mục dòng mầm kháng thể người in vivo.

Theo một số phương án, các thuật ngữ "mà liên kết với HER3 người", "mà liên kết đặc hiệu với HER3 người", hoặc "kháng thể kháng-HER3" có thể thay thế lẫn nhau và dùng để chỉ kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên HER3 người với giá trị KD bằng khoảng $4,81 \times 10^{-10}$ mol/l hoặc thấp hơn ở nhiệt độ 25°C. Ái lực liên kết được xác định bằng thử nghiệm liên kết tiêu chuẩn ở nhiệt độ 25°C, chẳng hạn như kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Thụy Điển). Do đó "kháng thể mà liên kết với HER3 người" như dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể hoặc phần của chúng mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên HER3 người với ái lực liên kết với KD nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l đến $1,0 \times 10^{-13}$ mol/l) ở nhiệt độ 25°C, và tốt hơn là với giá trị KD bằng $4,81 \times 10^{-10}$ mol/l hoặc thấp hơn ở nhiệt độ 25°C.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng-HER3 được chứa bởi protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL). Theo một phương án, kháng thể có chứa các trình tự VH và VL lần lượt trong SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 3; và có một hoặc nhiều tính chất sau đây: sự ức chế của sự phosphoryl hóa HER3 trong tế bào khối u, sự ức chế của sự phosphoryl hóa AKT trong tế bào khối u, sự ức chế của sự truyền tín hiệu qua ErbB3 (HER3), và sự ức chế của sự tăng sinh của tế bào khối u.

Theo một phương án, mAb kháng-HER3 được đề xuất ở đây có chứa trình tự axit amin VH được nêu trong SEQ ID NO: 2:

Chuỗi Nặng:

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFSGYYWSWIRQP
PGKGLEWIGE INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VETSKNQFSL KLSSVTAADT
AVYYCARDKW TWYFDLWGRG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA
ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVP
SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEFLGGPAV
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK

PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHAHYTQKS
LSLSPGK (SEQ ID NO: 2).

Theo một phương án, mAb kháng-HER3 được đề xuất ở đây có chứa trình tự axit amin VL nêu trong SEQ ID NO: 3:

Chuỗi Nhẹ:

DIEMTQSPDS LAVSLGERAT INCRSSQSVL YSSSNRNYLA WYQQNPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQYYST
PRTFGQGTKV EIKRTVAAPS VFIFPSDEQ LKSGTASVVC LLNMFYPREA
KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDYSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC
EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3).

Theo một phương án, kháng thể kháng-HER3 theo sáng chế có chứa ít nhất là một đột biến trong vùng Fc. Theo phương án khác, kháng thể kháng-HER3 trưởng thành (tức là- thiếu peptit tín hiệu) của sáng chế có chứa ít nhất là một đột biến ở các axit amin 234, 239, 434, hoặc dạng kết hợp của chúng, trong đó theo các phương án khác, các đột biến axit amin có chứa ít nhất là một trong các đột biến thể sau đây: L234F, S239A, N434A hoặc dạng kết hợp của chúng. Theo phương án khác, các đột biến thành axit amin 234 và/hoặc 239 làm hạ thấp chức năng tác động của kháng thể kháng-HER3. Theo phương án khác, đột biến thành axit amin 434 kéo dài thời gian bán thải của kháng thể ở đối tượng.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều đột biến trong vùng Fc làm giảm chức năng tác động. Theo một số phương án, chức năng tác động đã được làm giảm có chứa ái lực giảm của kháng thể kháng-HER3 đối với một hoặc nhiều thụ thể Fc. Các FcR có thể là FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa (158F), FcγRIIIa (158V) và C1q. Theo một số phương án, ái lực đã được làm giảm có chứa sự tăng lên của hằng số phân ly bằng khoảng 1 bậc về độ lớn hoặc lớn hơn. Theo một số phương án, việc đưa vào một hoặc nhiều đột biến Fc làm tăng KD của kháng thể kháng-HER3 của protein dung hợp có chứa chúng đối với FcγRI từ $2,81 \times 10^{-9}$ M lên $1,03 \times 10^{-8}$ M. Theo một số phương án, việc đưa vào một hoặc nhiều đột biến Fc làm tăng KD của kháng thể kháng-HER3 của protein dung hợp có chứa chúng đối với FcγRIIa từ $3,95 \times 10^{-7}$ M lên $1,35 \times 10^{-6}$ M. Theo một số phương án, việc đưa vào một hoặc nhiều đột biến Fc làm tăng KD của kháng thể kháng-HER3 của protein dung hợp có chứa chúng đối với

Fc γ RIIb từ $1,03 \times 10^{-7}$ M lên $1,52 \times 10^{-6}$ M. Theo một số phương án, việc đưa vào một hoặc nhiều đột biến Fc làm tăng KD của kháng thể kháng-HER3 của protein dung hợp có chứa chúng đối với Fc γ RIIIa (158F) từ $6,37 \times 10^{-8}$ M lên $1,18 \times 10^{-7}$ M. Theo một số phương án, việc đưa vào một hoặc nhiều đột biến Fc làm tăng KD của kháng thể kháng-HER3 của protein dung hợp có chứa chúng đối với Fc γ RIIIa (158V) từ $3,41 \times 10^{-8}$ M lên $9,10 \times 10^{-8}$ M.

Theo một số phương án, kháng thể kháng-HER3 hoặc protein dung hợp tái tổ hợp có chứa chúng liên kết với Fc γ RI với hằng số phân ly cân bằng (KD) cao hơn hoặc bằng $1,03 \times 10^{-8}$ M. Theo một số phương án, kháng thể kháng-HER3 hoặc protein dung hợp tái tổ hợp có chứa chúng có chứa một hoặc nhiều đột biến Fc và liên kết với Fc γ RIIa với KD cao hơn hoặc bằng $1,35 \times 10^{-6}$ M. Theo một số phương án, kháng thể kháng-HER3 hoặc protein dung hợp tái tổ hợp có chứa chúng có chứa một hoặc nhiều đột biến Fc và liên kết với Fc γ RIIb với KD cao hơn hoặc bằng $1,5 \times 10^{-6}$ M. Theo một số phương án, kháng thể kháng-HER3 hoặc protein dung hợp tái tổ hợp có chứa chúng có chứa một hoặc nhiều đột biến Fc và liên kết với Fc γ RIIIa (158F) với KD cao hơn hoặc bằng $1,18 \times 10^{-7}$ M. Theo một số phương án, kháng thể kháng-HER3 hoặc protein dung hợp tái tổ hợp có chứa chúng có chứa một hoặc nhiều đột biến Fc và liên kết với Fc γ RIIIa (158V) với KD cao hơn hoặc bằng $9,10 \times 10^{-8}$ M.

Thuật ngữ “(các) chức năng tác động kháng thể” như dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ chức năng được cấu thành bởi (các) vùng Fc của Ig. Chức năng này có thể bị ảnh hưởng bởi, ví dụ như, sự liên kết của (các) vùng tác động Fc với thụ thể Fc trên tế bào miễn dịch với hoạt tính thực bào hoặc dung giải hoặc bằng sự liên kết của (các) vùng tác động Fc với các thành phần của hệ thống bổ thể.

Theo một phương án, kháng thể kháng-HER3 không gây cảm ứng sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC). Thuật ngữ "sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC)" dùng để chỉ sự dung giải của tế bào đích người bằng kháng thể theo sáng chế trong sự có mặt của tế bào tác động.

Theo một phương án theo sáng chế, kháng thể theo sáng chế được glycosyl hóa. Theo một số phương án, sự glycosyl hóa là sự N-glycosyl hóa. Theo các phương án khác, sự glycosyl hóa là sự O-glycosyl hóa.

Trong ngữ cảnh của protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây và theo sáng chế, kháng thể được chứa bởi protein dung hợp tái tổ hợp có thể được sản xuất thông qua phương thức tái tổ hợp. Các phương pháp này được biết đến rộng rãi trong tình trạng kỹ thuật của lĩnh

vực này và có chứa sự biểu hiện protein ở tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn với sự phân lập tiếp theo của polypeptit kháng thể và thường tinh chế đến độ tinh sạch chấp nhận được trong dược phẩm. Để biểu hiện protein axit nucleic mã hóa cho chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoặc mảnh của chúng được cài xen vào vector biểu hiện bằng phương pháp tiêu chuẩn. Sự biểu hiện được thực hiện trong tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn thích hợp, chẳng hạn như tế bào CHO, tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào HEK293, tế bào COS, nấm men, hoặc tế bào E. coli, và kháng thể được thu hồi từ các tế bào này (từ dịch nổi bề mặt hoặc sau khi dung giải tế bào). Sự sản xuất tái tổ hợp của kháng thể đã được biết rõ trong lĩnh vực và được mô tả, ví dụ như, trong các bài đánh giá của Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880. Kháng thể có thể có mặt trong tế bào nguyên vẹn, trong dịch tan tế bào, hoặc ở dạng được tinh chế một phần hoặc về cơ bản tinh khiết. Sự tinh chế được thực hiện để loại bỏ các thành phần tế bào khác hoặc các chất tạp nhiễm khác, ví dụ như, axit nucleic hoặc protein khác của tế bào, bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, bao gồm, sắc ký cột và các kỹ thuật khác đã được biết rõ trong lĩnh vực (xem Ausubel, F., et al, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)). Sự biểu hiện ở tế bào NSO được mô tả bởi, ví dụ như, Barnes, L.M., et al, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. Sự biểu hiện tạm thời được mô tả bởi, ví dụ như, Durocher, Y., et al, *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. Sự tách dòng của miền biến đổi được mô tả bởi Orlandi, R., et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., et al, *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Hệ thống biểu hiện tạm thời được ưu tiên (HEK 293) được mô tả bởi Schlaeger, E.-J. và Christensen, K., trong tài liệu *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83, và bởi Schlaeger, E.-J., trong tài liệu *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199. Kháng thể đơn dòng được tách một cách thích hợp từ môi trường nuôi cấy bằng quy trình tinh chế globulin miễn dịch thông thường chẳng hạn như, ví dụ, protein A-Sepharosa, sắc ký hydroxylapatit, điện di trên gel, thẩm tách, hoặc sắc ký ái lực. ADN và ARN mã hóa cho kháng thể đơn dòng được phân lập và được xác định trình tự dễ dàng bằng cách sử dụng các quy trình thông thường. Các tế bào lai có thể đóng vai trò làm nguồn của ADN và ARN này. Khi được phân lập, ADN có thể được cài xen vào vector biểu hiện, mà sau đó được chuyển nạp vào tế bào chủ, chẳng hạn như tế bào HEK 293, tế bào

CHO, hoặc tế bào u tủy mà theo cách khác không sản xuất ra protein globulin miễn dịch, để thu được sự tổng hợp của kháng thể đơn dòng tái tổ hợp trong tế bào chủ.

Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo sáng chế được kết hợp với trình tự của vùng khởi động, vị trí bắt đầu dịch mã, vùng không đổi, vùng không được dịch mã 3', vị trí polyadenyl hóa, và vị trí kết thúc phiên mã để tạo thành cấu trúc vectơ biểu hiện. Cấu trúc biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được kết hợp vào vectơ đơn lẻ, được đồng chuyển nạp, được chuyển nạp theo dây, hoặc được chuyển nạp riêng rẽ vào tế bào chủ mà sau đó được dung hợp để tạo thành tế bào chủ đơn lẻ biểu hiện cả hai chuỗi.

Hiển nhiên là kháng thể được dùng cho đối tượng ở lượng hữu hiệu để điều trị mà là lượng của hợp chất đó hoặc dạng kết hợp mà sẽ gây ra đáp ứng sinh học hoặc y học của mô, hệ thống, động vật hoặc con người mà được dò tìm bởi nhà nghiên cứu, bác sĩ thú y, bác sĩ điều trị hoặc nhà lâm sàng khác.

Protein dung hợp tái tổ hợp – Neuregulin

Theo một phương án, protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây có chứa mảnh của protein NRG-1. Protein NRG có thể liên kết với thụ thể ErbB4 trên bề mặt của tế bào cơ tim, liên tục hoạt hóa con đường tín hiệu PI3K/AKT trong tế bào, và làm thay đổi cấu trúc của tế bào cơ tim, bằng cách đó cải thiện chức năng của tế bào cơ tim.

Như sử dụng trong bản mô tả này, “neuregulin” hoặc “NRG” dùng để chỉ protein hoặc peptit mà có thể liên kết và hoạt hóa ErbB3, ErbB4 hoặc đime dị loại hoặc đime cùng loại của chúng, bao gồm các đồng phân neuregulin, miền giống EGF neuregulin, polypeptit có chứa miền giống EGF neuregulin, thể đột biến hoặc dẫn xuất neuregulin, và loại bất kỳ của sản phẩm gen giống neuregulin mà có thể hoạt hóa thụ thể nêu trên. Neuregulin còn bao gồm các protein, peptit, mảnh và hợp chất NRG-1, NRG-2, NRG-3 và NRG-4 mà có chức năng của neuregulin. Theo phương án được ưu tiên, neuregulin là protein hoặc peptit mà có thể liên kết với và hoạt hóa đime dị loại ErbB2/ErbB4 hoặc ErbB2/ErbB3, ví dụ như, nhưng không nhằm mục đích giới hạn sáng chế, peptit theo sáng chế bao gồm mảnh của đồng phân NRG-1 β 2, tức là, mảnh có 177-237 axit amin, mà chứa miền giống EGF có trình tự axit amin sau đây: SHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYK AEELYQ (SEQ ID NO: 4). Protein NRG theo sáng chế có thể hoạt hóa thụ thể nêu trên và điều hòa chức năng sinh học của chúng, ví dụ như, kích thích sự tổng hợp của thụ thể axetylcholin trong tế bào cơ xương, thúc đẩy sự biệt hóa và sự sống sót của tế bào cơ tim và

sự tổng hợp ADN. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực biết rõ rằng đột biến của axit amin đơn lẻ trong vùng không thiết yếu thường không làm thay đổi hoạt tính học của protein hoặc polypeptit thu được (xem, ví dụ như, Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub.co.,p. 224). Protein NRG theo sáng chế có thể được phân lập từ các nguồn tự nhiên, có thể được cải biến thông qua công nghệ tái tổ hợp, sự tổng hợp nhân tạo hoặc các phương tiện khác.

Như sử dụng trong bản mô tả này, “miền giống yếu tố sinh trưởng biểu bì” hoặc “miền giống EGF” dùng để chỉ mảnh polypeptit được mã hóa bằng gen neuregulin mà liên kết với và hoạt hóa ErbB3, ErbB4, hoặc đime dị loại hoặc đime cùng loại của chúng và bao gồm đime dị loại với ErbB2, và tương tự về mặt cấu trúc với vùng liên kết thụ thể EGF như được mô tả trong WO 00/64400, Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992); Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5,530,109 và 5,716,930; Hijazi et al., *Int. J. Oncol.*, 13:1061-1067 (1998); Chang et al., *Nature*, 387:509-512 (1997); Carraway et al., *Nature*, 387:512-516 (1997); Higashiyama et al., *J. Biochem.*, 122:675-680 (1997); và WO 97/09425, nội dung của chúng đều được kết hợp ở đây để tham khảo. Theo các phương án nhất định, miền giống EGF liên kết với và hoạt hóa đime dị loại ErbB2/ErbB4 hoặc ErbB2/ErbB3. Theo các phương án nhất định, miền giống EGF có chứa trình tự axit amin của miền liên kết thụ thể của NRG-1. Theo một số phương án, miền giống EGF dùng để chỉ các gốc axit amin 177-226, 177-237, hoặc 177-240 của NRG-1. Theo các phương án nhất định, miền giống EGF có chứa trình tự axit amin của miền liên kết thụ thể của neuregulin-2 (NRG-2, còn được biết đến trong lĩnh vực dưới dạng DON1, HRG2 và NTAK). Theo các phương án nhất định, miền giống EGF của NRG-2 có chứa trình tự

HARKCNETAKSYCVNGGVCYYIEGINQLSCKCPNGFFGQRCL (SEQ ID NO: 15).

Theo các phương án nhất định, miền giống EGF có chứa trình tự axit amin của miền liên kết thụ thể của neuregulin 3 (NRG-3, còn được biết đến trong lĩnh vực dưới dạng HRG3 và pro-NRG3). Theo các phương án nhất định, miền giống EGF của NRG-3 có chứa trình tự

HFKPCRDKDLAYCLNDGECFVIETLTGSHKHCRCKEGYQGVRC (SEQ ID NO: 16).

Theo các phương án nhất định, miền giống EGF có chứa trình tự axit amin của miền liên kết thụ thể của neuregulin 4 (NRG-4, còn được biết đến trong lĩnh vực dưới dạng HER4). Theo các phương án nhất định, miền giống EGF của NRG-4 có chứa trình tự

HEEPCGPSHKSFCLNGGLCYVIPTIPSPFCRCVENYTGARCE (SEQ ID NO: 17). Theo

các phương án nhất định, miền giống EGF có chứa trình tự axit amin Ala Glu Lys Glu Lys

Thr Phe Cys Val Asn Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro (SEQ ID NO: 18), như được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5,834,229.

Theo một phương án, protein NRG-1 được cung cấp trong protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này là đồng phân NRG-1 β 2a.

Theo một số phương án, mảnh NRG-1 hoạt tính có chứa miền liên kết ERBB3/4. Theo phương án liên quan khác, NRG-1 liên kết với và gây cảm ứng sự truyền tín hiệu qua ErbB4 (HER4). Theo các phương án khác, mAb ức chế sự truyền tín hiệu NRG-1 qua ErbB3 (HER3). Theo một số phương án, mảnh protein hoạt tính của NRG-1 có chứa miền hoạt tính của NRG-1.

Protein dung hợp tái tổ hợp – Hợp phần

Theo một phương án, trong protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này NRG-1 được dung hợp với đầu tận cùng C của chuỗi nặng kháng thể kháng-HER3 bằng cách sử dụng cầu nối. Theo khía cạnh liên quan khác, NRG-1 được gắn vào cầu nối thông qua axit amin thứ nhất (thứ 1) trên đầu tận cùng N của NRG-1, mà theo một phương án là axit amin Serin (S hoặc Ser). Protein dung hợp tái tổ hợp cụ thể được dùng trong sáng chế này có thể tùy ý được thu lấy hoặc được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực (bao gồm mua từ các nguồn thương mại). Ví dụ như, trình tự axit nucleic mã hóa cho khung kháng thể thích hợp tùy ý được tách dòng và được nối vào vector thích hợp (ví dụ như, vector biểu hiện đối với, ví dụ như, sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân chuẩn). Ngoài ra, trình tự axit nucleic mã hóa cho phân tử đồng phân NRG-1 β 2a tùy ý được tách dòng vào cùng vector theo hướng và vị trí thích hợp sao cho sự biểu hiện từ vector này sản xuất ra protein dung hợp kháng thể-đồng phân NRG-1 β 2a. Một số phương án tùy chọn còn đòi hỏi sự cải biến sau khi biểu hiện, ví dụ như, sự lắp ráp của tiểu đơn vị kháng thể, v.v.. Các kỹ thuật và nghệ thuật đối với các thao tác nêu trên (và tương tự) đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Các hướng dẫn sử dụng thích hợp được tìm thấy trong, ví dụ như, Sambrook et al., *Molecular Cloning—A Laboratory Manual* (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 và *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, hợp tác giữa Greene Publishing Associates, Inc. và John Wiley & Sons, Inc. (được bổ sung đến năm 1999). Theo một số phương án khác, miền kháng thể và đồng phân NRG-1 β 2a được lắp ráp sau khi biểu hiện thông qua, ví dụ như, các

phương thức hóa học. Theo một phương án, sáng chế đề xuất hợp phần, ví dụ như dược phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế.

Theo một phương án, protein dung hợp tái tổ hợp thúc đẩy sự tăng sinh, sự biệt hóa, và sự sống sót của tế bào cơ tim. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp thúc đẩy sự tăng sinh, sự biệt hóa và sự sống sót của mô tim. Theo một phương án, protein dung hợp tái tổ hợp thúc đẩy sự tăng sinh, sự biệt hóa, và sự sống sót của tế bào cơ tim mà không thúc đẩy sự phát triển ung thư và/hoặc khối u. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp thúc đẩy sự tăng sinh, sự biệt hóa và sự sống sót của mô tim mà không thúc đẩy sự phát triển ung thư hoặc khối u.

Theo một phương án, ung thư là ung thư biểu mô vò thượng thận, ung thư liên quan đến AIDS, u lympho liên quan đến AIDS, ung thư hậu môn, ung thư hậu môn-trực tràng, ung thư của ống hậu môn, ung thư ruột thừa, u bào hình sao tiểu não ở trẻ em, u bào hình sao não ở trẻ em, ung thư biểu mô tế bào nền, ung thư da (không phải u melanin), ung thư mật, ung thư ống dẫn mật ngoài gan, ung thư ống dẫn mật trong gan, ung thư bàng quang, ung thư bàng quang niệu đạo, ung thư xương và khớp, ung thư mô liên kết xương và u mô bào sợi ác tính, ung thư não, khối u não, u thần kinh đệm thân não, u bào hình sao tiểu não, u bào hình sao não/u thần kinh đệm ác tính, u màng não thất, u nguyên bào tủy, u ngoại bì thần kinh nguyên thủy bươu máu trên lều, u thần kinh đệm vùng dưới đồi và đường dẫn truyền thị giác, ung thư vú, u tuyến phế quản/carcinoid, khối u carcinoid, ung thư dạ dày-ruột, hệ thần kinh, u lympho hệ thần kinh, ung thư hệ thần kinh trung ương, u lympho hệ thần kinh trung ương, ung thư cổ tử cung, ung thư ở trẻ em, bệnh bạch cầu tế bào lympho mãn tính, bệnh bạch cầu tủy mãn tính, rối loạn tăng sinh tủy xương mãn tính, ung thư ruột kết, ung thư kết trực tràng, u lympho tế bào T da, khối u bạch huyết, u sùi dạng nấm, Hội chứng Sezary, ung thư nội mạc tử cung, ung thư thực quản, khối u tế bào mầm ngoài sọ, khối u tế bào mầm ngoài tuyến sinh dục, ung thư ống dẫn mật ngoài gan, ung thư mắt, u melanin trong mắt, u nguyên bào võng mạc, ung thư túi mật, ung thư dạ dày (bao tử), khối u carcinoid dạ dày-ruột, u mô đệm dạ dày-ruột (GIST), khối u tế bào mầm, khối u tế bào mầm buồng trứng, u thần kinh đệm khối u nguyên bào nuôi do thai nghén, ung thư đầu và cổ, ung thư tế bào gan (gan), u lympho Hodgkin, ung thư hạ hầu, u melanin trong mắt, ung thư mắt, khối u tế bào đảo tụy (tuyến tụy nội tiết), Sarcôm Kaposi, ung thư thận, ung thư thận, ung thư thận, ung thư thanh quản, bạch bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính, bệnh bạch cầu tế bào lympho mãn tính, bệnh bạch cầu tủy mãn tính, bạch bạch cầu tế bào lông, ung thư môi và khoang

miệng, ung thư gan, ung thư phổi, ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư phổi tế bào nhỏ, u lympho liên quan đến AIDS, u lympho không Hodgkin, u lympho hệ thần kinh trung ương nguyên phát, bệnh tăng globulin đại phân tử Waldenstroem, u nguyên bào tủy, u melanin, u melanin trong mắt (mắt), ung thư biểu mô tế bào merkel, u trung biểu mô ác tính, u trung biểu mô, ung thư cổ tế bào vảy di căn, ung thư miệng, ung thư của lưỡi, hội chứng đa u tuyến nội tiết, u sùi dạng nấm, hội chứng loạn sản tủy, bệnh loạn sản tủy/tăng sinh tủy, bệnh bạch cầu tủy mãn tính, bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính, đa u tủy, rối loạn tăng sinh tủy xương mãn tính, ung thư mũi hầu, u nguyên bào thần kinh, ung thư miệng, ung thư khoang miệng, ung thư miệng hầu, ung thư buồng trứng, ung thư biểu mô buồng trứng, khối u có khả năng ác tính thấp ở buồng trứng, ung thư tụy, ung thư tế bào đảo tụy, ung thư khoang mũi và xoang cánh mũi, ung thư tuyến cận giáp, ung thư dương vật, ung thư hầu, u tủy thượng thận, u nguyên bào tuyến tủy và u ngoại bì thần kinh nguyên thủy bướu máu trên lều, khối u tuyến yên, u tương bào/đa u tủy, u nguyên bào màng phổi, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư trực tràng, ung thư tế bào chuyển tiếp, bể thận và niệu quản, u nguyên bào võng mạc, ung thư mô liên kết cơ vân, ung thư tuyến nước bọt, họ Ewing của khối u sarcôm, Sarcôm Kaposi, sarcôm mô mềm, sarcôm biểu mô, sarcôm hoạt dịch, ung thư tử cung, sarcôm tử cung, ung thư da (không phải u melanin), ung thư da (u melanin), ung thư biểu mô da tế bào merkel, ung thư ruột non, sarcôm mô mềm, ung thư biểu mô tế bào vảy, ung thư dạ dày (bao tử), u ngoại bì thần kinh nguyên thủy bướu máu trên lều, ung thư tinh hoàn, ung thư cổ họng, u tuyến ức, u tuyến ức và ung thư biểu mô tuyến ức, ung thư tuyến giáp, ung thư tế bào chuyển tiếp của bể thận và niệu quản và các cơ quan tiết niệu khác, khối u nguyên bào nuôi do thai nghén, ung thư niệu đạo, ung thư nội mạc tử cung, sarcôm tử cung, ung thư thể tử cung, ung thư âm đạo, ung thư âm hộ, hoặc Khối u Wilm.

Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp thúc đẩy sự tăng sinh, sự biệt hóa và sự sống sót của tế bào hệ thần kinh trung ương (CNS). Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp thúc đẩy sự tăng sinh, sự biệt hóa và sự sống sót của tế bào hệ thần kinh trung ương (CNS) mà không thúc đẩy sự phát triển ung thư và/hoặc khối u. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp có khả năng giảm đi để gây cảm ứng sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

Theo một số phương án, protein dung hợp tái tổ hợp thúc đẩy sự truyền tín hiệu HER2/4 hơn là sự truyền tín hiệu HER2/3 tương quan với khả năng gây cảm ứng tín hiệu của NRG-1 tái tổ hợp.

Theo phương án cụ thể theo sáng chế, protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mAb kháng-HER3 dung hợp với hoặc được liên kết có điều khiển với đầu tận cùng C của chuỗi nặng kháng thể thông qua cầu nối GGGGSGGGGS (G4S) (SEQ ID NO: 5) với đồng phân NRG-1 β 2a nêu trong SEQ ID NO: 4. Theo một số phương án, một hoặc nhiều bản sao của cầu nối có thể được sử dụng. Theo các phương án khác, 2, 3, 4, hoặc 5 bản sao của cầu nối G4S hoặc cầu nối khác bất kỳ đã biết trong lĩnh vực là thích hợp đối với hợp phần được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được dùng trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “cầu nối” được công nhận trong lĩnh vực và dùng để chỉ phân tử (bao gồm nhưng không giới hạn ở axit nucleic hoặc axit amin chưa được cải biến hoặc đã được cải biến) hoặc nhóm của các phân tử (ví dụ như, 2 hoặc nhiều hơn, ví dụ như, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 hoặc nhiều hơn) nối hai hợp chất, chẳng hạn như hai polypeptit. Cầu nối có thể được tạo thành bởi phân tử nối đơn lẻ hoặc có thể có chứa phân tử nối và ít nhất là một phân tử đệm, được dự định để tách riêng phân tử nối và hợp chất bởi khoảng cách cụ thể.

Trình tự axit nucleic được “liên kết có điều khiển” khi nó được đặt vào mối quan hệ về mặt chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ như, tiền trình tự hoặc trình tự dẫn đầu tiết axit nucleic được liên kết có điều khiển với axit nucleic mã hóa cho polypeptit nếu nó được biểu hiện dưới dạng tiền protein mà tham gia vào sự tiết của polypeptit; vùng khởi động hoặc vùng tăng cường được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa nếu nó ảnh hưởng đến sự phiên mã của trình tự; hoặc vị trí liên kết ribosom được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa nếu nó được định vị sao cho nó làm thuận tiện cho sự dịch mã. Thông thường, “được liên kết có điều khiển” có nghĩa là các trình tự axit nucleic được liên kết nằm liền kề, và, trong trường hợp của trình tự dẫn đầu tiết, nằm liền kề và trong khung đọc. Tuy nhiên, vùng tăng cường tùy ý nằm liền kề. Sự liên kết có thể được thực hiện, ví dụ như, bằng sự nối ở các vị trí giới hạn thuận tiện. Nếu các vị trí này không tồn tại, các bộ chuyển đổi oligonucleotit tổng hợp, các cầu nối hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng. Theo phương án khác, “được liên kết có điều khiển” cũng dùng để chỉ sự bắt cặp chức năng của các trình tự axit amin, peptit hoặc protein khác biệt, như trong sự bắt cặp của kháng thể và mảnh NRG-1 được mô tả trong bản mô tả này thông qua trình tự cầu nối cũng được mô tả trong bản mô tả này.

Theo phương án khác, chuỗi nặng mAb kháng-HER3 được chứa bởi protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây được mã hóa bằng SEQ ID NO: 6:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTTGCTATAATAAAAGGTGT
CCAGTGTCAAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGAGCTGGACTGCTGAAGCCAAGCG
AGACCTGTCTCTGACATGCGCCGTGTACGGAGGATCCTTCAGCGGATACTATT
GGTCTTGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGAGATC
AACCCTCTGGCTCCACCAACTACAATCCCTCTCTGAAGTCCCGGGTGACCATC
TCCGTGGAGACAAGCAAGAATCAGTTTTCTCTGAAGCTGTCCAGCGTGACCGCC
GCTGACACAGCCGTGTACTATTGCGCTAGGGACAAGTGGACCTGGTATTTTCGAT
CTGTGGGGAAGGGGCACCCTGGTGACAGTGTCTTCCGCCTCTACAAAGGGCCCC
TCCGTGTTTCTCTGGCTCCAAGCTCTAAGAGCACCTCTGGAGGAACAGCCGCT
CTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTGACCGTGAGCTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACATTTCCCGCTGTGCTGCAGTCCAGC
GGCCTGTATAGCCTGTCTTCCGTGGTGACCGTGCCTAGCTCTTCCCTGGGCACCC
AGACATACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCTCCAATACAAAGGTGGACAAG
AGAGTGGAGCCTAAGAGCTGTGATAAGACCCATACATGCCCACCATGTCCAGCT
CCTGAGCTGCTGGGAGGACCTTCCGTGTTCTCTGTTTCTCTCCAAAGCCAAAGGAC
ACCCTGATGATCTCTCGCACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGTCC
CACGAGGATCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCA
TAATGCTAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCGGGTGG
TGTCTGTGCTGACAGTGTGACACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGGTGAGCAATAAGGCCCTGCCAGCTCCCATCGAGAAGACCATCTCTAA
GGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTATACACTGCCCCCTAGCCGCG
AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTACC
CATCTGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAACAATTATA
AGACCACACCACCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGTACTCCAAGC
TGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCTGTCAGCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTATACACAGAAATCTCTGTCCCTGAGCCCA
GGCAAGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCAGCTCTCATCTGGTGAAGT
GTGCTGAGAAGGAGAAGACCTTCTGCGTGAACGGCGGCGAGTGTTTTATGGTG
AAGGACCTGTCTAATCCATCCAGATACCTGTGCAAGTGTCCCAACGAGTTCACA
GGCGATCGCTGCCAGAATTACGTGATGGCCTCTTTTATAAGGCTGAGGAGCTG
TACCAGTAA (SEQ ID NO: 6). Theo một phương án, trình tự được nêu trong SEQ ID NO:

6 không chứa đột biến Fc. Theo một phương án, SEQ ID NO: 6 còn được đề cập đến dưới dạng “NPCF”.

Theo một phương án, protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây có chứa chuỗi nặng của mAb kháng-HER3. Theo phương án khác, chuỗi nặng mAb kháng-HER3 được mã hóa bằng SEQ ID NO: 7:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATAATAAAAGGTGT
CCAGTGTCAAGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGAGCTGGACTGCTGAAGCCAAGCG
AGACCCTGTCTCTGACATGCGCCGTGTACGGAGGATCCTTCAGCGGATACTATT
GGTCTTGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGAGATC
AACCACTCTGGCTCCACCAACTACAATCCCTCTCTGAAGTCCCGGGTGACCATC
TCCGTGGAGACAAGCAAGAATCAGTTTTCCCTGAAGCTGTCCAGCGTGACCGCC
GCTGACACAGCCGTGTACTATTGCGCTAGGGACAAGTGGACCTGGTATTTTCGAT
CTGTGGGGAAGGGGCACCCTGGTGACAGTGTCTTCCGCCTCTACAAAGGGCCCC
TCCGTGTTTCTCTGGCTCCAAGCTCTAAGAGCACCTCTGGAGGAACAGCCGCT
CTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTGACCGTGAGCTGGAAC
TCTGGCGCCCTGACCTCTGGAGTGCATACATTTCCCGCTGTGCTGCAGTCCAGC
GGCCTGTATAGCCTGTCTTCCGTGGTGACCGTGCCTAGCTCTTCCCTGGGCACCC
AGACATACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCTCCAATACAAAGGTGGACAAG
AGAGTGGAGCCTAAGAGCTGTGATAAGACCCATACATGCCACCATGTCCAGCT
CCTGAGTTCTTGGGAGGACCTGCCGTGTTCTCTGTTTCTCCAAAGCCAAAGGAC
ACCCTGATGATCTCTCGCACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGTCC
CACGAGGATCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCA
TAATGCTAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCGGGTGG
TGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAGGTGAGCAATAAGGCCCTGCCAGCTCCCATCGAGAAGACCATCTCTAA
GGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTATACACTGCCCCCTAGCCGCG
AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACC
CATCTGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAACAATTATA
AGACCACACCACCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGTACTCCAAGC
TGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCTGTCAGCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACGCTCATTATACACAGAAATCTCTGTCCCTGAGCCCA
GGCAAGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGCAGCTCTCATCTGGTGAAGT

GTGCTGAGAAGGAGAAGACCTTCTGCGTGAACGGCGGCGAGTGTTTTATGGTG
AAGGACCTGTCTAATCCATCCAGATACCTGTGCAAGTGTCCCAACGAGTTCACA
GGCGATCGCTGCCAGAATTACGTGATGGCCTCTTTTTATAAGGCTGAGGAGCTG
TACCAGTAA (SEQ ID NO: 7). Theo một phương án, SEQ ID NO: 7 còn được đề cập đến dưới dạng “NPCFA”. Theo một phương án, SEQ ID NO: 7 có chứa một hoặc nhiều đột biến mà mã hóa cho một hoặc nhiều đột biến trong vùng không đổi (Fc) của mAb kháng-HER3 được đề xuất ở đây. Theo một phương án, kháng thể kháng-HER3 trưởng thành theo sáng chế có chứa ít nhất là một đột biến ở các axit amin 234, 239, 434, hoặc dạng kết hợp của chúng. Theo phương án khác, các đột biến axit amin có chứa ít nhất là một trong các đột biến thể sau đây: L234F, S239A, N434A hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo một phương án, protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây có chứa trình tự chuỗi nhẹ của mAb kháng-HER3. Theo phương án khác, trình tự chuỗi nhẹ được mã hóa bằng (SEQ ID NO: 8):

ATGGTGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCT
ACGGGGACATCGAGATGACCCAGTCTCCAGATTCCCTGGCCGTGAGCCTGGGA
GAGAGGGCTACAATCAACTGCCGGTCCAGCCAGTCTGTGCTGTACTCTTCCAGC
AACAGGAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAATCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTG
CTGATCTATTGGGCTAGCACCAGAGAGTCTGGAGTGCCTGACCGCTTCTCTGGA
TCCGGAAGCGGCACAGACTTCACCCTGACAATCTCTTCCCTGCAGGCCGAGGAC
GTGGCCGTGTACTATTGCCAGCAGTATTACTCTACCCCTAGGACATTCGGCCAG
GGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCATCCGTGTTTCATCTTT
CCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCGCTAGCGTGGTGTGCCTGCTG
AACAACTTCTACCCAAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGATAACGCTCT
GCAGAGCGGCAATTCTCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGATTCTA
CATATTCCCTGAGCTCTACCCTGACACTGTCCAAGGCCGATTACGAGAAGCACA
AGGTGTATGCTTGCGAGGTGACCCATCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACAAAGA
GCTTCAACCGCGGCGAGTGTTAA (SEQ ID NO: 8). Theo một phương án, SEQ ID NO: 8 còn được đề cập đến dưới dạng “PAL”.

Theo một phương án, chuỗi nặng của kháng thể kháng-HER3 được chứa bởi protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây có chứa trình tự axit amin sau đây:

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGY
YWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSSVTAAD

TAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFM
 VKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 9).

Theo một phương án, chuỗi nặng của kháng thể kháng-HER3 được chứa bởi protein
 dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây có chứa trình tự axit amin sau đây:

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGY
 YWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAAD
 TAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGPAVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHAHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFM
 VKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 10).

Theo một phương án, trình tự chuỗi nặng mAb kháng-HER3 có chứa trình tự peptit
 tín hiệu. Theo phương án khác, trình tự peptit tín hiệu chuỗi nặng mAb kháng-HER3 có chứa
 trình tự axit amin MEFGLSWVFLVAIIKGVQC (SEQ ID NO: 11).

Theo một phương án, chuỗi nhẹ của kháng thể kháng-HER3 được chứa bởi protein
 dung hợp tái tổ hợp có chứa trình tự axit amin sau đây:

MVLQQTQVFISLLLWISGAYGDIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVELYSS
 SNRNYLAWYQQNPGQPPLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV
 AVYYCQYYSTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
 PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12).

Theo một phương án, trình tự chuỗi nhẹ mAb kháng-HER3 có chứa trình tự peptit tín hiệu. Theo phương án khác, trình tự peptit tín hiệu chuỗi nhẹ mAb kháng-HER3 có chứa trình tự axit amin MVLQTQVFISLLLWISGAYG (SEQ ID NO: 13). Theo một phương án, polypeptit trưởng thành chẳng hạn như trình tự axit amin chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này thiếu peptit tín hiệu.

Theo một phương án, protein dung hợp tái tổ hợp có chứa trình tự axit amin sau đây:

Chuỗi nặng

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI
NHSGSTNYPNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDL
WGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHHTCPPCPAPEFLGGPAVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHAYHTQKSL
SLSPGKGGGGSGGGGSSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCP
NEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 14, trong đó chữ in nghiêng và in
đậm chỉ cầu nối, và chữ in đậm chỉ mảnh NRG-1); và

Chuỗi nhẹ

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPL
LIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
(SEQ ID NO: 3).

Theo một phương án, mỗi trình tự chuỗi nặng và trình tự chuỗi nhẹ trong protein dung hợp tái tổ hợp trưởng thành thiếu trình tự axit amin peptit tín hiệu.

Theo phương án cụ thể theo sáng chế, chuỗi nặng của kháng thể kháng-HER3 được đề xuất ở đây được dung hợp thông qua trình tự cầu nối đầu tận cùng C với đồng phân NRG-1 β 2a được đề xuất ở đây. Theo phương án khác, đầu tận cùng C của chuỗi nặng kháng thể có chứa miền Fc của kháng thể.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất được phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này được tạo chế phẩm cùng với chất mang dùng cho được phẩm.

Theo một số phương án, kháng thể kháng-HER3 và mảnh NRG-1 được mô tả trong bản mô tả này được dung hợp/ được liên kết có điều khiển theo cách tái tổ hợp hoặc hóa học thông qua cầu nối để tạo thành protein dung hợp. “Protein dung hợp,” “polypeptit dung hợp,” “protein dung hợp tái tổ hợp,” hoặc “polypeptit tái tổ hợp” dùng để chỉ polypeptit lai mà có chứa các phần polypeptit từ ít nhất là hai polypeptit khác nhau. “Protein dung hợp” như được định nghĩa trong bản mô tả này, là thể dung hợp của trình tự axit amin (protein) thứ nhất có chứa, ví dụ như đồng phân NRG-1 β 2a theo sáng chế, được kết hợp thông qua cầu nối vào đầu tận cùng C của trình tự axit amin thứ hai có chứa chuỗi nặng của kháng thể mà liên kết đặc hiệu với ERBB3 (HER3).

Theo một phương án, protein dung hợp được mã hóa và được sản xuất theo cách tái tổ hợp. Theo một số phương án, protein dung hợp tái tổ hợp được mã hóa bằng trình tự axit nucleic mã hóa cho kháng thể theo sáng chế mà được liên kết có điều khiển thông qua trình tự axit nucleic mã hóa cho cầu nối, với trình tự axit nucleic mã hóa cho đồng phân NRG-1 β 2a theo sáng chế.

Theo một phương án, trình tự axit amin protein dung hợp tái tổ hợp tương đồng với SEQ ID NO: 14 được dung hợp với SEQ ID NO: 3. Thuật ngữ “độ tương đồng” có thể dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự protein dung hợp tái tổ hợp (ví dụ như độ tương đồng với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18) lớn hơn 70%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 72%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 75%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 78%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 80%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 82%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 83%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 85%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ

ID NO: 1-18 lớn hơn 87%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 88%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 90%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 92%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 93%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 95%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 96%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 97%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 98%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 lớn hơn 99%. Theo phương án khác, “độ tương đồng” dùng để chỉ độ tương đồng so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-18 bằng 100%.

Việc xác định tỉ lệ phần trăm tương đồng giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán toán học. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế về thuật toán toán học dùng để so sánh hai trình tự là thuật toán của Karlin and Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, đã được cải biến như trong Karlin and Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Thuật toán này được kết hợp vào các chương trình NBLAST và XBLAST của Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Tra cứu nucleotit BLAST có thể được thực hiện với chương trình NBLAST, điểm=100, chiều dài từ=12, để thu được trình tự nucleotit tương đồng với axit nucleic mã hóa cho protein được quan tâm. Tra cứu protein BLAST có thể được thực hiện với chương trình XBLAST, điểm=50, chiều dài từ=3, để thu được trình tự axit amin tương đồng với protein được quan tâm. Để thu được sự sắp xếp thẳng hàng có chỗ cách quãng nhằm mục đích so sánh, Gapped BLAST có thể được sử dụng như được mô tả trong Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Theo cách khác, PSI-Blast có thể được sử dụng để thực hiện tra cứu lặp mà phát hiện mối quan hệ xa giữa các phân tử (id.). Khi sử dụng các chương trình BLAST, Gapped BLAST, và PSI-BLAST, các tham số mặc định của các chương trình tương ứng (ví dụ như, XBLAST và NBLAST) có thể được sử dụng. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế khác về thuật toán toán học dùng để so sánh trình tự là thuật toán của Myers và Miller, CABIOS (1989). Thuật toán này được kết

hợp vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0) mà là một phần của gói phần mềm sắp xếp thẳng hàng trình tự GCG. Khi sử dụng chương trình ALIGN để so sánh trình tự axit amin, bảng gốc khối lượng PAM120, điểm phạt chiều dài cách quãng bằng 12, và điểm phạt cách quãng bằng 4 có thể được sử dụng. Các thuật toán khác để phân tích trình tự đã được biết đến trong lĩnh vực và bao gồm ADVANCE và ADAM như được mô tả trong Torellis and Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; và FASTA được mô tả trong Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8. Trong FASTA, ktup là lựa chọn điều khiển mà thiết lập độ nhạy và tốc độ tra cứu. Nếu ktup=2, các vùng tương tự trong hai trình tự được so sánh được phát hiện bằng cách nhìn vào các cặp của các gốc được sắp xếp thẳng hàng; nếu ktup=1, axit amin được sắp xếp thẳng hàng đơn lẻ được đánh giá. ktup có thể được đặt bằng 2 hoặc 1 đối với trình tự protein, hoặc từ 1 đến 6 đối với trình tự ADN. Nếu ktup không được xác định mặc định ktup là 2 đối với protein và 6 đối với ADN. Theo cách khác, sự sắp xếp thẳng hàng trình tự protein có thể được tiến hành bằng cách sử dụng thuật toán CLUSTAL W, như được mô tả bởi Higgins et al., 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

Theo một số phương án, polynucleotit theo sáng chế được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật PCR bằng cách sử dụng các quy trình và phương pháp đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Theo một số phương án, quy trình này bao gồm sự nối của hai trình tự ADN khác nhau (xem, ví dụ như, “Current Protocols in Molecular Biology”, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

Theo một phương án, polynucleotit theo sáng chế được cài xen vào vector biểu hiện (tức là, cấu trúc axit nucleic) để gây ra sự biểu hiện của polypeptit tái tổ hợp. Theo một phương án, vector biểu hiện theo sáng chế bao gồm các trình tự bổ sung mà làm cho vector này thích hợp để sao chép và tích hợp trong sinh vật nhân sơ. Theo một phương án, vector biểu hiện theo sáng chế bao gồm các trình tự bổ sung mà làm cho vector này thích hợp để sao chép và tích hợp trong sinh vật nhân chuẩn. Theo một phương án, vector biểu hiện theo sáng chế bao gồm vector con thoi mà làm cho vector này thích hợp để sao chép và tích hợp ở cả sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân chuẩn. Theo một số phương án, việc tách dòng vector có chứa trình tự bắt đầu phiên mã và dịch mã (ví dụ như, vùng khởi động, vùng tăng cường) và vùng kết thúc phiên mã và dịch mã (ví dụ như, tín hiệu polyadenyl hóa).

Theo một phương án, nhiều tế bào nhân sơ hoặc nhân chuẩn có thể được sử dụng làm hệ thống biểu hiện vật chủ để biểu hiện polypeptit theo sáng chế. Theo một số phương án, chúng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vi sinh vật, chẳng hạn như vi khuẩn đã biến nạp với

vector biểu hiện ADN thể thực khuẩn, ADN plasmit hoặc ADN cosmid tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa polypeptit; nấm men đã biến nạp với vector biểu hiện nấm men tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa polypeptit.

Theo một số phương án, hệ thống biểu hiện không phải vi khuẩn được sử dụng (ví dụ như, hệ thống biểu hiện động vật có vú chẳng hạn như tế bào CHO) để biểu hiện polypeptit theo sáng chế. Theo một phương án, vector biểu hiện dùng để biểu hiện polynucleotit theo sáng chế trong tế bào động vật có vú là vector pCI-DHFR có chứa vùng khởi động CMV và gen kháng neomycin.

Theo một số phương án, trong hệ thống vi khuẩn theo sáng chế, nhiều vector biểu hiện có thể được chọn theo cách có lợi tùy thuộc vào việc sử dụng dự kiến đối với polypeptit được biểu hiện. Theo một phương án, lượng lớn của polypeptit là điều mong muốn. Theo một phương án, vector mà định hướng sự biểu hiện của mức độ cao của sản phẩm protein, có thể là ở dạng thể dung hợp với trình tự tín hiệu kị nước, mà định hướng sản phẩm đã được biểu hiện vào chu chất của vi khuẩn hoặc môi trường nuôi cấy trong đó sản phẩm protein được tinh chế dễ dàng là điều mong muốn. Theo một phương án, protein dung hợp nhất định được thiết kế với vị trí phân cắt đặc hiệu để hỗ trợ việc thu hồi polypeptit. Theo một phương án, vector có thể thích ứng với thao tác này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, loạt pET của vector biểu hiện *E. coli* [Studier et al., *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990)].

Theo một phương án, hệ thống biểu hiện nấm men được sử dụng. Theo một phương án, một số lượng vector chứa vùng khởi động cấu trúc hoặc cảm ứng có thể được sử dụng ở nấm men như bộc lộ trong Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5,932,447. Theo phương án khác, vector mà thúc đẩy sự tích hợp của trình tự ADN lạ vào trong nhiễm sắc thể nấm men được sử dụng.

Theo một phương án, vector biểu hiện theo sáng chế có thể còn bao gồm trình tự polynucleotit bổ sung mà cho phép, ví dụ như, sự dịch mã của một vài protein từ mARN đơn lẻ chẳng hạn như vị trí đi vào ribosom bên trong (internal ribosome entry site - IRES) và trình tự để tích hợp hệ gen của polypeptit khỏi vùng khởi động.

Theo một số phương án, vector biểu hiện theo sáng chế bao gồm các thành phần mà làm tăng sự biểu hiện của protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế. Các dấu hiệu này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sự lựa chọn vùng khởi động và vị trí polyadenyl hóa. Theo một số phương án, trình tự polyadenyl hóa là trình tự polyadenyl hóa hormon sinh trưởng bò

(bovine growth hormone - BGH). Theo một số phương án, vùng khởi động có chứa vùng khởi động hoạt tính cấu trúc. Theo một số phương án, vùng khởi động có chứa vùng khởi động cytomegalovirus (cytomegalovirus promoter - pCMV).

Theo một số phương án, vector biểu hiện động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, mà có sẵn từ Invitrogen, pCI mà có sẵn từ Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV và pBK-CMV mà có sẵn từ Strategene, pTRES mà có sẵn từ Clontech, và dẫn xuất của chúng.

Theo một số phương án, vector biểu hiện chứa các thành phần điều hòa từ virus sinh vật nhân chuẩn chẳng hạn như retrovirus được sử dụng bởi sáng chế này. Vector SV40 bao gồm pSVT7 và pMT2. Theo một số phương án, vector có nguồn gốc từ virus u nhú ở bò bao gồm pBV-1MTHA, và vector có nguồn gốc từ virus Epstein Barr bao gồm pHEBO, và p205. Các vector ví dụ khác bao gồm pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, pDSVE baculovirus, và vector khác bất kỳ cho phép sự biểu hiện của protein chịu sự định hướng của vùng khởi động sớm SV-40, vùng khởi động muộn SV-40, vùng khởi động metallothionein, vùng khởi động virus khối u vú chuột nhắt, vùng khởi động virus sarcoma Rous, vùng khởi động polyhedrin, hoặc vùng khởi động khác đã được chứng minh là hữu hiệu đối với sự biểu hiện ở tế bào nhân chuẩn.

Theo một số phương án, vector virus tái tổ hợp hữu dụng đối với sự biểu hiện in vivo của polypeptit theo sáng chế vì chúng mang lại các lợi ích chẳng hạn như sự lây nhiễm bên và sự đặc hiệu nhắm đích. Theo một phương án, sự lây nhiễm bên là vốn có trong vòng đời của, ví dụ như, retrovirus và là quy trình mà nhờ đó tế bào đã lây nhiễm đơn lẻ sản xuất ra nhiều virion con cháu mà mọc ra và lây nhiễm các tế bào xung quanh. Theo một phương án, kết quả là khu vực lớn trở nên bị lây nhiễm nhanh chóng, hầu hết trong số chúng chưa bị nhiễm từ ban đầu bởi các hạt virus gốc. Theo một phương án, vector virus được sản xuất mà không thể lây lan sang bên. Theo một phương án, đặc điểm này có thể hữu dụng nếu mục đích mong muốn là đưa gen xác định chỉ vào số lượng khu biệt của các tế bào được nhắm đích.

Theo một phương án, nhiều phương pháp khác nhau có thể được sử dụng để đưa vector biểu hiện mã hóa cho protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế vào trong tế bào. Các phương pháp này thường được mô tả trong Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), trong Ausubel et al.,

Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) và Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] và bao gồm, ví dụ như, sự chuyển nhiễm ổn định hoặc tạm thời, sự chuyển nhiễm liposom, đục lỗ điện và sự lây nhiễm bằng vector virus tái tổ hợp. Ngoài ra, xem Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5,464,764 và 5,487,992 về phương pháp chọn lọc dương tính-âm tính.

Theo một số phương án, sự đưa vào của axit nucleic bằng sự lây nhiễm virus mang lại một vài lợi ích hơn là các phương pháp khác chẳng hạn như sự chuyển nhiễm liposom và đục lỗ điện, vì có thể thu được hiệu quả chuyển nhiễm cao hơn do bản chất lây nhiễm của virus.

Theo một phương án, rõ ràng là polypeptit theo sáng chế cũng có thể được biểu hiện từ cấu trúc axit nucleic được dùng cho cá thể bằng cách sử dụng phương thức dùng tích hợp bất kỳ, được mô tả ở trên (tức là, liệu pháp gen in-vivo). Theo một phương án, cấu trúc axit nucleic được đưa vào trong tế bào thích hợp thông qua phương tiện/phương pháp phân phối gen thích hợp (sự chuyển nhiễm, sự tải nạp, sự tái tổ hợp tương đồng, v.v.) và hệ thống biểu hiện khi cần và sau đó tế bào đã được cải biến được mở rộng trong môi trường nuôi cấy và được đưa trở lại vào cá thể (tức là, liệu pháp gen ex-vivo).

Rõ ràng là ngoài việc chứa các thành phần cần thiết cho sự phiên mã và sự dịch mã của trình tự mã hóa được cài xen (mã hóa cho polypeptit), cấu trúc biểu hiện theo sáng chế cũng có thể bao gồm trình tự được thiết kế để tối ưu hóa sự ổn định, sự sản xuất, sự tinh chế, năng suất hoặc hoạt tính của polypeptit được biểu hiện.

Theo một số phương án, tế bào đã biến nạp được nuôi cấy trong điều kiện hữu hiệu, mà cho phép sự biểu hiện của hàm lượng cao của protein hoặc polypeptit dung hợp tái tổ hợp. Theo một số phương án, điều kiện nuôi cấy hữu hiệu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các điều kiện môi trường, bình phản ứng sinh học, nhiệt độ, độ pH và oxy hữu hiệu mà cho phép sự sản xuất protein. Theo một phương án, môi trường hữu hiệu dùng để chỉ môi trường bất kỳ trong đó tế bào được nuôi cấy để tạo ra polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế. Theo một số phương án, môi trường thường bao gồm dung dịch trong nước có các nguồn cacbon, nitơ và photphat có thể đồng hóa, và muối, khoáng chất, kim loại và chất dinh dưỡng khác thích hợp, chẳng hạn như vitamin. Theo một số phương án, tế bào theo sáng chế có thể được nuôi cấy

trong bình phản ứng sinh học lên men thông thường, bình thót cổ lắc, ống nghiệm, đĩa vi chuẩn độ và đĩa petri. Theo một số phương án, việc nuôi cấy được tiến hành ở nhiệt độ, độ pH và hàm lượng oxy thích hợp đối với tế bào tái tổ hợp. Theo một số phương án, điều kiện nuôi cấy nằm trong khả năng của người có trình độ trung bình trong lĩnh vực.

Theo một số phương án, tùy thuộc vào vector và hệ thống vật chủ dùng để sản xuất, polypeptit thu được theo sáng chế vẫn ở trong tế bào tái tổ hợp, được tiết vào môi trường lên men, được tiết vào không gian giữa hai màng tế bào, chẳng hạn như không gian chu chất ở *E. coli*; hoặc được giữ lại trên bề mặt ngoài của màng tế bào hoặc virut.

Theo một phương án, sau khoảng thời gian định trước trong môi trường nuôi cấy, tiến hành thu hồi polypeptit tái tổ hợp.

Theo một phương án, cụm từ “thu hồi polypeptit tái tổ hợp” dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ việc thu gom toàn bộ môi trường lên men chứa polypeptit và không chỉ ngụ ý là các bước tách hoặc tinh chế.

Theo một phương án, polypeptit theo sáng chế được tinh chế bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật tinh chế protein tiêu chuẩn, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, lọc, điện di, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký lọc gel, sắc ký pha đảo, sắc ký concanavalin A, sắc ký tập trung và sự hòa tan khác biệt.

Theo một phương án, để làm thuận lợi cho việc thu hồi, trình tự mã hóa được biểu hiện có thể được thiết kế để mã hóa cho polypeptit theo sáng chế và được dung hợp gốc có thể phân cắt được. Theo một phương án, protein dung hợp có thể được thiết kế sao cho polypeptit có thể được phân lập dễ dàng bằng sắc ký ái lực; ví dụ như, bằng sự cố định trên cột đặc hiệu đối với gốc có thể phân cắt được này. Theo một phương án, vị trí phân cắt được thiết kế giữa polypeptit và gốc có thể phân cắt được và polypeptit có thể được giải phóng từ cột sắc ký bằng cách xử lý bằng enzym hoặc tác nhân thích hợp mà phân cắt đặc hiệu protein dung hợp tại vị trí này [ví dụ như, xem Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); và Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].

Theo một phương án, polypeptit theo sáng chế được lấy lại ở dạng “về cơ bản tinh khiết”.

Theo một phương án, cụm từ “về cơ bản tinh khiết” dùng để chỉ độ tinh khiết mà cho phép việc sử dụng hữu hiệu của protein trong các ứng dụng được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án, polypeptit theo sáng chế cũng có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng hệ thống biểu hiện in vitro. Theo một phương án, phương pháp tổng hợp in vitro đã được biết rõ trong lĩnh vực và các thành phần của hệ thống này có sẵn trên thị trường.

Theo một số phương án, polypeptit tái tổ hợp được tổng hợp và được tinh chế; hiệu quả trị liệu của chúng có thể được thử nghiệm in vivo hoặc in vitro.

Theo một phương án, dược phẩm được đề xuất ở đây có chứa protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế được tạo chế phẩm thêm với chất mang dùng cho dược phẩm. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "chất mang dùng cho dược phẩm" chứa bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất phụ, các chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và chất làm chậm hấp thu, và các chất tương tự tương thích về mặt sinh lý. Tốt hơn là, chất mang này thích hợp để dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, ngoài đường tiêu hóa, qua xương sống hoặc qua biểu bì (ví dụ như bằng cách tiêm hoặc truyền).

Phương pháp trị liệu

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh ở đối tượng cần chúng, phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc dược phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch ở đối tượng cần chúng, phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc dược phẩm có chứa chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa, ức chế, kìm hãm hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, bệnh tim mạch bao gồm suy tim mãn tính / suy tim sung huyết (CHF), suy tim cấp tính / nhồi máu cơ tim (MI), loạn chức năng tâm thu tâm thất trái, tổn thương tái tưới máu kết hợp với MI, sự gây độc tim do hóa trị liệu gây ra (người lớn hoặc trẻ em), sự gây độc tim do xạ trị gây ra, phụ thêm vào sự can thiệp phẫu thuật ở bệnh tim bẩm sinh ở trẻ em.

Theo một số phương án, sự gây độc tim do hóa trị liệu gây ra bắt nguồn từ việc đối tượng tiếp nhận anthracyclin, tác nhân alkyl hóa, tác nhân chống vi ống, và tác nhân chống chuyển hóa dùng làm hóa trị liệu.

Theo một số phương án, tình trạng bệnh tim mạch là sự gây độc tim là hậu quả của việc đối tượng tiếp nhận trị liệu ung thư. Theo các phương án khác, trị liệu ung thư là trị liệu nhắm đích HER-2. Theo các phương án khác, trị liệu nhắm đích HER-2 có chứa việc sử dụng trastuzumab, ado-trastuzumab, emtansin, lapatinib, neratinib, và pertuzumab, kháng thể kháng-HER2 bất kỳ, tác nhân kháng-HER2 bất kỳ hoặc dạng kết hợp của chúng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp gây cảm ứng sự tái tạo mô hình của cấu trúc cơ và xương tế bào của tế bào cơ, hoặc sự dính tế bào-tế bào, phương pháp này có chứa bước xử lý các tế bào bằng protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một phương án, phương pháp trị liệu được định hướng để điều trị suy tim bắt nguồn từ sự phân ly của sự dính tế bào-tế bào cơ tim và/hoặc sự xáo trộn của cấu trúc cơ ở động vật có vú.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp để ngăn ngừa, điều trị hoặc làm chậm suy tim với phân suất tống máu được bảo toàn ở người, phương pháp này bao gồm bước dùng được phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Như sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “phân suất tống máu” dùng để chỉ phân suất tống máu (EF), số đo, thường được biểu diễn dưới dạng tỉ lệ phần trăm, của bao nhiêu máu của tâm thất trái được bơm ra trong mỗi lần co. Ví dụ như, phân suất tống máu bằng 50 phần trăm có nghĩa là 50 phần trăm của tổng lượng máu trong tâm thất trái được đẩy ra ngoài với mỗi nhịp tim.

Sáng chế được định hướng để điều trị các đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh tim và các tình trạng bệnh liên quan, ví dụ như, suy tim.

Thuật ngữ “suy tim” có nghĩa là sự bất thường của chức năng tim trong đó tim không bơm máu ở tốc độ cần cho nhu cầu của mô đang trao đổi chất. Suy tim bao gồm phạm vi rộng của các tình trạng bệnh chẳng hạn như suy tim sung huyết, nhồi máu cơ tim, chứng nhịp tim nhanh, bệnh cơ tim phì đại di truyền, bệnh tim thiếu máu cục bộ, bệnh cơ tim giãn vô căn, và viêm cơ tim. Suy tim có thể được gây ra bởi số lượng yếu tố bất kỳ, bao gồm các dạng thiếu

máu cục bộ, bẩm sinh, thấp khớp, hoặc vô căn. Phì đại tim mãn tính là tình trạng bệnh đáng chú ý mà là tiền thân của suy tim sung huyết và sự ngừng tim.

Theo một phương án, “việc điều trị” dùng để chỉ cả việc điều trị triệu chứng và biện pháp phòng ngừa hoặc ngăn ngừa, trong đó mục đích là để ngăn ngừa hoặc làm chậm (làm giảm) sự phì đại tim. Các đối tượng cần điều trị bao gồm đối tượng đã bị rối loạn cũng như là đối tượng được xác nhận là có rối loạn hoặc đối tượng trong đó rối loạn cần được ngăn ngừa. Sự phì đại tim có thể là từ nguyên nhân bất kỳ mà đáp ứng với axit retinoic, bao gồm các nguyên nhân bẩm sinh, virus, vô căn, dinh dưỡng tim, hoặc dinh dưỡng cơ, hoặc là kết quả của chứng thiếu máu cục bộ hoặc chấn thương do thiếu máu cục bộ chẳng hạn như nhồi máu cơ tim. Thông thường, việc điều trị được thực hiện để làm dừng hoặc làm chậm sự tiến triển của sự phì đại, đặc biệt là sau khi sự hư hại tim, chẳng hạn như do chứng thiếu máu cục bộ, đã xảy ra. Tốt hơn là, để điều trị nhồi máu cơ tim, được phẩm được đề xuất ở đây được cấp ngay lập tức sau khi nhồi máu cơ tim, để ngăn ngừa hoặc làm giảm sự phì đại.

Theo một số phương án, việc điều trị đối tượng bằng được phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây có thể dẫn đến sự tăng lên của thời gian sống trung bình của quần thể đối tượng được điều trị so với quần thể tiếp nhận đơn trị liệu bằng thuốc mà không phải là hợp chất theo sáng chế, hoặc muối, solvat, chất tương tự hoặc dẫn xuất được dụng của chúng. Tốt hơn là, sau khi điều trị bằng các chiến lược, các phương thức điều trị, các phương pháp, các dạng kết hợp, và các được phẩm được đề xuất ở đây, thời gian sống trung bình được tăng lên nhiều hơn 30 ngày; tốt hơn là, nhiều hơn 60 ngày; tốt hơn là, nhiều hơn 90, 120, hoặc 365 ngày; tốt hơn là, nhiều hơn 365 ngày. Sự tăng lên của thời gian sống trung bình của quần thể có thể được đo bằng phương thức có thể lặp lại được bất kỳ. Sự tăng lên của thời gian sống trung bình của quần thể có thể được đo, ví dụ như, bằng cách tính thời gian sống trung bình của quần thể sau khi bắt đầu điều trị bằng hợp chất hoạt tính. Sự tăng lên của thời gian sống trung bình của quần thể cũng có thể được đo, ví dụ như, bằng cách tính thời gian sống trung bình của quần thể sau khi hoàn thành chu kỳ điều trị thứ nhất bằng được phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, việc điều trị đối tượng bằng được phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp được đề xuất ở đây có thể dẫn đến sự giảm đi của tỉ lệ tử vong của quần thể đối tượng được điều trị so với quần thể tiếp nhận một mình chất mang. Việc điều trị ung thư có thể dẫn đến sự giảm đi của tỉ lệ tử vong của quần thể đối tượng được điều trị so với quần thể không được điều trị. Việc điều trị ung thư có thể dẫn đến sự giảm đi của tỉ lệ tử vong của quần

thể đối tượng được điều trị so với quần thể tiếp nhận đơn trị liệu bằng thuốc mà không phải là hợp chất theo sáng chế, hoặc muối, solvat, chất tương tự hoặc dẫn xuất được dụng của chúng. Tốt hơn là, sau khi điều trị bằng các chiến lược, các phương thức điều trị, các phương pháp, các dạng kết hợp, và các dược phẩm được đề xuất ở đây, tỉ lệ tử vong được giảm đi nhiều hơn 2%; tốt hơn là, nhiều hơn 5%; tốt hơn là, nhiều hơn 10%; và tốt nhất là, nhiều hơn 25%. Sự giảm đi của tỉ lệ tử vong của quần thể đối tượng được điều trị có thể được đo bằng phương thức có thể lặp lại được bất kỳ. Sự giảm đi của tỉ lệ tử vong của quần thể có thể được đo, ví dụ như, bằng cách tính số lượng trung bình của các ca tử vong liên quan đến bệnh của quần thể trong mỗi đơn vị thời gian sau khi bắt đầu điều trị bằng hợp chất hoạt tính. Sự giảm đi của tỉ lệ tử vong của quần thể cũng có thể được đo, ví dụ như, bằng cách tính số lượng trung bình của các ca tử vong liên quan đến bệnh của quần thể trong mỗi đơn vị thời gian sau khi hoàn thành chu kỳ điều trị thứ nhất bằng dược phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh liên quan đến hệ thần kinh trung ương (CNS) hoặc tình trạng bệnh ở đối tượng cần chúng, phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa, ức chế, kìm hãm hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến CNS ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến CNS là chứng xơ cứng teo cơ một bên (ALS), bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, chứng liệt Bell, chứng động kinh và co giật, Hội chứng Guillain-Barre, đột quỵ, chấn thương sọ não, đa xơ cứng hoặc dạng kết hợp.

Việc dùng, định liều

Hợp phần theo sáng chế có thể được dùng ngoài đường tiêu hóa cho đối tượng cần chúng, hoặc có thể được dùng bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng, đường dùng và/hoặc phương thức dùng sẽ thay đổi tùy thuộc vào kết quả mong muốn. Để dùng hợp chất theo sáng chế bằng các đường dùng nhất định, có thể cần phải phủ hỗn hợp bằng, hoặc đồng sử dụng hợp chất này với, nguyên liệu để ngăn chặn sự bất hoạt của nó. Ví dụ như, hợp chất có thể được dùng cho đối tượng

trong chất mang thích hợp, ví dụ như, liposom, hoặc chất pha loãng. Chất pha loãng được dụng bao gồm nước muối và dung dịch chất đệm trong nước. Chất mang dùng cho được phẩm bao gồm dung dịch nước hoặc dịch phân tán tiệt trùng và bột tiệt trùng để điều chế tùy ứng dụng dịch hoặc dịch phân tán tiêm được tiệt trùng. Việc sử dụng các môi trường và các chất này đối với các chất có hoạt tính được là đã biết trong lĩnh vực.

Theo các phương án điển hình, chế phẩm để dùng cho các đối tượng bao gồm dung dịch, huyền phù, và nhũ tương trong nước hoặc không trong nước tiệt trùng. Một số phương án bao gồm dung môi không trong nước chẳng hạn như propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật (ví dụ như, dầu ô liu), este hữu cơ (ví dụ như, etyl oleat) và dung môi khác đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Chất mang (hoặc tá dược) chấp nhận được về mặt sinh lý tùy ý được sử dụng theo các phương án nhất định theo sáng chế. Ví dụ về chúng bao gồm, ví dụ như, nước muối, PBS, dung dịch Ringer, dung dịch Ringer đã lactat hóa, v.v.. Ngoài ra, chất bảo quản và chất bổ trợ tùy ý được bổ sung vào được phẩm để giúp đảm bảo độ ổn định và độ tiệt trùng. Ví dụ như, chất kháng sinh và các chất diệt khuẩn khác, chất chống oxy hóa, chất càn hóa, và dạng tương tự đều tùy ý có mặt trong các phương án khác nhau của được phẩm trong bản mô tả này.

Các cụm từ "dùng ngoài đường tiêu hóa" và "được sử dụng ngoài đường tiêu hóa" được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là các phương thức sử dụng không phải là sử dụng qua đường ruột và tại chỗ, thường là bằng cách tiêm, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiêm và truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, nội tủy mạc, trong bao, trong ổ mắt, trong tim, trong da, trong màng bụng, qua khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới bao, dưới màng nhện, trong cột sống, ngoài màng cứng và trong xương ức.

Bất kể đường dùng nào được chọn, hợp chất theo sáng chế, mà có thể được sử dụng ở dạng được hydrat hóa thích hợp, và/hoặc được phẩm theo sáng chế, được tạo chế phẩm thành dạng liều lượng được dụng bằng phương pháp thông thường đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực.

Protein dung hợp tái tổ hợp, hoặc được phẩm có chứa chúng tùy ý được dùng cho các đối tượng cần điều trị (để trị liệu hoặc phòng ngừa) trong chất mang dùng cho được phẩm tiệt trùng thích hợp bất kỳ. Chất mang dùng cho được phẩm này hoạt động để duy trì sự hòa tan và tác động của protein dung hợp. Theo một số phương án, có thể mong muốn là dùng các thành phần bổ sung kết hợp với protein dung hợp. Ví dụ như, trong một số phác đồ điều trị,

tác nhân hóa trị liệu, chất kháng sinh, các chế phẩm bổ sung có chứa protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế và một hoặc nhiều tác nhân chăm sóc tiêu chuẩn, v.v. đều tùy ý được bao gồm bởi được phẩm theo sáng chế.

Như sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “việc điều trị kết hợp,” “trị liệu kết hợp,” và “đồng trị liệu” được sử dụng thay thế lẫn nhau và thường dùng để chỉ các phương thức điều trị đặc trưng ở protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng như được đề xuất ở đây và tác nhân trị liệu bổ sung. Thông thường, các phương thức điều trị kết hợp là một phần của phác đồ điều trị cụ thể được dự định để tạo ra tác dụng có lợi từ tác động đồng thời của dạng kết hợp tác nhân trị liệu. Tác dụng có lợi của sự kết hợp có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sự đồng tác động được động học hoặc được lực học bắt nguồn từ sự kết hợp của các tác nhân trị liệu. Việc dùng các tác nhân trị liệu này ở dạng kết hợp thường được thực hiện trong khoảng thời gian xác định (thông thường là phút, giờ, ngày hoặc tuần tùy thuộc vào sự kết hợp được chọn). Theo một số phương án, việc điều trị kết hợp có chứa việc dùng hai hoặc hơn hai tác nhân trị liệu theo cách tuần tự, trong đó mỗi tác nhân trị liệu được dùng ở thời gian khác nhau, cũng như là việc dùng các tác nhân trị liệu này, hoặc ít nhất là hai trong số các tác nhân trị liệu này, theo cách về cơ bản là đồng thời. Việc dùng về cơ bản là đồng thời có thể được thực hiện, ví dụ như, bằng cách dùng cho đối tượng dạng liều lượng đơn lẻ có tỉ lệ cố định của mỗi tác nhân trị liệu hoặc trong nhiều dạng liều lượng riêng rẽ cho các tác nhân trị liệu. Việc dùng tuần tự hoặc về cơ bản đồng thời của mỗi tác nhân trị liệu có thể được thực hiện bằng đường dùng thích hợp bất kỳ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đường miệng, đường trong tĩnh mạch, đường trong cơ, và hấp thụ trực tiếp qua mô màng nhầy. Tác nhân trị liệu có thể được dùng bằng cùng một đường dùng hoặc bằng các đường dùng khác nhau. Tác nhân trị liệu có thể được dùng theo cùng một khoảng cách thời gian hoặc theo khoảng cách thời gian dùng khác nhau. Ví dụ như, tác nhân trị liệu thứ nhất của dạng kết hợp được chọn có thể được dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch trong khi tác nhân trị liệu khác của dạng kết hợp có thể được dùng qua đường miệng. Theo cách khác, ví dụ như, tất cả tác nhân trị liệu có thể được dùng qua đường miệng hoặc tất cả các tác nhân trị liệu có thể được dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch.

Theo một số phương án, trị liệu kết hợp còn bao gồm việc dùng tác nhân trị liệu như được mô tả nêu trên kết hợp thêm với các thành phần có hoạt tính sinh học khác và các liệu pháp không dùng thuốc (*ví dụ như*, việc điều trị bằng phẫu thuật hoặc bức xạ). Khi trị liệu kết hợp có chứa thêm việc điều trị không dùng thuốc, việc điều trị không dùng thuốc có thể được

thực hiện vào thời gian thích hợp bất kỳ miễn là đạt được tác dụng có lợi từ sự tác động cùng nhau của dạng kết hợp của tác nhân trị liệu và việc điều trị không dùng thuốc. Ví dụ như, trong các trường hợp thích hợp, tác dụng có lợi vẫn đạt được khi việc điều trị không dùng thuốc được loại bỏ tạm thời khỏi việc dùng tác nhân trị liệu, có thể là theo ngày hoặc thậm chí là theo tuần.

Theo một số phương án, tác nhân trị liệu bổ sung là tác nhân hóa trị liệu (còn được đề cập đến dưới dạng chất chống tạo khối u hoặc chất chống tăng sinh), ví dụ như, tác nhân alkyl hóa; chất kháng sinh; chất chống chuyển hóa; chất khử độc; interferon; kháng thể đa dòng hoặc đơn dòng; chất ức chế EGFR; chất ức chế HER2; chất ức chế histon deacetylaza; hormon; chất ức chế phân bào; chất ức chế MTOR; chất ức chế multi-kinaza; chất ức chế serin/threonin kinaza; chất ức chế tyrosin kinaza; chất ức chế VEGF/VEGFR; taxan hoặc dẫn xuất taxan, chất ức chế aromataza, anthraxycin, thuốc nhắm đích vi ống, thuốc gây độc topoisomeraza, chất ức chế của đích phân tử hoặc enzym (ví dụ như, kinaza hoặc protein methyltransferaza), thuốc tương tự xytidin hoặc chất hóa trị liệu bất kỳ, chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch, chất chống tạo khối u dựa trên platin, chất ức chế CDK, chất ức chế PARP hoặc chất chống tạo khối u hoặc chất chống tăng sinh bất kỳ đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực.

Tác nhân alkyl hóa ví dụ thích hợp để sử dụng theo các phương thức điều trị kết hợp được đề xuất ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cyclophosphamid (Cytosan; Neosar); chlorambucil (Leukeran); melphalan (Alkeran); carmustin (BiCNU); busulfan (Busulfex); lomustin (CeeNU); đacarbazin (DTIC-Dome); oxaliplatin (Eloxatin); carmustin (Gliadel); ifosfamid (Ifex); mechlorethamin (Mustargen); busulfan (Myleran); carboplatin (Paraplatin); cisplatin (CDDP; Platinol); temozolomit (Temodar); thiotepa (Thiopex); bendamustin (Treanda); hoặc streptozocin (Zanosar).

Anthraxycin thích hợp ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, doxorubicin (adriamycin); doxorubicin liposomal (Doxil); mitoxantron (Novantrone); bleomycin (Blenoxane); daunorubicin (Cerubidine); daunorubicin liposomal (DaunoXome); doctinomycin (Cosmegen); epirubicin (Ellence); idarubicin (Idamycin); plicamycin (Mithracin); mitomycin (Mutamycin); pentostatin (Nipent); hoặc valrubicin (Valstar).

Chất chống chuyển hóa ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, fluoraxin (Aduvax); capecitabin (Xeloda); hydroxyurea (Hydrea); mercaptopurin (Purinethol); pemetrexed

(Alimta); fludarabin (Fludara); nelarabin (Arranon); cladribin (cladribin Novaplus); clofarabin (Clolar); cytarabin (Cytosar-U); decitabin (Dacogen); cytarabin liposomal (DepoCyt); hydroxyure (Droxia); pralatrexat (Folotyn); floxuridin (FUDR); gemcitabin (Gemzar); cladribin (Leustatin); fludarabin (Oforta); methotrexat (MTX; Rheumatrex); methotrexat (Trexall); thioguanin (Tabloid); TS-1 hoặc cytarabin (Tarabine PFS).

Chất khử độc ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, amifostin (Ethyol) hoặc mesna (Mesnex).

Interferon ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, interferon alfa-2b (Intron A) hoặc interferon alfa-2a (Roferon-A).

Kháng thể đa dòng hoặc đơn dòng ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trastuzumab (Herceptin); ofatumumab (Arzerra); bevacizumab (Avastin); rituximab (Rituxan); cetuximab (Erbix); panitumumab (Vectibix); tositumomab/iot-131 tositumomab (Bexxar); alemtuzumab (Campath); ibritumomab (Zevalin; In-111; Y-90 Zevalin); gemtuzumab (Mylotarg); eculizumab (Soliris) hoặc denosumab.

Chất ức chế EGFR ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gefitinib (Iressa); lapatinib (Tykerb); cetuximab (Erbix); erlotinib (Tarceva); panitumumab (Vectibix); PKI-166; canertinib (CI-1033); matuzumab (EMD 72000) hoặc EKB-569.

Chất ức chế HER2 ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trastuzumab (Herceptin); lapatinib (Tykerb) hoặc AC-480.

Chất ức chế histon deacetylaza bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vorinostat (Zolinza).

Hormon ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tamoxifen (Soltamox; Nolvadex); raloxifen (Evista); megestrol (Megace); leuprolide (Lupron; Lupron Depot; Eligard; Viadur); fulvestrant (Faslodex); letrozol (Femara); triptorelin (Trelstar LA; Trelstar Depot); exemestan (Aromasin); goserelin (Zoladex); bicalutamide (Casodex); anastrozol (Arimidex); fluoxymesteron (Androxy; Halotestin); medroxyprogesteron (Provera; Depo-Provera); estramustin (Emcyt); flutamide (Eulexin); toremifene (Fareston); degarelix (Firmagon); nilutamide (Nilandron); abarelix (Plenaxis); hoặc testolacton (Teslac).

Chất ức chế phân bào ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, paclitaxel (Taxol; Onxol; Abraxane); docetaxel (Taxotere); vincristin (Oncovin; Vincasar PFS); vinblastin

(Velban); etoposide (Toposar; Etopophos; VePesid); teniposide (Vumon); ixabepilone (Ixempra); nocođazol; epothilon; vinorelbin (Navelbine); camptothecin (CPT); irinotecan (Camptosar); topotecan (Hycamtin); amsacrin hoặc lamellarin D (LAM-D).

Chất ức chế MTOR ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, everolimus (Afinitor) hoặc temsirolimus (Torisel); rapamun, ridaforolimus; hoặc AP23573.

Chất ức chế multi-kinaza ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sorafenib (Nexavar); sunitinib (Sutent); BIBW 2992; E7080; Zd6474; PKC-412; motesanib; hoặc AP24534.

Chất ức chế serin/threonin kinaza ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ruboxistaurin; eril/fasudil hydroclorua; flavopiridol; seliciclib (CYC202; Roscovitine); SNS-032 (BMS-387032); Pkc412; bryostatin; KAI-9803; SF1126; VX-680; Azd1152; Arry-142886 (AZD-6244); SCIO-469; GW681323; CC-401; CEP-1347 hoặc PD 332991.

Chất ức chế tyrosin kinaza ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, erlotinib (Tarceva); gefitinib (Iressa); imatinib (Gleevec); sorafenib (Nexavar); sunitinib (Sutent); trastuzumab (Herceptin); bevacizumab (Avastin); rituximab (Rituxan); lapatinib (Tykerb); cetuximab (Erbix); panitumumab (Vectibix); everolimus (Afinitor); alemtuzumab (Campath); gemtuzumab (Mylotarg); temsirolimus (Torisel); pazopanib (Votrient); dasatinib (Sprycel); nilotinib (Tasigna); vatalanib (Ptk787; ZK222584); CEP-701; SU5614; MLN518; XL999; VX-322; Azd0530; BMS-354825; SKI-606 CP-690; AG-490; WHI-P154; WHI-P131; AC-220; hoặc AMG888.

Chất ức chế VEGF/VEGFR ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bevacizumab (Avastin), sorafenib (Nexavar), sunitinib (Sutent), ranibizumab, pegaptanib, hoặc vandetanib.

Thuốc nhắm đích vi ống ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, paclitaxel, docetaxel, vincristin, vinblastin, nocođazol, epothilon và navelbin.

Thuốc gây độc topoisoмераза ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, teniposide, etoposide, adriamycin, camptothecin, daunorubicin, doxorubicin, mitoxantron, amsacrin, epirubicin và idarubicin.

Taxan hoặc dẫn xuất taxan ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, paclitaxel và docetaxol.

Chất ức chế điểm kiểm tra miễn dịch ví dụ bao gồm các chất ức chế gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1), phân tử CD274 (PD-L1) và protein kết hợp tế bào lympho T gây độc tế bào 4 (CTLA4). Chất ức chế PD-1 ví dụ bao gồm Pembrolizumab, Nivolumab và Cemiplimab. Chất ức chế PD-L1 ví dụ bao gồm Atezolizumab, Avelumab và Durvalumab. Chất ức chế CTLA4 ví dụ bao gồm Ipilimumab.

Chất chống tạo khối u dựa trên platin ví dụ bao gồm Cisplatin và Carboplatin.

Chất ức chế kinaza phụ thuộc xylin (CDK) ví dụ bao gồm abemaciclib, palbociclib, và ribociclib.

Chất ức chế poly (ADP-riboza) polymeraza (PARP) ví dụ bao gồm talazoparib, olaparib, rucaparib, niraparib và veliparib.

Chất hóa trị liệu, chất chống tạo khối u, chất chống tăng sinh thông thường ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, altretamin (Hexalen); isotretinoin (Accutane; Amnesteem; Claravis; Sotret); tretinoin (Vesanoid); azacitiđin (Vidaza); bortezomib (Velcade) asparaginaza (Elspar); levamisol (Ergamisol); mitotan (Lysodren); procarbazin (Matulane); pegaspargaza (Oncaspar); đênileukin điftitox (Ontak); porfimer (Photofrin); aldesleukin (Proleukin); lenaliđomide (Revlimid); bexaroten (Targretin); thaliđomide (Thalomid); temsirolimus (Torisel); arsen trioxit (Trisenox); verteporfin (Visudyne); mimosin (Leucenol); (1M tegafur - 0,4 M 5-clo-2,4-đihydroxypyrimiđin - 1 M kali oxonat) hoặc lovastatin.

Theo một số phương án, các phương thức điều trị kết hợp được đề xuất trong đó tác nhân trị liệu bổ sung là xytokin, ví dụ như, G-CSF (yếu tố kích thích khuẩn lạc bạch cầu hạt). Theo khía cạnh khác, dược phẩm được đề xuất ở đây có thể được dùng kết hợp với liệu pháp xạ trị. Liệu pháp xạ trị cũng có thể được dùng kết hợp với dược phẩm được đề xuất ở đây và tác nhân hóa trị liệu khác được mô tả trong bản mô tả này dưới dạng một phần của trị liệu đa tác nhân. Theo khía cạnh khác nữa, dược phẩm được đề xuất ở đây có thể được dùng kết hợp với dạng kết hợp hóa trị liệu tiêu chuẩn chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, CMF (xyclophosphamit, methotrexat và 5-flouraxin), CAF (xyclophosphamit, adriamycin và 5-flouraxin), AC (adriamycin và xyclophosphamit), FEC (5-flouraxin, epirubicin, và xyclophosphamit), ACT hoặc ATC (adriamycin, xyclophosphamit, và paclitaxel), rituximab, Xeloda (capecitabin), Cisplatin (CDDP), Carboplatin, TS-1 (tegafur, gimestat và otastat kali ở tỉ lệ mol bằng 1:0,4:1), Camptothecin-11 (CPT-11, Irinotecan hoặc Camptosar™), CHOP (xyclophosphamit, hydroxyđaurubicin, oncovin, và prednison hoặc prednisolon), R-CHOP

(rituximab, xyclophosphamit, hydroxyđaurubicin, oncovin, prednison hoặc prednisolon), hoặc CMFP (xyclophosphamit, methotrexat, 5-flouraxin và prednison).

Theo một số phương án được ưu tiên, dược phẩm được đề xuất ở đây có thể được dùng với chất ức chế của enzym, chẳng hạn như kinaza thụ thể hoặc không phải thụ thể. Kinaza thụ thể hoặc không phải thụ thể là, ví dụ như, tyrosin kinaza hoặc serin/threonin kinaza. Chất ức chế kinaza được mô tả trong bản mô tả này là các phân tử nhỏ, axit polynucleic, polypeptit, hoặc kháng thể.

Chất ức chế kinaza ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Bevacizumab (nhắm đích VEGF), BIBW 2992 (nhắm đích EGFR và Erb2), Cetuximab/Erbitux (nhắm đích Erb1), Imatinib/Gleevec (nhắm đích Bcr-Abl), Trastuzumab (nhắm đích Erb2), Gefitinib/Iressa (nhắm đích EGFR), Ranibizumab (nhắm đích VEGF), Pegaptanib (nhắm đích VEGF), Erlotinib/Tarceva (nhắm đích Erb1), Nilotinib (nhắm đích Bcr-Abl), Lapatinib (nhắm đích Erb1 và Erb2/Her2), GW-572016/lapatinib đitosylat (nhắm đích HER2/Erb2), Panitumumab/Vectibix (nhắm đích EGFR), Vandetinib (nhắm đích RET/VEGFR), E7080 (nhắm nhiều đích bao gồm RET và VEGFR), Herceptin (nhắm đích HER2/Erb2), PKI-166 (nhắm đích EGFR), Canertinib/CI-1033 (nhắm đích EGFR), Sunitinib/SU-11464/Sutent (nhắm đích EGFR và FLT3), Matuzumab/Emd7200 (nhắm đích EGFR), EKB-569 (nhắm đích EGFR), Zd6474 (nhắm đích EGFR và VEGFR), PKC-412 (nhắm đích VEGFR và FLT3), Vatalanib/Ptk787/ZK222584 (nhắm đích VEGFR), CEP-701 (nhắm đích FLT3), SU5614 (nhắm đích FLT3), MLN518 (nhắm đích FLT3), XL999 (nhắm đích FLT3), VX-322 (nhắm đích FLT3), Azd0530 (nhắm đích SRC), BMS-354825 (nhắm đích SRC), SKI-606 (nhắm đích SRC), CP-690 (nhắm đích JAK), AG-490 (nhắm đích JAK), WHI-P154 (nhắm đích JAK), WHI-P131 (nhắm đích JAK), sorafenib/Nexavar (nhắm đích RAF kinaza, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , KIT, FLT-3, và RET), Dasatinib/Sprycel (BCR/ABL và Src), AC-220 (nhắm đích Flt3), AC-480 (nhắm đích tất cả các protein HER, “panHER”), Motesanib điphosphat (nhắm đích VEGF1-3, PDGFR, và c-kit), Denosumab (nhắm đích RANKL, ức chế SRC), AMG888 (nhắm đích HER3), và AP24534 (nhắm nhiều đích bao gồm Flt3).

Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc dược phẩm có chứa polypeptit này được bọc lộ trong bản mô tả này được dùng cho đối tượng một lần mỗi ngày. Theo một số phương án, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc dược phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng hai ngày một lần. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc dược phẩm

có chứa chúng được dùng cho đối tượng ba ngày một lần. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng bốn ngày một lần. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng năm ngày một lần. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng polypeptit được dùng cho đối tượng sáu ngày một lần. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng một tuần một lần. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng 7-14 ngày một lần. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng 10-20 ngày một lần. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng 5-15 ngày một lần. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng 15-30 ngày một lần.

Theo một phương án, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế có chứa từ 0,005 đến 0,1 miligam/kg trong dung dịch có thể tiêm được. Theo phương án khác, liều lượng có chứa từ 0,005 đến 0,5 miligam/kg của protein dung hợp tái tổ hợp. Theo phương án khác, liều lượng có chứa từ 0,05 đến 0,1 microgam của protein dung hợp tái tổ hợp. Theo phương án khác, liều lượng có chứa từ 0,005 đến 0,1 miligam/kg của protein dung hợp tái tổ hợp trong dung dịch có thể tiêm được.

Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,0001 mg đến 0,6 mg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,001 mg đến 0,005 mg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,005 mg đến 0,01 mg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,01 mg đến 0,3 mg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,2 mg đến 0,6 mg.

Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100 mcg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 80 mcg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp

tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 20 đến 60 mcg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 50 mcg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 40 đến 80 mcg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 30 mcg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 60 mcg/kg.

Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mcg/kg đến 100 mg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mcg/kg đến 50 mg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mcg/kg đến 25 mg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mcg/kg đến 10 mg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mcg/kg đến 5 mg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mcg/kg đến 1 mg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mcg/kg đến 0,1 mg/kg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 10 mg/kg đến 60 mg/kg.

Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng bằng khoảng 0,5 mg/kg, khoảng 1 mg/kg, khoảng 2 mg/kg, khoảng 3 mg/kg, khoảng 4 mg/kg, khoảng 5 mg/kg, khoảng 6 mg/kg, khoảng 7 mg/kg, khoảng 8 mg/kg, khoảng 9 mg/kg, khoảng 10 mg/kg, khoảng 20 mg/kg, khoảng 30 mg/kg, khoảng 40 mg/kg, khoảng 50 mg/kg, khoảng 60 mg/kg hoặc khoảng 70 mg/kg.

Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,2 mg đến 2 mg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng

ở liều lượng nằm trong khoảng từ 2 mg đến 6 mg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 4 mg đến 10 mg. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 5 mg đến 15 mg.

Theo một phương án, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 10 $\mu\text{g/kg}$ đến 1000 $\mu\text{g/kg}$. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 25 $\mu\text{g/kg}$ đến 600 $\mu\text{g/kg}$. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 50 $\mu\text{g/kg}$ đến 400 $\mu\text{g/kg}$. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng bằng khoảng 25 $\mu\text{g/kg}$. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng bằng khoảng 50 $\mu\text{g/kg}$. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng bằng khoảng 100 $\mu\text{g/kg}$. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng bằng khoảng 200 $\mu\text{g/kg}$. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng bằng khoảng 300 $\mu\text{g/kg}$. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng bằng khoảng 400 $\mu\text{g/kg}$. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng bằng khoảng 500 $\mu\text{g/kg}$. Theo phương án khác, protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ở liều lượng bằng khoảng 600 $\mu\text{g/kg}$.

Theo một phương án, liều dùng một lần đơn lẻ của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng. Theo phương án khác, tổng cộng hai liều được dùng cho đối tượng. Theo phương án khác, tổng cộng hai hoặc hơn hai liều được dùng cho đối tượng.

Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ít nhất là một lần mỗi ngày. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ít nhất là hai ngày một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái

Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 36 giờ một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 48 giờ một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 60 giờ một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 72 giờ một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 84 giờ một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 96 giờ một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 5 ngày một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 6 ngày một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 7 ngày một lần.

là 7 ngày một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 8-10 ngày một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 10-12 ngày một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 12-15 ngày một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 15-25 ngày một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 20-30 ngày một lần.

Theo một phương án, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng cho đối tượng ít nhất là 1 tháng một lần. Theo một phương án, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 2 tháng một lần. Theo một phương án, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 3 tháng một lần. Theo một phương án, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 4 tháng một lần. Theo một phương án, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 5 tháng một lần. Theo một phương án, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 6 tháng một lần. Theo một phương án, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng ít nhất là 6-12 tháng một lần. Theo phương án khác, liều lượng của protein dung hợp tái tổ hợp hoặc được phẩm có chứa chúng được dùng hàng quý. Theo phương án khác, liều lượng được dùng hàng ngày, hàng tuần, hai tuần một lần, hàng tháng hoặc hàng năm. Theo phương án khác, liều lượng được dùng một lần, hai lần, hoặc hai hoặc hơn hai lần trong một ngày, một tuần, một tháng hoặc một năm. Theo phương án khác, liều lượng được dùng hai, ba, bốn, hoặc ít nhất là năm năm một lần.

Theo một phương án, việc dùng lặp lại (liều lượng) của được phẩm theo sáng chế có thể được thực hiện ngay sau khoảng thời gian điều trị thứ nhất hoặc sau khoảng thời gian tính theo ngày, tuần, hoặc năm để đạt được tác dụng mong muốn như được đề xuất thêm ở đây (ví dụ như để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch, hoặc bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến CNS).

Theo một phương án, được phẩm được dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch, trong động mạch, dưới da hoặc trong cơ của chế phẩm lỏng. Theo phương án khác, chế phẩm lỏng bao gồm dung dịch, huyền phù, dịch phân tán, nhũ tương, dầu và dạng tương tự. Theo một

phương án, được phẩm được dùng trong tĩnh mạch, và do đó được tạo chế phẩm ở dạng thích hợp để dùng trong tĩnh mạch. Theo phương án khác, được phẩm được dùng trong động mạch, và do đó được tạo chế phẩm ở dạng thích hợp để dùng trong động mạch.

Theo một số phương án, được phẩm để sử dụng trong phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này có chứa dung dịch hoặc nhũ tương, mà theo một số phương án là dung dịch hoặc nhũ tương trong nước có chứa lượng an toàn và hữu hiệu của hợp chất được bộc lộ trong bản mô tả này và tùy ý, hợp chất khác, được dự kiến để dùng trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

Theo một số phương án, các thành phần khác nhau của được phẩm được đo trước và/hoặc được đóng gói trước và/hoặc sẵn sàng để sử dụng mà không cần đo nữa, v.v.. Sáng chế cũng tùy ý có chứa bộ kit để thực hiện/sử dụng phương pháp và/hoặc được phẩm theo sáng chế. Cụ thể là, các bộ kit này tùy ý bao gồm, ví dụ như, protein dung hợp tái tổ hợp thích hợp (và tùy ý hỗn hợp của một số lượng các protein này để thực hiện việc điều trị hiệp đồng, xem, ở trên), và tùy ý cũng như là (các) kháng nguyên liên quan đến bệnh thích hợp). Ngoài ra, bộ kit này cũng có thể có chứa tá dược thích hợp (ví dụ như, tá dược được dùng) để thực hiện việc điều trị triệu chứng và/hoặc phòng ngừa theo sáng chế. Bộ kit này tùy ý chứa các thành phần bổ sung để lắp ráp và/hoặc sử dụng được phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ví dụ như, chất pha loãng, v.v..

Được phẩm được mô tả trong bản mô tả này tùy ý được đóng gói để bao gồm tất cả (hoặc gần như tất cả) các thành phần cần thiết để thực hiện phương pháp theo sáng chế hoặc để sử dụng được phẩm theo sáng chế (tùy ý bao gồm, ví dụ như, hướng dẫn sử dụng dạng văn bản của phương pháp/được phẩm theo sáng chế). Ví dụ như, bộ kit có thể tùy ý bao gồm các thành phần như, ví dụ như, chất đệm, chất phản ứng, protein huyết thanh, kháng thể, cơ chất, v.v.. Trong trường hợp chất phản ứng đã được đóng gói sẵn, bộ kit tùy ý bao gồm lượng đã được đo sẵn hoặc được định liều sẵn mà sẵn sàng để kết hợp vào phương pháp mà không cần đo, ví dụ như, các phân phân ước dịch lỏng đã được đo sẵn, hoặc chất phản ứng dạng rắn đã được cân sẵn hoặc được đo sẵn mà có thể được hoàn nguyên dễ dàng bởi người dùng cuối của bộ kit.

Bộ kit này cũng thường bao gồm hướng dẫn thích hợp để thực hiện phương pháp theo sáng chế và/hoặc để sử dụng được phẩm theo sáng chế. Theo một số phương án, các thành phần của bộ kit/gói được cung cấp ở dạng ổn định, nhờ đó ngăn ngừa sự thoái biến hoặc sự mất mát khác trong quá trình lưu trữ trong thời gian dài, ví dụ như, do sự rò rỉ. Nhiều quy

trình/tác nhân làm ổn định được dùng rộng rãi cho chất phản ứng, v.v. mà cần được lưu trữ, chẳng hạn như sự bao gồm của các chất làm ổn định hóa học (tức là, chất ức chế enzym, chất diệt vi sinh vật/chất kìm hãm vi khuẩn, chất chống kết tụ), v.v.. Mức liều lượng thực sự của các thành phần hoạt tính trong dược phẩm theo sáng chế có thể được thay đổi nhờ đó thu được lượng của thành phần hoạt tính mà hữu hiệu để đạt được đáp ứng trị liệu mong muốn đối với đối tượng, hợp phần, và phương thức dùng cụ thể, mà không gây độc cho đối tượng. Mức liều lượng được chọn phụ thuộc vào nhiều yếu tố dược động học bao gồm hoạt tính của dược phẩm 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, thuốc khác, hợp chất và/hoặc nguyên liệu được sử dụng kết hợp với dược phẩm cụ thể được sử dụng, tuổi, giới tính, cân nặng, tình trạng, sức khỏe chung và tiền sử y tế trước đây của đối tượng cần điều trị, và các yếu tố tương tự đã được biết rõ trong lĩnh vực y tế.

Dược phẩm phải tiệt trùng và lưu động đến mức mà dược phẩm này có thể phân phối được bằng xy lanh. Ngoài nước, tốt hơn là chất mang là dung dịch nước muối được đệm đẳng trương. Độ lưu động phù hợp có thể được duy trì, ví dụ như, bằng cách sử dụng lớp phủ chẳng hạn như lecithin, bằng cách duy trì kích thước hạt yêu cầu trong trường hợp của dịch phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Trong nhiều trường hợp, tốt hơn nếu bao gồm các chất đẳng trương, ví dụ như đường, rượu đa chức như manitol hoặc sorbitol, và natri clorua trong dược phẩm.

Mức liều lượng thực sự của thành phần hoạt tính trong dược phẩm theo sáng chế có thể thay đổi sao cho đạt được lượng của thành phần hoạt tính mà hữu hiệu để đạt được đáp ứng điều trị mong muốn đối với đối tượng, dược phẩm và cách thức sử dụng cụ thể, mà không gây độc cho đối tượng. Mức liều lượng được chọn phụ thuộc vào nhiều yếu tố dược động học bao gồm hoạt tính của dược phẩm 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, thuốc khác, hợp chất và/hoặc nguyên liệu được sử dụng kết hợp với dược phẩm cụ thể được sử dụng, tuổi, giới tính, cân nặng, tình trạng, sức khỏe chung và tiền sử y tế trước đây của đối tượng cần điều trị, và các yếu tố tương tự đã được biết rõ trong lĩnh vực y tế.

Mặt dù một vài phương án của sáng chế đã được mô tả và được minh họa trong bản mô tả này, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực sẽ dễ dàng hình dung ra nhiều phương thức và/hoặc cấu trúc khác để thực hiện chức năng này và/hoặc thu được kết quả và/hoặc một hoặc nhiều ưu điểm được mô tả trong bản mô tả này, và mỗi sự thay đổi và/hoặc cải biến như

vậy được coi là nằm trong phạm vi của các phương án của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này. Thông thường hơn, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực dễ dàng hiểu được rằng tất cả các thông số, kích thước, nguyên liệu, và cấu hình được mô tả trong bản mô tả này là để làm ví dụ và các thông số, kích thước, nguyên liệu, và/hoặc cấu hình thực sự sẽ phụ thuộc vào ứng dụng hoặc các ứng dụng cụ thể mà các hướng dẫn của sáng chế được áp dụng cho. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra, hoặc có thể biết chắc chắn bằng cách sử dụng không gì khác hơn là thí nghiệm thông thường, nhiều dạng tương đương đối với phương án cụ thể của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này. Do đó, cần hiểu rằng các phương án trên đây được thể hiện chỉ để làm ví dụ và trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo và các dạng tương đương của chúng, các phương án của sáng chế có thể được thực hành theo cách khác với cách được mô tả và được yêu cầu bảo hộ cụ thể. Các phương án của sáng chế trong bản bộc lộ này hướng đến mỗi dấu hiệu, hệ thống, vật phẩm, nguyên liệu, bộ kit, và/hoặc phương pháp cụ thể được mô tả trong bản mô tả này. Ngoài ra, dạng kết hợp bất kỳ của hai hoặc hơn hai dấu hiệu, hệ thống, vật phẩm, nguyên liệu, bộ kit, và/hoặc phương pháp này, nếu các dấu hiệu, hệ thống, vật phẩm, nguyên liệu, bộ kit, và/hoặc phương pháp này không mâu thuẫn với nhau, được bao gồm ở trong phạm vi của sáng chế.

Tất cả các định nghĩa, như được định nghĩa và dùng trong bản mô tả này, cần được hiểu là có ý nghĩa chi phối hơn là các định nghĩa theo từ điển, các định nghĩa trong các tài liệu được kết hợp để tham khảo, và/hoặc nghĩa thông thường của các thuật ngữ được định nghĩa.

Tất cả các tài liệu tham khảo, bằng độc quyền sáng chế và đơn đăng ký sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả này được kết hợp để tham khảo đối với đối tượng mà mỗi tài liệu được viện dẫn cho nó, mà trong một số trường hợp có thể bao hàm toàn bộ nội dung của tài liệu đó.

Các mạo từ không xác định, như dùng trong bản mô tả này và trong các yêu cầu bảo hộ, trừ khi được chỉ ra rõ ràng là có nghĩa trái ngược, cần được hiểu có nghĩa là “ít nhất là một.”

Cụm từ “và/hoặc,” như dùng trong bản mô tả này trong và trong các yêu cầu bảo hộ, cần được hiểu có nghĩa là “một trong hai hoặc cả hai” của các thành phần được kết hợp, tức là, các thành phần mà có mặt liên hợp với nhau trong một số trường hợp và có mặt tách rời trong các trường hợp khác. Nhiều thành phần được liệt kê với “và/hoặc” cần được hiểu theo cùng cách, tức là, “một hoặc nhiều” thành phần được kết hợp như vậy. Các thành phần khác

có thể tùy ý có mặt ngoài các thành phần được xác định cụ thể bởi mệnh đề “và/hoặc”, dù có liên quan hay không có liên quan đến các thành phần được xác định cụ thể này. Do đó, ví dụ không làm giới hạn sáng chế là, việc đề cập đến “A và/hoặc B”, khi dùng kết hợp với ngôn ngữ kết thúc mở chẳng hạn như “có chứa” có thể, theo một phương án, dùng để chỉ việc chỉ có A (tùy ý bao gồm các thành phần không phải là B); theo phương án khác, dùng để chỉ việc chỉ có B (tùy ý bao gồm các thành phần không phải là A); theo phương án khác, dùng để chỉ việc có cả hai A và B (tùy ý bao gồm các thành phần khác); v.v..

Như sử dụng trong bản mô tả này và trong các yêu cầu bảo hộ, cụm từ “ít nhất là một,” khi đề cập đến danh sách gồm một hoặc nhiều thành phần, cần được hiểu có nghĩa là ít nhất là một thành phần được chọn từ một hoặc nhiều thành phần bất kỳ trong danh sách của các thành phần, nhưng không nhất thiết bao gồm ít nhất là một trong số mỗi và mọi thành phần được liệt kê cụ thể ở trong danh sách của các thành phần và không loại trừ dạng kết hợp bất kỳ của các thành phần trong danh sách của các thành phần. Định nghĩa này cũng cho phép các thành phần có thể tùy ý có mặt ngoài các thành phần được xác định cụ thể ở trong danh sách của các thành phần mà cụm từ “ít nhất là một” đề cập đến, dù có liên quan hay không có liên quan đến các thành phần được xác định cụ thể này. Do đó, ví dụ không làm giới hạn sáng chế là, “ít nhất là một trong số A và B” (hoặc, theo cách tương đương là, “ít nhất là một trong số A hoặc B,” hoặc, theo cách tương đương là “ít nhất là một trong số A và/hoặc B”) có thể, theo một phương án, dùng để chỉ ít nhất là một, tùy ý bao gồm nhiều hơn một, A, không có B (và tùy ý bao gồm các thành phần không phải là B); theo phương án khác, dùng để chỉ ít nhất là một, tùy ý bao gồm nhiều hơn một, B, không có A (và tùy ý bao gồm các thành phần không phải là A); theo phương án khác nữa, dùng để chỉ ít nhất là một, tùy ý bao gồm nhiều hơn một, A, và ít nhất là một, tùy ý bao gồm nhiều hơn một, B (và tùy ý bao gồm các thành phần khác); v.v..

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để ngăn ngừa, điều trị hoặc làm chậm bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch ở người, trong đó bộ kit có chứa một hoặc nhiều liều lượng của dược phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này dùng cho ngăn ngừa, điều trị hoặc làm chậm bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch, và hướng dẫn sử dụng chế phẩm dược hoặc dược phẩm.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để ngăn ngừa, điều trị hoặc làm chậm bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến CNS ở người, trong đó bộ kit có chứa một hoặc nhiều liều lượng của dược phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này dùng

cho ngăn ngừa, điều trị hoặc làm chậm bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch, và hướng dẫn sử dụng chế phẩm được hoặc được phẩm.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để ngăn ngừa, điều trị hoặc làm chậm suy tim với phân suất tổng máu được bảo toàn ở người, trong đó bộ kit có chứa một hoặc nhiều liều lượng của được phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này dùng cho ngăn ngừa, điều trị hoặc làm chậm suy tim với phân suất tổng máu được bảo toàn, và hướng dẫn sử dụng chế phẩm được hoặc được phẩm.

Các ví dụ sau đây được trình bày để minh họa đầy đủ hơn các phương án được ưu tiên của sáng chế. Tuy nhiên, chúng không được hiểu theo bất kỳ cách nào là làm giới hạn phạm vi rộng của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - Tách dòng và tạo cấu trúc plasmit biểu hiện

Các trình tự ADN mã hóa cho chuỗi nặng của protein dung hợp tái tổ hợp (được gọi là NPCFA và NPCF lần lượt đối với trình tự có hoặc không có các đột biến Fc) và chuỗi nhẹ của protein dung hợp tái tổ hợp (được gọi là PAL) được tổng hợp bằng GENEWIZ (Suzhou, Trung Quốc). Vector biểu hiện pCHOGUN có được từ Horizon Discovery (Cambridge, UK) theo hợp đồng lixăng. Việc tạo cấu trúc của plasmit biểu hiện được thực hiện như tóm tắt trên Fig. 1. Một cách vắn tắt, vector pCHOGUN được tạo mạch thẳng bằng enzym giới hạn BfuAI và mảnh cài xen gen chẳng hạn như NPCF, NPCFA, và PAL được tinh chế sau khi cắt bằng enzym giới hạn hai lần bằng NcoI và AscI. pCHOGUN/BfuAI đã được tạo mạch thẳng và mảnh cài xen gen đã được tinh chế được nối theo quy trình tiêu chuẩn và sau đó được biến nạp vào tế bào có đủ khả năng DH5 α E.coli. Tế bào DH5 α được lắng ra đĩa và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Các plasmit pCHOGUN-NPCF, pCHOGUN-NPCFA và pCHOGUN-PAL được phân lập và được xác nhận bằng cách cắt bằng enzym giới hạn hoặc PCR. Plasmit chứa đoạn cài xen chuỗi nặng (pCHOGUN-NPCF hoặc pCHOGUN-NPCFA) được cắt bằng các enzym giới hạn BspEI và PciI, trong khi plasmit chứa đoạn cài xen chuỗi nhẹ (pCHOGUN-PAL) được cắt bằng các enzym giới hạn NgoMIV và PciI. Sau khi cắt bằng enzym giới hạn, mảnh có đoạn cài xen chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được tinh chế, được nối và sau đó được biến nạp vào tế bào DH5 α . Cấu trúc plasmit chứa cả đoạn cài xen chuỗi nặng và đoạn cài xen chuỗi nhẹ (pCHOGUN-NPCF+PAL hoặc pCHOGUN-NPCFA+PAL) được xác định và được xác nhận bằng cách cắt bằng enzym giới hạn và xác định trình tự ADN.

Ví dụ 2 - Sự sản xuất, sự tinh chế và sự xác định đặc điểm kháng thể

HD-BIOP3, dòng tế bào không có glutamin synthetaza ($GS^{-/-}$) có nguồn gốc từ tế bào CHO K1, có được từ Horizon Discovery (Cambridge, UK) theo hợp đồng lixăng. ADN plasmid được phân lập bằng cách sử dụng bộ Kit Qiagen Plasmid có trên thị trường. Sự chuyển nhiễm của ADN plasmid vào tế bào HD-BIOP3 được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống đục lỗ điện có sẵn trên thị trường từ Lonza. Tế bào đã được chuyển nhiễm được lắng ra đĩa 96 giếng và trải qua sự chọn lọc tập hợp bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn. Tế bào từ các tập hợp được chọn được nuôi cấy trong bình thót cổ lắc 125 ml trong 10-14 ngày và môi trường được thu hoạch để tinh chế kháng thể. Protein kháng thể được tinh chế bằng sắc ký ái lực protein-A sau đó là sắc ký loại trừ kích thước và sau đó được phân tích bằng SDS-PAGE và thẩm tách Western theo các quy trình tiêu chuẩn.

Fig. 2A minh họa sơ đồ cấu tạo của protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Fig. 2B thể hiện dữ liệu đại diện được tạo ra bằng phân tích SDS-PAGE. Kết quả thẩm tách Western được phát hiện bằng kháng thể sơ cấp đặc hiệu đối với mảnh hoạt tính có 61 axit amin của NRG-1 có chứa miền liên kết HER3/4 ("NRG-1", R&D Systems, Minneapolis, MN) hoặc IgG lần lượt được thể hiện trên Fig. 2C và Fig. 2D.

Ví dụ 3 - Tính toán vện phân tử được đánh giá bằng thử nghiệm liên kết dựa trên SPR

Tính toán vện cấu trúc phân tử của protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này được đánh giá bằng cách đánh giá khả năng liên kết đồng thời của nó với protein HER3 và kháng thể kháng-NRG-1. Protein tái tổ hợp HER3 đã gắn đuôi His (Sino Biological, Beijing, Trung Quốc) được bắt giữ trên chip cảm biến được cố định bằng kháng thể kháng-His (Thermo Fisher, Waltham, MA) (Bước 1), sau đó là sự phun mẫu (bao gồm protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này, protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này mà không có các đột biến Fc, mAb kháng-HER3 (Bước 2), và kháng thể kháng-NRG-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) (Bước 3). Sự gắn của His-HER3 trên chip cảm biến có thể được trực quan hóa thông qua sự tăng lên của tín hiệu trên cả 6 kênh trong bước 1. Cả protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này và protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này mà không có các đột biến Fc đều tạo ra đáp ứng đáng kể ở bước 2 bằng cách liên kết với HER3 và ở bước 3 bằng cách liên kết với kháng thể kháng-NRG-1 được phun (Ch1, 3), chỉ ra sự có mặt của epitop liên kết HER3 và NRG-1 trên protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Ngược lại, mAb kháng-HER3 chỉ liên

kết với His-HER3 ở bước 2, nhưng không có kháng thể kháng-NRG-1 và chất đệm (Bước 3) (Ch 4, 5), xác nhận sự không có mặt của hoạt tính liên kết NRG-1 đối với phân tử mAb kháng-HER3. Chất đệm được phun ở Bước 2 và 3 làm đối chứng trống. Do đó, cả epitop liên kết HER3 và NRG-1 đều có mặt trong protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế.

Biểu đồ cảm biến liên kết và trình tự phun mẫu thể hiện trên Fig. 3.

Ví dụ 4 - Tác dụng trên sự tăng sinh dòng tế bào khối u *in vitro*

Tế bào khối u được cấy trong đĩa 96 giếng ở mật độ 2.500-20.000 tế bào trong mỗi giếng, tùy thuộc vào động học sinh trưởng của mỗi dòng tế bào. Sau đó tế bào được xử lý bằng protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này, kháng thể hoặc protein đối chứng trong dãy pha loãng theo dãy 1:4 từng bước trong 5 ngày. Khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng Cell Counting Kit-8 từ Dojindo Molecular Technologies (Kumamoto, Nhật Bản) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism và được thể hiện dưới dạng tỉ lệ của sự sinh trưởng tương quan với đối chứng không được xử lý.

Fig. 4 bao gồm các đồ thị đại diện thể hiện tốc độ sinh trưởng tương đối trung bình $\pm$ SEM ($n = 3$) đối với các dòng tế bào ung thư khác nhau: (A) NCI-N87, dạ dày; (B) MCF-7, vú; (C) RT-112, bàng quang; và (D) T47D, vú. So với NRG-1 đối chứng và protein dung hợp mAb GP120/NRG-1, protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này chứng tỏ hoạt tính thấp hơn đáng kể trong việc thúc đẩy sự tăng sinh tế bào ung thư.

Ví dụ 5 - Sự hoạt hóa của con đường truyền tín hiệu PI3K/AKT ở tế bào cơ tim người

Tế bào cơ tim người thu được từ Cellular Dynamics (Madison, WI) được cấy trong đĩa 96 giếng được phủ gelatin 0,1% và được thu hồi trong môi trường lách đĩa (Cellular Dynamics) trong 4 giờ. Sau đó tế bào được nuôi cấy trong môi trường duy trì (Cellular Dynamics) trong 96 giờ trước khi dùng để thí nghiệm. Để đánh giá khả năng của protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế để hoạt hóa con đường truyền tín hiệu HER2:HER4 ở tế bào cơ tim, tế bào trước hết bị bỏ đói trong 4 giờ trong môi trường không chứa huyết thanh và sau đó được xử lý bằng protein dung hợp tái tổ hợp hoặc các tác nhân đối chứng (NRG-1, mAb GP120/NRG-1, mAb kháng-HER3, hoặc mAb GP120) trong dãy pha loãng theo dãy 1:4 từng bước trong 15 phút. Khi kết thúc việc xử lý, tế bào được dung giải và được phân tích về sự phosphoryl hóa AKT bằng cách sử dụng bộ kit Phospho-AKT/Total AKT ELISA của Abcam (Cambridge, MA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm

GraphPad Prism và được thể hiện dưới dạng tỉ lệ của phospho-AKT với AKT tổng số tương quan với đối chứng không được xử lý.

Để phân tích thẩm tách Western, tế bào được cấy trong đĩa 6 giếng và được xử lý bằng protein dung hợp tái tổ hợp theo sáng chế hoặc các tác nhân đối chứng ở nồng độ đơn lẻ bằng 16 nM. Khi kết thúc việc xử lý, tế bào được dung giải trong chất đệm dung giải RIPA chứa các chất ức chế proteaza và phosphataza. SDS-PAGE và thẩm tách Western được thực hiện theo quy trình tiêu chuẩn. AKT tổng số và phosphor-AKT được thẩm tách lần lượt với kháng thể thỏ AKT và kháng thể thỏ p-AKT(S473) (Cell Signaling; Danvers, MA).

Fig. 5 thể hiện sự phosphoryl hóa AKT khi đáp ứng với kích thích ở tế bào cơ tim người. Kết quả gợi ý rằng protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể hoạt hóa con đường truyền tín hiệu HER2:HER4 ở tế bào cơ tim với hiệu lực có thể so sánh được với NRG-1.

Ví dụ 6: Sự gây cảm ứng của sự dimer hóa HER2:HER3 và sự dimer hóa HER2:HER4

Thử nghiệm dimer hóa PathHunter phát triển bởi Eurofins DiscoverX (Fremont, CA) phát hiện sự dimer hóa được gây cảm ứng bởi phối tử của hai tiểu đơn vị của cặp thụ thể-dimer. Nguyên tắc thử nghiệm được minh họa trên Fig. 6A. Enzym β -gal được chia thành hai mảnh, ProLink (PK) và thụ thể enzym (EA). Các tế bào đã được thiết kế để đồng biểu hiện protein đích 1 dung hợp với thể cho enzym PK, và protein đích 2 dung hợp với thể nhận enzym EA. Sự liên kết của phối tử với một protein đích làm cho nó tương tác với protein đích kia, buộc xảy ra sự bổ sung của hai mảnh enzym và dẫn đến phản ứng enzym để giải phóng tín hiệu phát quang hóa học mà được phát hiện dưới dạng Đơn Vị Huỳnh Quang Tương Đối hay RFU.

Dòng tế bào dimer hóa PathHunter U2OS ErbB2/ErbB4 và dòng tế bào dimer hóa ErbB2/ErbB3 thu được từ Eurofins DiscoverX. Tế bào được cấy ở mật độ 4.000 tế bào/giếng trong đĩa 384 giếng và được ủ ở nhiệt độ 37°C/CO₂ 5% qua đêm. Các chất thử nghiệm được điều chế trong dãy pha loãng theo dãy 1:4 từng bước bắt đầu từ 28,8 nM, và sau đó được bổ sung vào tế bào trong đĩa 384 giếng. Sau khi ủ 4 giờ, tế bào được thử nghiệm về sự dimer hóa thụ thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism và được thể hiện dưới dạng RFU trung bình $\pm$ SEM (n = 3).

Như thể hiện trên Fig. 6B và Fig. 6C, protein dung hợp tái tổ hợp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể gây cảm ứng sự dimer hóa HER2/HER4 với hiệu lực có thể so sánh được với NRG-1; trong khi khả năng của nó để gây cảm ứng sự dimer hóa HER2/HER3 yếu hơn

nhiều. Dưới dạng đối chứng âm cho nghiên cứu này, cả kháng thể đối chứng isotyp mAb GP120 và mAb kháng-HER3 đều không gây cảm ứng sự diêm hóa thụ thể.

Với các phương án được mô tả của sáng chế có tham khảo đến các hình vẽ kèm theo, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương án chính xác, và các thay đổi và cải biến khác nhau có thể được thực hiện trong bản mô tả này bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực mà không nằm ngoài phạm vi hoặc tinh thần của sáng chế như được định nghĩa trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 7: Hiệu quả in vivo của protein dung hợp tái tổ hợp trong mô hình chuột cống của suy tim tâm thu

Để đánh giá khả năng của protein dung hợp tái tổ hợp để tái tạo chức năng tim ở mô hình bệnh, mô hình chuột cống Sprague Dawley của nhồi máu cơ tim và suy tim tâm thu được sử dụng. Để thiết lập mô hình bệnh, chỉ lựa 6-0 được sử dụng để nối động mạch cảnh đi xuống phía trước bên trái (LAD) 3-4 mm dưới phần phụ tâm nhĩ trái trong quy trình phẫu thuật. Bốn tuần sau khi nối, phân suất tống máu (EF) được ghi lại bằng siêu âm Doppler siêu âm tim ký (ECG) chế độ M để đo chức năng tim chống lại EF đường cơ sở trước khi phẫu thuật. Ngưỡng của sự giảm đi nhỏ nhất 30% của EF được sử dụng để bao gồm trong nghiên cứu tiếp theo. Các con vật đối chứng vờ trải qua phẫu thuật giống hệt mà không có sự nối LAD.

Sau khi thiết lập mô hình bệnh, các con vật được chia thành năm nhóm với mười một con chuột cống trong mỗi nhóm, với mười con chuột cống phẫu thuật vờ nữa được bao gồm trong nhóm thứ sáu. Nghiên cứu được thiết kế cho mỗi nhóm để tiếp nhận sự tiêm tĩnh mạch đuôi hai lần mỗi tuần trong khoảng thời gian bốn tuần, hay tổng cộng tám lần tiêm. Cả nhóm phẫu thuật vờ và đối chứng âm của nhóm tá được lỏng đều tiếp nhận nước muối, ba nhóm tiếp nhận protein dung hợp tái tổ hợp ở mức 1, 3, hoặc 10 mg/kg, và nhóm cuối cùng tiếp nhận đối chứng dương của protein dung hợp mAb GP120/NRG-1 (10 mg/kg).

Do sự giảm khối lượng cơ thể quan sát thấy trong quá trình nghiên cứu, việc điều trị được đình chỉ trước khi toàn bộ trình tự của tám lần tiêm trong các nhóm protein dung hợp tái tổ hợp tiếp nhận 3 mg/kg và 10 mg/kg, với các nhóm lần lượt tiếp nhận chỉ sáu và ba lần tiêm. Tất cả các nhóm khác tiếp nhận toàn bộ tập hợp tám lần tiêm.

Bốn tuần sau lần điều trị thứ nhất, EF được đo lại bằng ECG chế độ M. Như thể hiện trên Fig. 8, tương quan với đường cơ sở protein dung hợp tái tổ hợp làm tăng đáng kể EF ở cả ba nhóm liều lượng. Cụ thể là, sự tăng lên 14,7% ($P<0,001$), 26,9% ($P<0,001$), và 36,6%

($P < 0,001$) được quan sát thấy lần lượt đối với các nhóm 1, 3, và 10 mg/kg. Đối chứng dương mAb GP120/NRG-1 làm tăng EF lên 28,8% ($P < 0,001$) ở thời điểm ngang bằng. Nước muối cho thấy không có tác dụng lên nhóm đối chứng vờ hoặc nhóm đối chứng tá được lỏng.

Sau khi thu được giá trị ECG vào 28 ngày sau điều trị, các con chuột bị giết chết êm ái và các mô tim ở gần vị trí phẫu thuật được thu lấy, được cố định trong formaldehyt 4%, và được nhúng trong parafin. Các phần parafin dày năm μm của mô tim được nhuộm màu bằng các thuốc nhuộm hematoxylin và eosin, và sự thay đổi mô bệnh học được quan sát dưới kính hiển vi quang học. Như thể hiện trên Fig. 9, trong nhóm phẫu thuật vờ, tế bào cơ tim được sắp xếp theo kiểu có thứ tự và tế bào chất và sợi cơ tim được bắt màu đồng đều. Không quan sát thấy sự thâm nhiễm tế bào viêm trong khoảng kẽ và không phát hiện thấy sự hoại tử cơ tim. Ngược lại, trong nhóm đối chứng tá được lỏng, vùng rìa nhồi máu cơ tim thể hiện các khe mở rộng giữa các tế bào cơ tim; nhân bị cô đặc và vỡ vụn và sự sắp xếp sợi cơ tim bị mất kết cấu có trật tự của nó; kích thước tế bào bị mở rộng và phù nề được quan sát thấy. Việc điều trị bằng protein dung hợp tái tổ hợp làm giảm bớt một phần sự thay đổi bệnh lý trong vùng nhồi máu cơ tim, bao gồm sự giảm đi đáng kể của tế bào hoại tử, khoảng kẽ giữa các tế bào cơ tim thu hẹp lại, và sự phục hồi của sự sắp xếp sợi cơ tim về phía kết cấu bình thường.

Ví dụ 8: Protein dung hợp tái tổ hợp làm giảm sự phát triển khối u trong mô hình mảnh ghép khác loài ung thư biểu mô FaDu dưới da ở chuột nhắt NOD/SCID

Để đánh giá nguy cơ tiềm ẩn của protein dung hợp tái tổ hợp trong việc thúc đẩy sự phát triển khối u, nghiên cứu *in vivo* ở mô hình mảnh ghép khác loài ung thư biểu mô FaDu được tiến hành. Chuột nhắt NOD/SCID (Beijing AK Bio-Technology Co. Ltd.) được nuôi trong phương tiện SPF tại trung tâm R&D quốc tế CrownBio (Beijing, Trung Quốc) tuân theo hướng dẫn của ủy ban. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện tuân theo các yêu cầu của Tổ Chức Đánh Giá Và Công Nhận Sự Chăm Sóc Động Vật Thí Nghiệm (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care - AAALAC) và với sự cho phép của Ủy ban IACUC CrownBio (CrownBio IACUC Committee).

Chuột nhắt NOD/SCID cái, 7-10 tuần tuổi, được gây nhiễm dưới da trong sườn phải bằng tế bào khối u FaDu (3×10^6) đã được tạo huyền phù trong 0,1 ml PBS. Khi khối u đạt xấp xỉ 150 mm^3 , các con chuột nhắt được ngẫu nhiên hóa và được phân vào 6 nhóm nghiên cứu với 8 các con trong mỗi nhóm. Các mẫu thử nghiệm được dùng trong tĩnh mạch bằng cách tiêm tĩnh mạch đuôi hai lần mỗi tuần trong ba tuần liên tiếp, tổng cộng là 6 lần điều trị.

Sự phát triển khối u được theo dõi bằng cách đo bằng thước kẹp. Nghiên cứu được kết thúc vào 21 ngày sau khi điều trị.

Sự phát triển khối u khi đáp ứng với các điều trị khác nhau được tóm tắt trên Fig. 10. mAb kháng-HER3 ở 10 mg/kg thể hiện hoạt tính kháng khối u đáng kể với sự ức chế phát triển khối u (TGI) bằng 93,5% khi kết thúc nghiên cứu ($p < 0,001$ so với nhóm tá dược lỏng). Protein dung hợp tái tổ hợp cũng chứng tỏ TGI đáng kể về mặt thống kê khi kết thúc nghiên cứu: 19,2% ở liều lượng 1 mg/kg ($p=0,048$ so với nhóm tá dược lỏng) và 56,2% ở liều lượng 10 mg/kg ($p<0,001$ so với nhóm tá dược lỏng). Phân tử đối chứng protein dung hợp mAb GP120/NRG-1 không thể hiện hoạt tính kháng khối u ở cả liều lượng cao hoặc liều lượng thấp. Không có con vật nào bị chết trong quá trình nghiên cứu. Tất cả các chất thử nghiệm được dung chịu tốt bởi các con chuột nhắt mang khối u. Không có sự giảm khối lượng cơ thể đáng kể được quan sát thấy ở nhóm thí nghiệm bất kỳ (Fig. 11). Dữ liệu này cho thấy rằng trong điều kiện sự phát triển khối u tích cực *in vivo*, protein dung hợp tái tổ hợp thể hiện sự ức chế phát triển khối u theo phương thức phụ thuộc liều lượng, và gợi ý rằng nguy cơ của protein dung hợp tái tổ hợp làm gia tăng hoặc làm tăng tốc sự phát triển khối u *in vivo* là thấp hơn so với protein NRG-1 tự nhiên.

Ví dụ 9: Không quan sát thấy sự gây độc dạ dày-ruột đáng kể ở khi cynomolgus được dùng protein dung hợp tái tổ hợp

Trước đây đã có báo cáo rằng trong nghiên cứu lâm sàng Giai Đoạn Một (NCT01258387) trong đó các đối tượng tiếp nhận giả dược hoặc việc dùng đơn liều cimaglermin (NRG-1β3 tái tổ hợp chiều dài đầy đủ), buồn nôn và tiêu chảy là các vấn đề có hại phổ biến thứ hai và thứ tư phát sinh sau khi điều trị, xảy ra lần lượt ở 40% và 27% của các đoàn hệ liều cao gộp lại (Lenihan et al. J Am Coll Cardiol Basic Trans Science. 2016;1(7):576-86). Tương tự, trong nghiên cứu Giai Đoạn Hai của mảnh peptit NRG-1 tái tổ hợp (neucardin), buồn nôn là vấn đề có hại phổ biến nhất liên quan đến việc điều trị được quan sát thấy, thấy ở 20% đối tượng nghiên cứu (Jabbour et al. European Journal of Heart Failure (2011) 13: 83–92). Cuối cùng, trong nghiên cứu Giai Đoạn Hai thứ hai của neucardin (ChiCTR-TRC-00000414), kết quả đã công bố cho thấy 48,4% vấn đề có hại được quan sát thấy là ở dạ dày-ruột trong tự nhiên, kiểu thường thấy nhất của các sự kiện có hại trong nghiên cứu này, và tương quan với mức liều lượng (Gao et al. J Am Coll Cardiol 2010; 55:1907–14).

Hai nghiên cứu để đánh giá độ an toàn và khả năng dung chịu của protein dung hợp tái tổ hợp ở khỉ cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) được thực hiện: nghiên cứu không GLP (thực hành phòng thí nghiệm tốt) đơn liều và nghiên cứu GLP liều nhắc lại. Sự gây độc dạ dày-ruột được theo dõi chặt chẽ. Trong nghiên cứu đơn liều, độ an toàn và khả năng dung chịu của protein dung hợp tái tổ hợp được đánh giá ở các mức liều lượng 10, 30, và 60 mg/kg so với đối chứng tá được lỏng, với một con đực và một con cái được bao gồm trong mỗi đoàn hệ. Trong nghiên cứu đơn liều này không có tác dụng liên quan đến chất thử nghiệm trên khối lượng cơ thể hoặc đánh giá định tính thực phẩm trong suốt giai đoạn đánh giá sau điều trị trong hai tuần, và không quan sát sự nôn hoặc tiêu chảy. Trong nghiên cứu GLP liều nhắc lại, độ an toàn và khả năng dung chịu của protein dung hợp tái tổ hợp được đánh giá sau bốn lần dùng hàng tuần liên tiếp ở các mức liều lượng 3, 10, và 30 mg/kg so với đối chứng tá được lỏng, với ba con đực và ba con cái được bao gồm trong mỗi đoàn hệ đối với giai đoạn nghiên cứu 28 ngày chính, và hai con đực và hai con cái nữa trong các đoàn hệ 30 mg/kg và đối chứng tá được lỏng được đánh giá sau giai đoạn hồi phục 28 ngày tiếp theo. Không có tác dụng liên quan đến chất thử nghiệm trên sự tiêu thụ thức ăn được quan sát thấy trong nghiên cứu liều nhắc lại này. Mặc dù có sự nôn liên quan đến chất thử nghiệm được quan sát thấy trong nghiên cứu liều nhắc lại này, các quan sát lâm sàng của sự nôn chỉ liên quan đến phản ứng truyền, chỉ được quan sát thấy ở một con vật trong đoàn hệ 10 mg/kg (17%) và hai con vật trong đoàn hệ 30 mg/kg (20%), và có bản chất nhất thời. Tiêu chảy được quan sát thấy chỉ ở trong đoàn hệ đối chứng tá được lỏng và đoàn hệ protein dung hợp tái tổ hợp 30 mg/kg, lần lượt ở chỉ một (10%) và ba (30%) con vật, và được coi là bình thường đối với loại quy trình này và không liên quan đến protein dung hợp tái tổ hợp. Cuối cùng, trong nghiên cứu liều nhắc lại này, khối lượng cơ thể trung bình được giảm đi >10% tương quan với đường cơ sở chỉ ở các mức liều lượng 10 mg/kg và 30 mg/kg, và chỉ sau liều thứ tư ở đoàn hệ 10 mg/kg và liều thứ ba và thứ tư ở đoàn hệ 30 mg/kg. Tóm lại, việc điều trị bằng protein dung hợp tái tổ hợp không dẫn đến bất kỳ phát hiện đáng kể nào về mặt lâm sàng có liên quan đến sự hấp thụ thức ăn, nôn, hoặc tiêu chảy ngoài các phản ứng truyền cấp tính, và phát hiện dạ dày-ruột không ảnh hưởng đến sự xác định của việc không có tác dụng có hại trong một trong hai nghiên cứu. Các kết quả này chỉ ra rằng thiết kế của protein dung hợp tái tổ hợp làm giảm bớt tác dụng có hại của protein tái tổ hợp NRG-1 lên đường dạ dày-ruột.

Các mẫu máu (~1 ml) được thu lấy từ khỉ cynomolgus sau khi dùng đơn liều 60 mg/kg của protein dung hợp tái tổ hợp ở các thời điểm khác nhau, và huyết thanh được chiết và được

lưu trữ ở nhiệt độ -80°C cho đến khi thử nghiệm. Nồng độ của protein dung hợp tái tổ hợp trong mẫu huyết thanh được thử nghiệm bằng ELISA bắt giữ theo các quy trình tiêu chuẩn. Một cách vắn tắt, đĩa 96 giếng được phủ bằng protein HER3 người tái tổ hợp (R&D System), được phong bế bằng BSA, và được ủ với các mẫu thử nghiệm. Sau nhiều lần rửa, các đĩa được ủ với kháng thể kháng- Fc IgG người đã liên hợp HRP và sau đó được phát hiện bằng cơ chất TMB. Fig. 12 cho thấy rằng biên dạng được động học của protein dung hợp tái tổ hợp tương tự với kháng thể IgG.

Ví dụ 10: Tóm tắt về hằng số động học trên sự liên kết thụ thể Fc

Ái lực liên kết giữa protein dung hợp mAb kháng-HER3/NRG-1 tái tổ hợp và thụ thể Fc được đo bằng cách sử dụng kỹ thuật SPR không có nhãn. Tổng cộng sáu thụ thể Fc (mỗi thụ thể này được dung hợp với đuôi His), bao gồm Fc γ RI (Abcam), Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa (158F), Fc γ RIIIa (158V), và C1q (Sino Biological), lần lượt được phân tích chống lại protein dung hợp tái tổ hợp, protein dung hợp tái tổ hợp không có các đột biến Fc và kháng thể kháng-HER3. Tất cả các thụ thể Fc và các mẫu thử nghiệm được tinh chế bằng sắc ký ái lực. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện trên hệ thống Biacore 8K (GE Healthcare), với HBS-EP+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA và 0,05% thể tích/thể tích Chất hoạt động bề mặt P20) làm chất đệm chạy. Cụ thể là, kháng thể kháng-His được ghép nối trong cả tế bào dòng chảy hoạt tính và tham chiếu của chip cảm biến CM5 bằng phương pháp ghép nối amin. Thụ thể Fc đã gắn đuôi His đã được tinh chế được bắt giữ trên tế bào dòng chảy hoạt tính của mỗi kênh riêng lẻ thông qua sự liên kết với kháng thể kháng-His đã được cố định. Mức bắt giữ đối với mỗi thụ thể Fc được duy trì giữa 80-120RU. Để phân tích động học, protein dung hợp tái tổ hợp và tất cả các mẫu khác được pha loãng theo dãy đến tổng cộng 6 nồng độ, nằm trong khoảng từ 0,3 nM đến 30 nM, và các dịch pha loãng theo dãy được phun theo trình tự qua cả hai tế bào dòng chảy trong mỗi kênh. Nhiều phân tích được hoàn thành trong cùng một lần chạy bằng cách phun đồng thời các mẫu lên nhiều kênh.

Các biểu đồ cảm biến thu được được làm khớp với mô hình liên kết hai trạng thái để rút ra hằng số động học bằng cách sử dụng Phần Mềm Đánh Giá Biacore 8K. Tốc độ phân ly cân bằng (KD) của tất cả các phân tích được tóm tắt trong Bảng 1 dưới đây. Giá trị KD thu được từ động học của protein dung hợp tái tổ hợp liên kết với Fc γ RI, Fc γ RIIa và Fc γ RIIb, cao hơn 10 lần so với giá trị này của protein dung hợp tái tổ hợp không có các đột biến Fc và kháng thể kháng-HER3, chỉ ra ái lực thấp hơn nhiều mà là hậu quả của các đột biến xác định ở trong vùng Fc của protein dung hợp tái tổ hợp. Với Fc γ RIIIa (158F) và Fc γ RIIIa (158V),

lần lượt, các đột biến Fc dẫn đến sự giảm từ 2 đến 3 lần của ái lực liên kết đối với protein dung hợp tái tổ hợp. Sự liên kết với C1q quá yếu để có thể phát hiện được đối với tất cả các mẫu.

Để xác nhận rằng protein dung hợp tái tổ hợp làm hạn chế chức năng tác động Fc, sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) được đánh giá bằng cách sử dụng Thử Nghiệm Sinh Học Chất Báo Cáo ADCC từ Promega (Madison, WI). Thử nghiệm này sử dụng dòng tế bào Jurkat được thiết kế làm tế bào tác động, mà biểu hiện ổn định thụ thể FcγRIIIa (V158) và thành phần đáp ứng NFAT mà gây ra sự biểu hiện của luxiferaza đom đóm. Rituximab, làm đối chứng dương cho thử nghiệm này, thể hiện hoạt tính ADCC mạnh chống lại tế bào Raji CD20-dương; trong khi protein dung hợp tái tổ hợp không có ADCC có thể phát hiện được chống lại tế bào đích HER3-dương (MCF7 hoặc BT474) (dữ liệu không được thể hiện).

Bảng 1: Tóm tắt về hằng số động học trên sự liên kết thụ thể Fc

Thụ thể Fc	KD (M)		
	mAb kháng-HER3/NRG-1	mAb kháng-HER3/NRG-1 (không có các đột biến Fc)	mAb kháng-HER3
FcγRI	1,03E-08	2,81E-09	4,56E-09
FcγRIIa	1,35E-06	3,95E-07	1,50E-07
FcγRIIb	1,52E-06	1,03E-07	1,04E-08
FcγRIIIa (158F)	1,18E-07	6,37E-08	1,66E-07
FcγRIIIa (158V)	9,10E-08	3,41E-08	3,80E-08
C1q	< LOD*	< LOD*	< LOD*

* < LOD – Dưới giới hạn phát hiện (LOD) do sự liên kết yếu

Tham khảo chéo đến các đơn liên quan

Đơn này hưởng quyền ưu tiên, và quyền lợi của, đơn đăng ký sáng chế tạm thời Mỹ số 62/656,246, nộp ngày 11 tháng 4 năm 2018, toàn bộ nội dung của nó được kết hợp ở đây nhằm mục đích tham khảo.

Kết hợp danh mục trình tự để tham khảo

Đơn này chứa Danh Mục Trình Tự mà được nộp theo định dạng ASCII thông qua EFS-Web và được kết hợp trong bản mô tả này chỉ để tham khảo. Bản sao ASCII này, được tạo ra vào ngày 16 tháng 3 năm 2019, có tên là SBTI-001-001WO_SeqList.txt và nặng 31.328 byte.

Yêu cầu bảo hộ

1. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu.
2. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó mảnh NRG-1 có chứa mảnh hoạt tính.
3. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm 2, trong đó mảnh protein hoạt tính của NRG-1 có chứa miền hoạt tính của NRG-1.
4. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó mảnh NRG-1 có chứa miền liên kết ERBB3/4.
5. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó mảnh NRG-1 liên kết với và gây cảm ứng sự truyền tín hiệu qua ErbB4 (HER4).
6. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm 5, trong đó mAb ức chế sự truyền tín hiệu NRG-1 qua ErbB3 (HER3).
7. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó mảnh NRG-1 có chứa đồng phân NRG-1 β 2a.
8. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó mảnh NRG-1 được dung hợp thông qua axit amin ở đầu tận cùng N của nó với đầu tận cùng C của chuỗi nặng kháng thể bằng cách sử dụng cầu nối.
9. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm 8, trong đó cầu nối có chứa ít nhất là một bản sao của cầu nối Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser nêu trong SEQ ID NO: 5.
10. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm 8, trong đó đầu tận cùng C của chuỗi nặng kháng thể có chứa miền Fc của kháng thể.

11. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó kháng thể đơn dòng được glycosyl hóa.
12. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm 11, trong đó sự glycosyl hóa là sự N-glycosyl hóa.
13. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm 11, trong đó sự glycosyl hóa là sự O-glycosyl hóa.
14. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó mảnh NRG-1 có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4.
15. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó mAb có chứa chuỗi nặng được thể hiện bởi trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.
16. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó mAb có chứa chuỗi nhẹ được thể hiện bởi trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3.
17. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm 15, trong đó mAb trưởng thành có chứa đột biến thể ở ít nhất là một trong các axit amin 234, 239 và 434 nêu trong SEQ ID NO: 2.
18. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm 17, trong đó ít nhất là một đột biến thể có chứa đột biến L234F, đột biến S239A, đột biến N434A, hoặc dạng kết hợp của chúng.
19. Protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó protein dung hợp tái tổ hợp có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 14.
20. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu, trong đó protein

dung hợp tái tổ hợp này làm giảm đi sự tăng sinh của tế bào khối u hoặc ung thư tương quan với NRG-1 tái tổ hợp.

21. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu, trong đó protein dung hợp tái tổ hợp này thúc đẩy sự tăng sinh, sự biệt hóa, và sự sống sót của tế bào cơ tim.

22. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu, trong đó protein dung hợp tái tổ hợp này thúc đẩy sự tăng sinh, sự biệt hóa, và sự sống sót của mô tim.

23. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu, trong đó protein dung hợp tái tổ hợp này có khả năng giảm đi để gây cảm ứng sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

24. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu, trong đó protein dung hợp tái tổ hợp này thúc đẩy sự truyền tín hiệu HER2/4 hơn là sự truyền tín hiệu HER2/3 tương quan với khả năng gây cảm ứng tín hiệu của NRG-1 tái tổ hợp.

25. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp mã hóa cho protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24.

26. Vector tái tổ hợp có chứa phân tử axit nucleic theo điểm 25.

27. Tế bào tái tổ hợp có chứa vector tái tổ hợp theo điểm 26.

28. Dược phẩm có chứa protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24.

29. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch.

30. Dược phẩm chứa protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch.

31. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch, trong đó thuốc này:

(i) làm nhẹ bớt dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch ở đối tượng; hoặc

(ii) kìm hãm, ức chế, hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch ở đối tượng.

32. Dược phẩm chứa protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch, trong đó thuốc này:

(i) làm nhẹ bớt dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch ở đối tượng; hoặc

(ii) kìm hãm, ức chế, hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch ở đối tượng.

33. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch, trong đó bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch là suy tim mãn tính / suy tim sung huyết (CHF), suy tim cấp tính / nhồi máu cơ tim (MI), loạn chức năng tâm thu tâm thất trái, tổn thương tái tưới máu kết hợp với MI, sự gây độc tim do hóa trị liệu gây ra (người lớn hoặc trẻ em), sự gây độc tim do xạ trị gây ra, phụ thêm vào sự can thiệp phẫu thuật ở bệnh tim bẩm sinh ở trẻ em, hoặc sự gây độc tim là hậu quả của việc đối tượng tiếp nhận trị liệu ung thư.

34. Dược phẩm chứa protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch, trong đó bệnh hoặc tình trạng bệnh tim mạch là suy tim mãn tính / suy tim sung huyết (CHF), suy tim cấp tính / nhồi máu cơ tim (MI), loạn chức năng tâm thu tâm thất trái, tổn thương tái tưới máu kết hợp với MI, sự gây độc tim do hóa trị liệu gây ra (người lớn hoặc trẻ em), sự gây độc tim do xạ trị gây ra, phụ thêm vào sự can thiệp phẫu thuật ở bệnh tim bẩm sinh ở trẻ em, hoặc sự gây độc tim là hậu quả của việc đối tượng tiếp nhận trị liệu ung thư.

35. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho sự gây độc tim, trong đó sự gây độc tim là hậu quả của việc đối tượng tiếp nhận hóa trị liệu, trong đó hóa trị liệu được tiếp nhận là anthracyclin, tác nhân alkyl hóa, tác nhân chống vi ống, hoặc tác nhân chống chuyển hóa.

36. Dược phẩm có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho sự gây độc tim, trong đó sự gây độc tim là hậu quả của việc đối tượng tiếp nhận hóa trị liệu, trong đó hóa trị liệu được tiếp nhận là anthracyclin, tác nhân alkyl hóa, tác nhân chống vi ống, hoặc tác nhân chống chuyển hóa.

37. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho sự gây độc tim, trong đó sự gây độc tim là hậu quả của việc đối tượng tiếp nhận trị liệu ung thư, trong đó trị liệu ung thư được tiếp nhận là trị liệu nhắm đích HER-2.

38. Dược phẩm có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho sự gây độc tim, trong đó sự gây độc tim là hậu quả của việc đối tượng tiếp nhận trị liệu ung thư, trong đó trị liệu ung thư được tiếp nhận là trị liệu nhắm đích HER-2.

39. Protein dung hợp tái tổ hợp có chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho sự gây độc tim, trong đó:

(a) sự gây độc tim là hậu quả của việc đối tượng tiếp nhận trị liệu nhắm đích HER-2; và

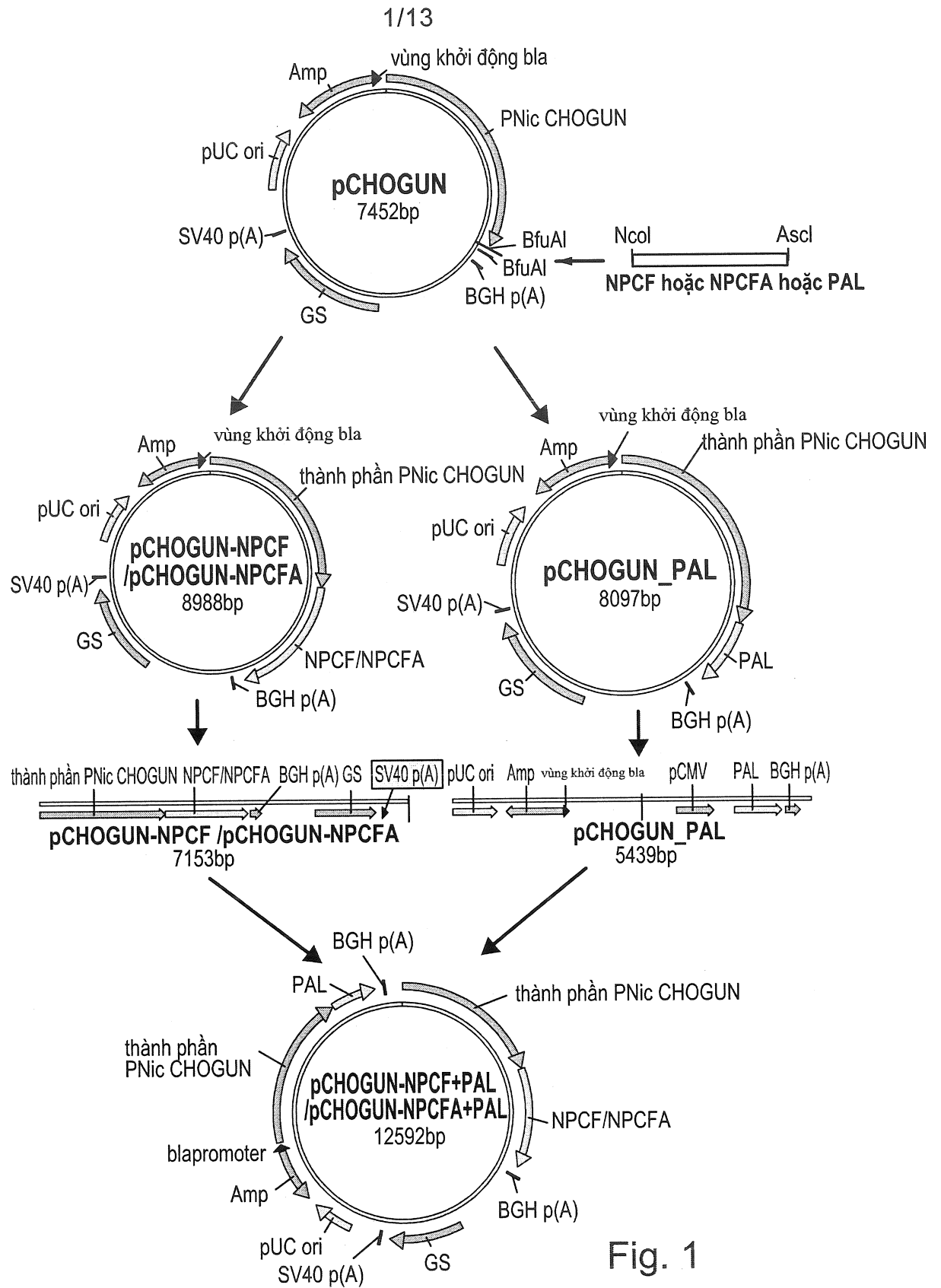
(b) trị liệu nhắm đích HER-2 có chứa việc sử dụng trastuzumab, ado-trastuzumab, emtansin, lapatinib, neratinib, pertuzumab, kháng thể kháng-HER2 bất kỳ, tác nhân kháng-HER2 bất kỳ hoặc dạng kết hợp của chúng.

40. Dược phẩm chứa mảnh của protein bảo vệ tim neuregulin-1 (NRG-1) dung hợp với kháng thể đơn dòng (mAb) ErbB3 (HER3) đơn đặc hiệu để sử dụng làm thuốc cho sự gây độc tim, trong đó:

(a) sự gây độc tim là hậu quả của việc đối tượng tiếp nhận trị liệu nhắm đích HER-2; và

(b) trị liệu nhắm đích HER-2 có chứa việc sử dụng trastuzumab, ado-trastuzumab, emtansin, lapatinib, neratinib, pertuzumab, kháng thể kháng-HER2 bất kỳ, tác nhân kháng-HER2 bất kỳ hoặc dạng kết hợp của chúng.

41. Bộ kit, có chứa lượng hữu hiệu của protein dung hợp tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24 hoặc được phẩm theo điểm 28.



2/13

**Sơ đồ phân tử của protein
dung hợp mAb kháng-HER3/NRG-1**

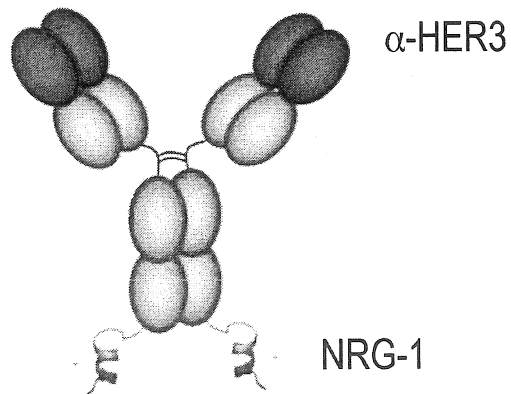


Fig. 2A

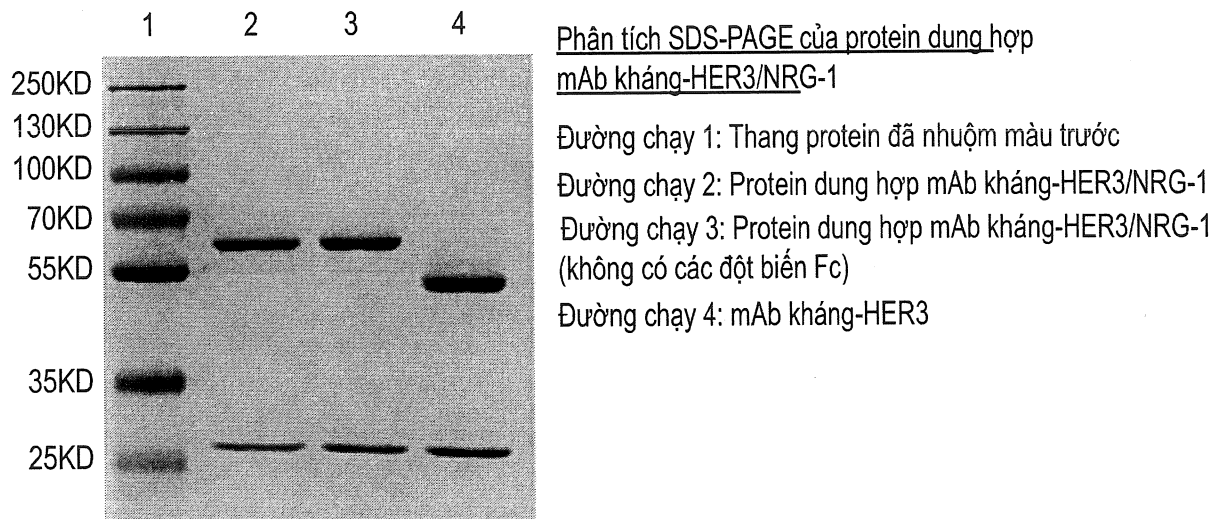


Fig. 2B

3/13

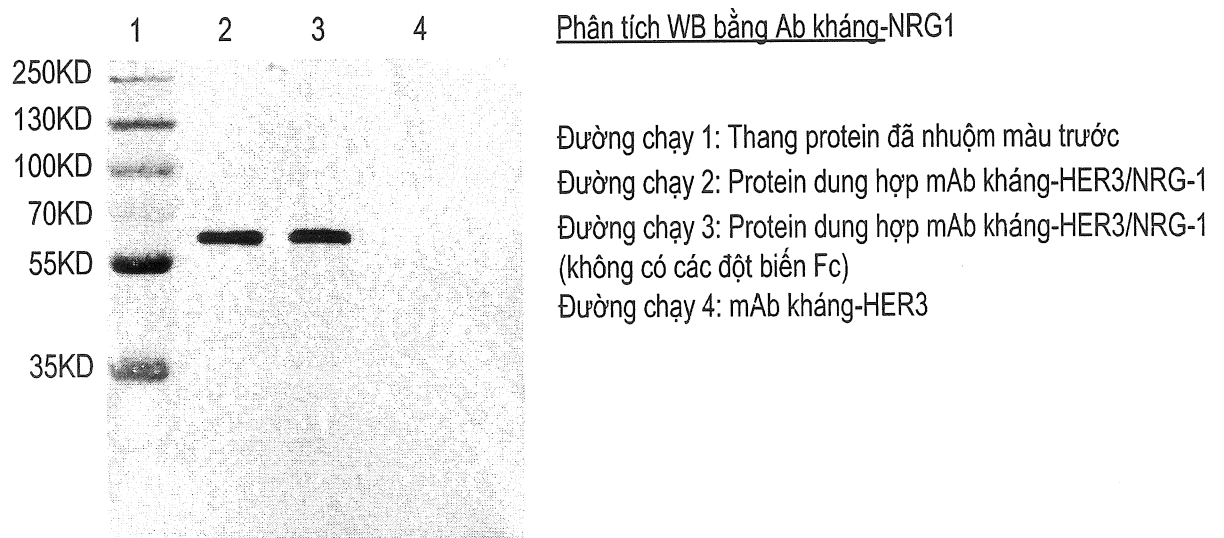


Fig. 2C

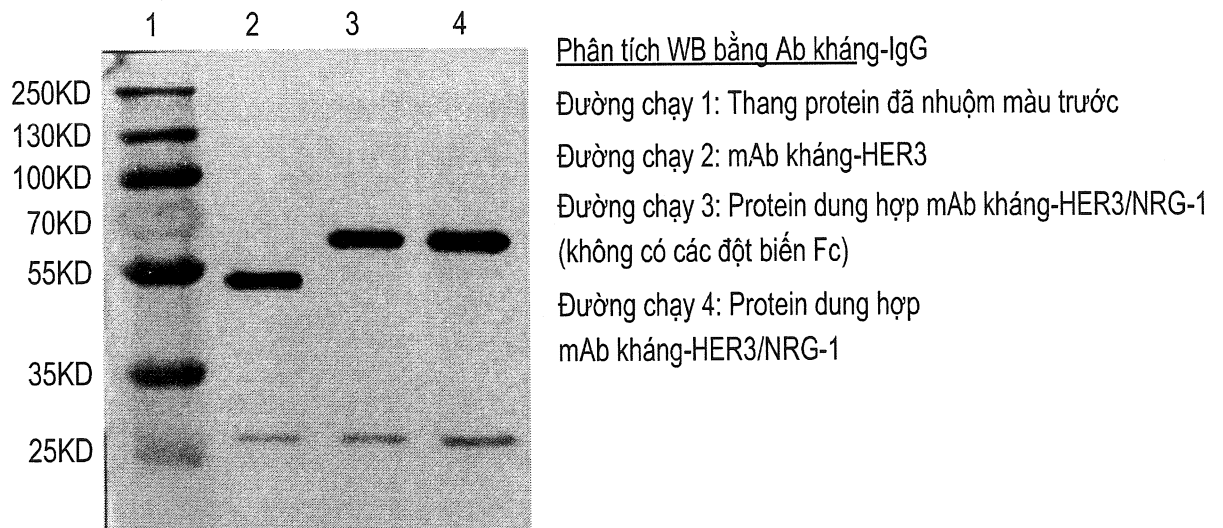
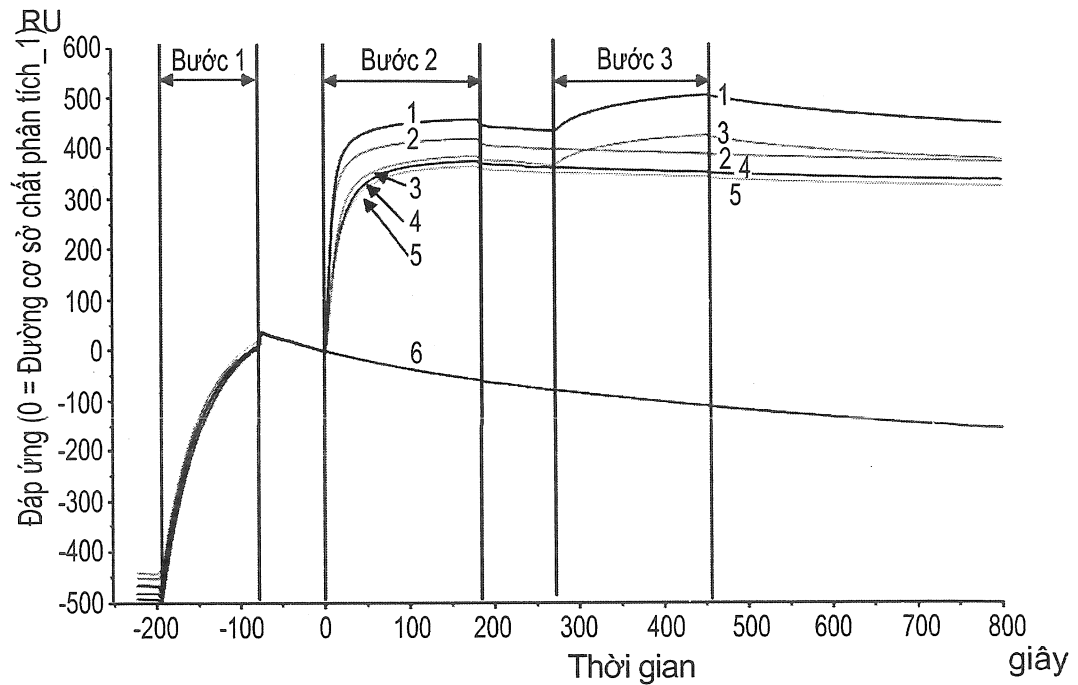


Fig. 2D

4/13

Biểu đồ cảm biến liên kết



Mô tả mẫu

Đường cong	Mẫu		
	Bước 1	Bước 2	Bước 3
1	HER3	Thể dung hợp mAb kháng-HER3/NRG-1	mAb kháng-NRG1
2	HER3	Thể dung hợp mAb kháng-HER3/NRG-1	Chất đệm
3	HER3	Thể dung hợp mAb kháng-HER3/ NRG-1 (không có các đột biến Fc)	mAb kháng-NRG1
4	HER3	mAb kháng-HER3	mAb kháng-NRG1
5	HER3	mAb kháng-HER3	Chất đệm
6	HER3	Chất đệm	Chất đệm

Fig. 3

5/13

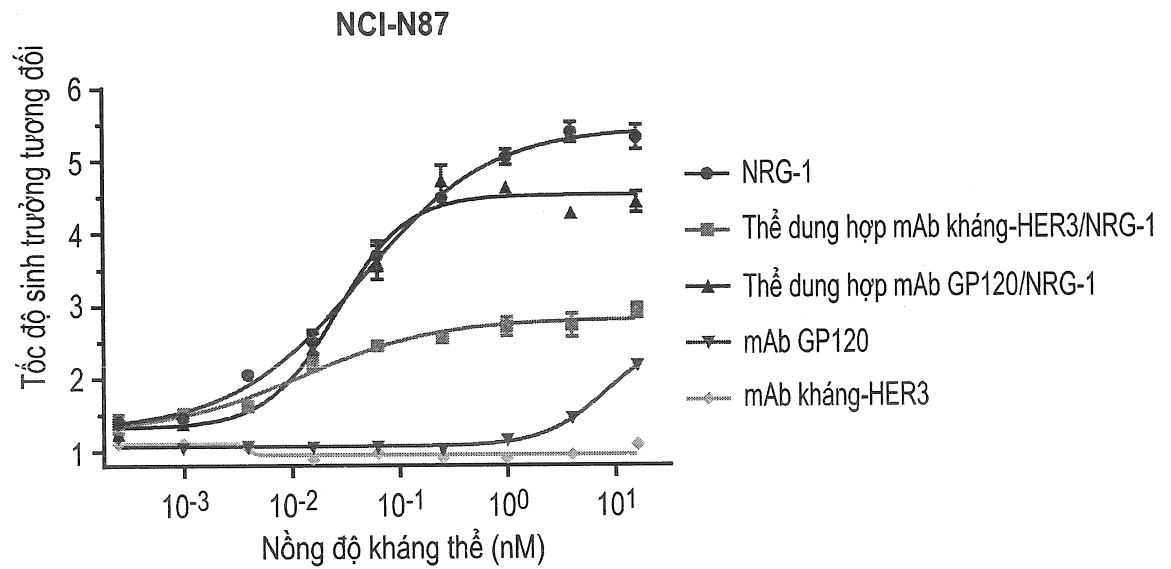


Fig. 4A

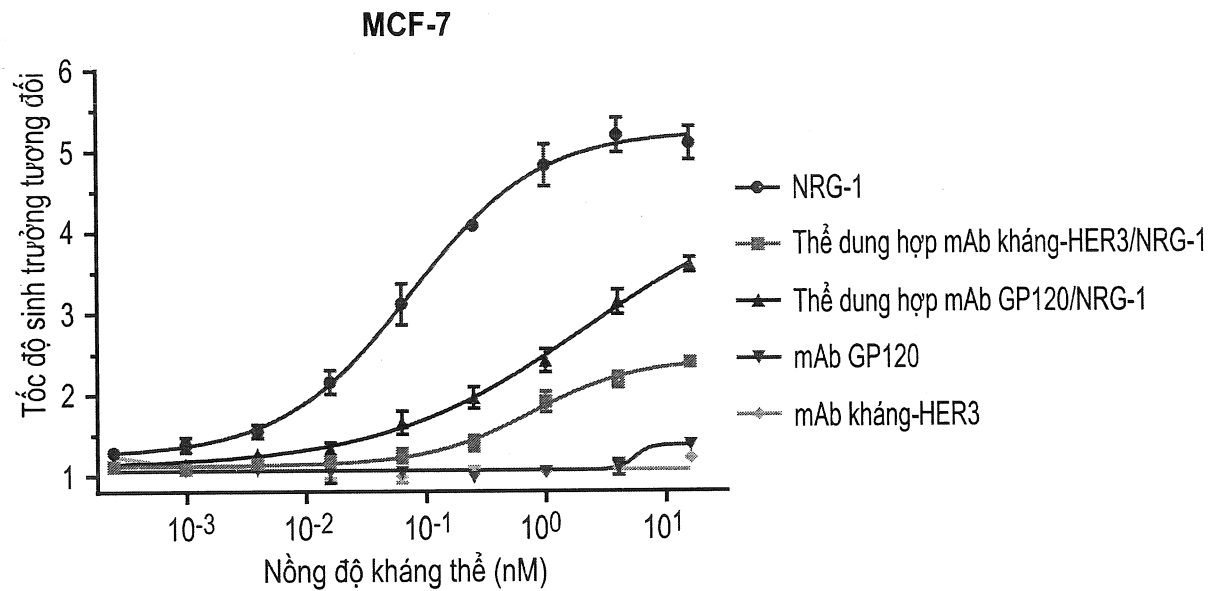


Fig. 4B

6/13

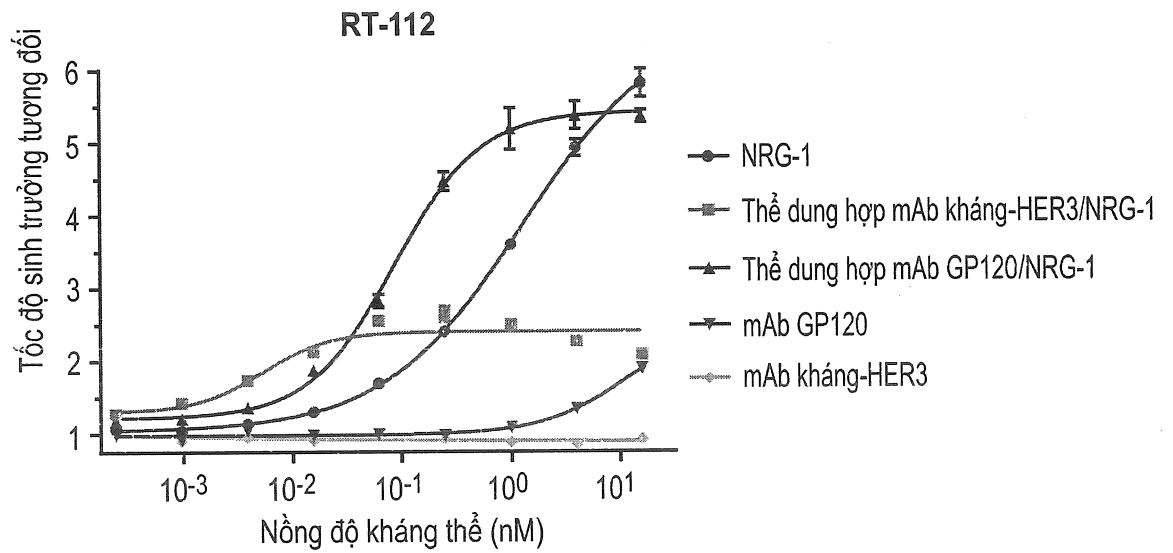


Fig. 4C

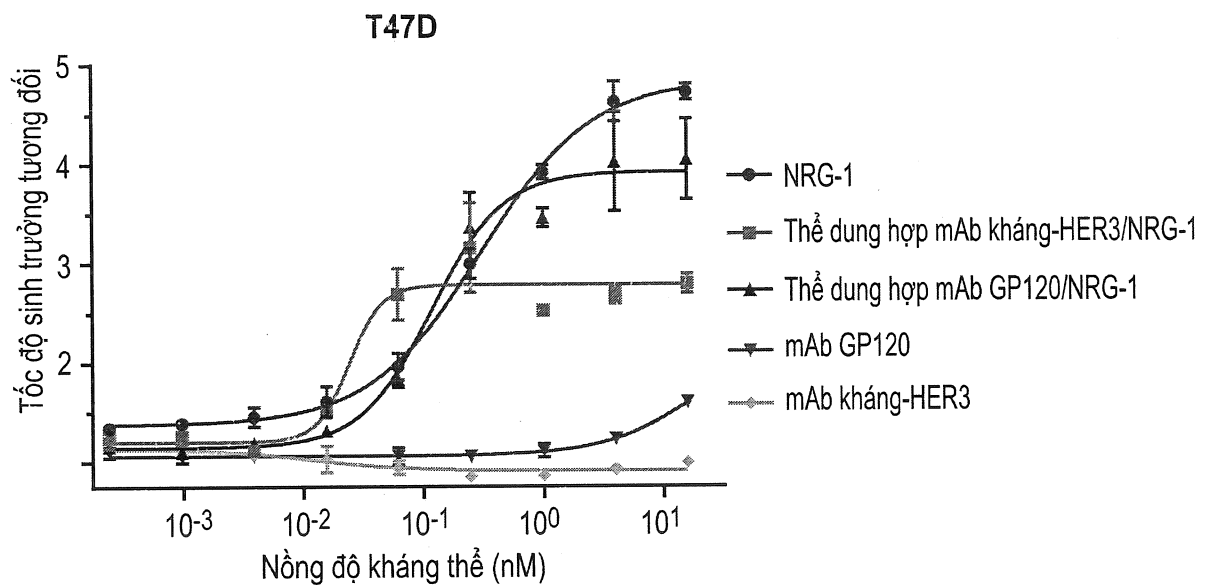


Fig. 4D

7/13

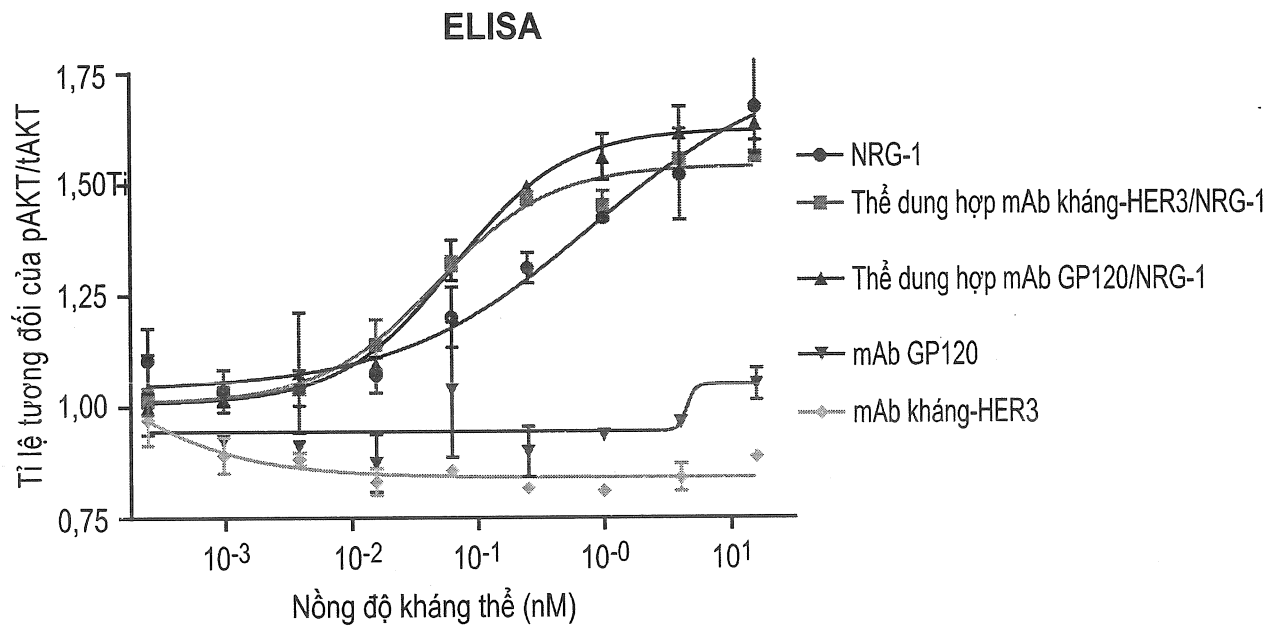


Fig. 5A

Phân tích WB của sự phosphoryl hóa AKT

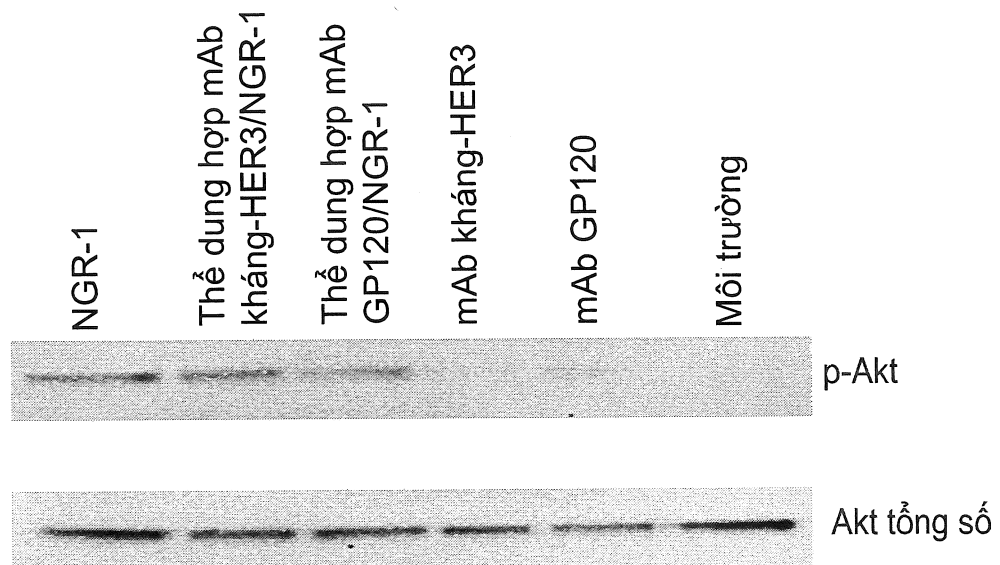


Fig. 5B

8/13

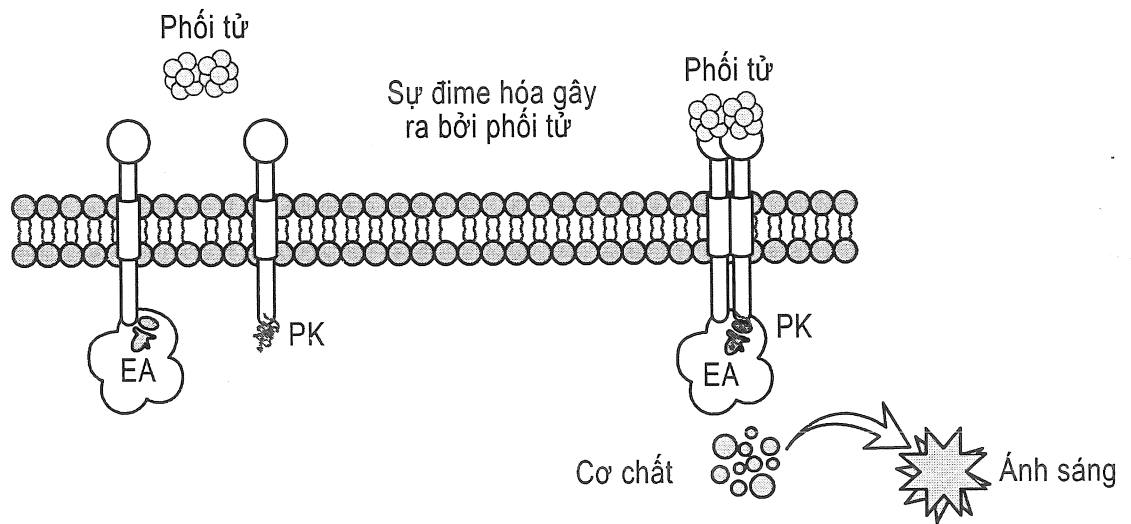


Fig. 6A

Sự dimer hóa HER2 : HER4

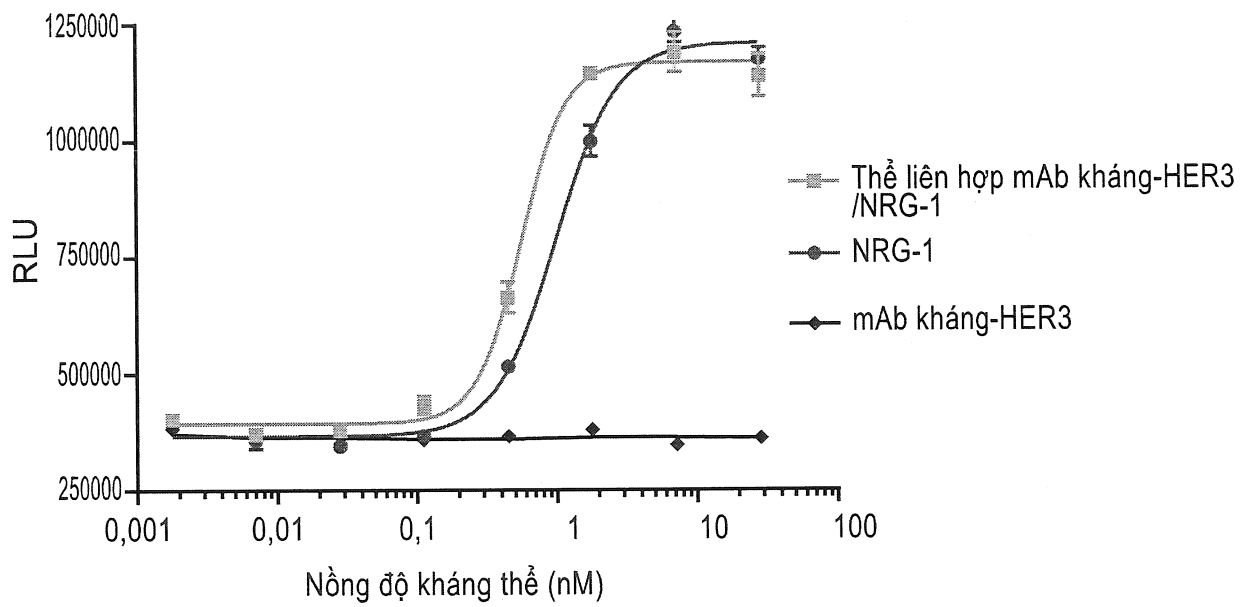


Fig. 6B

9/13

Sự đime hóa HER2 : HER3

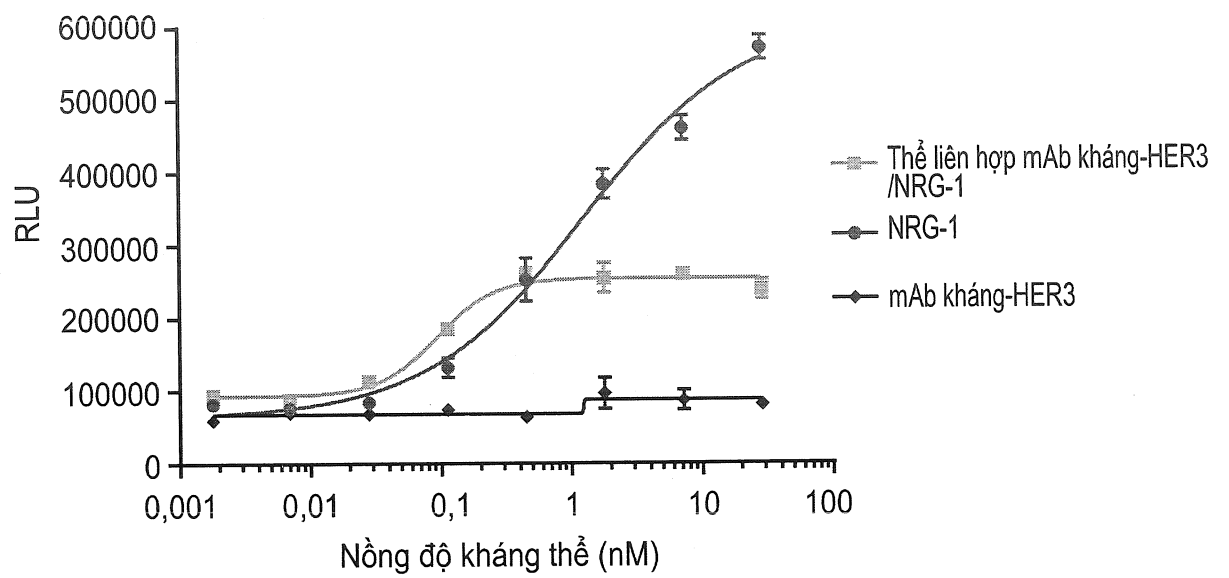


Fig. 6C

10/13

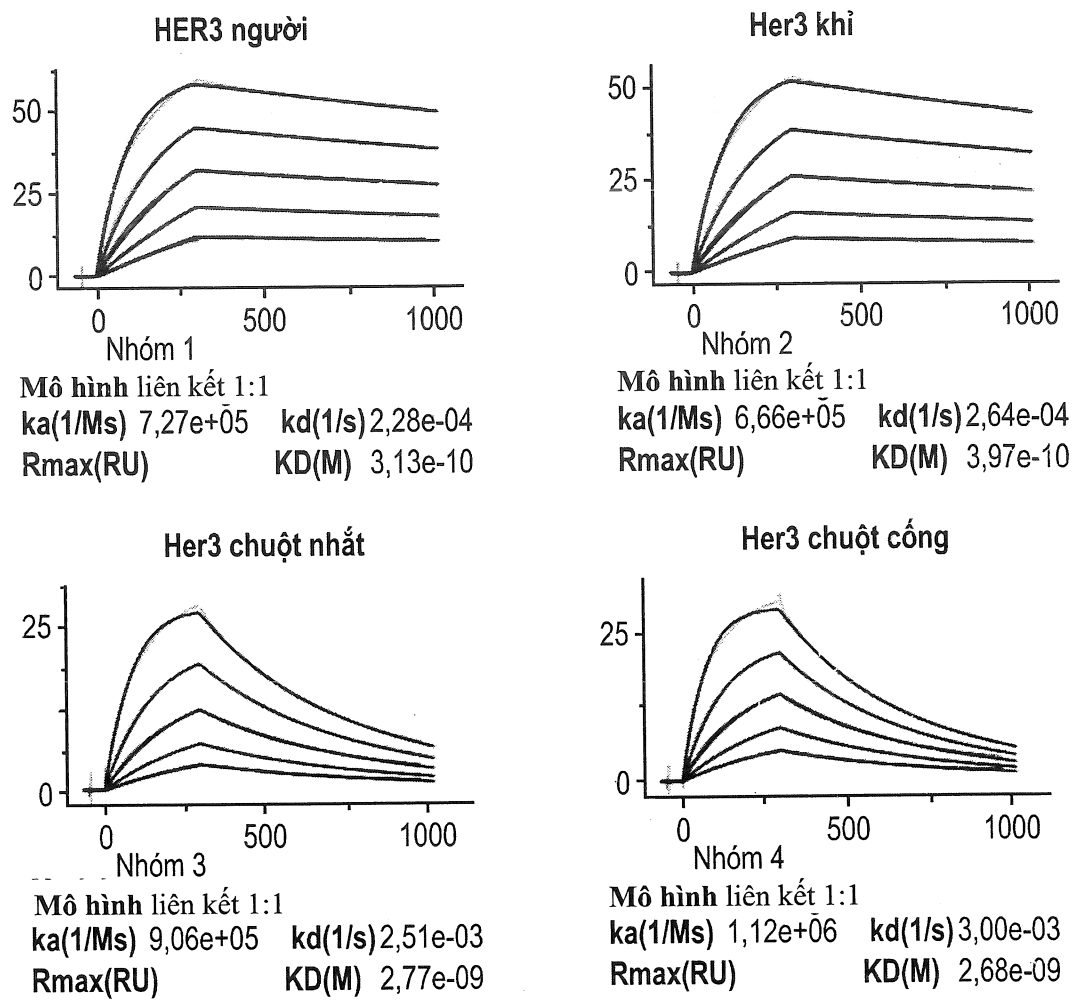


Fig. 7

11/13

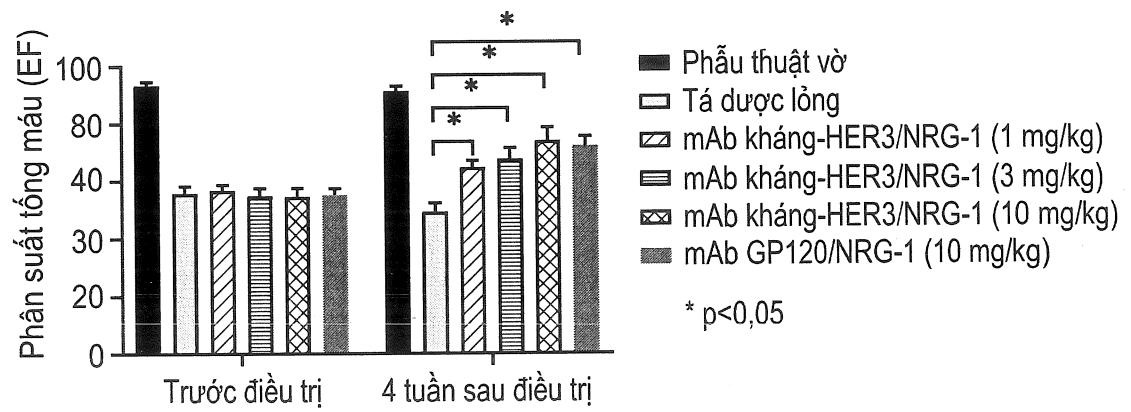


Fig. 8

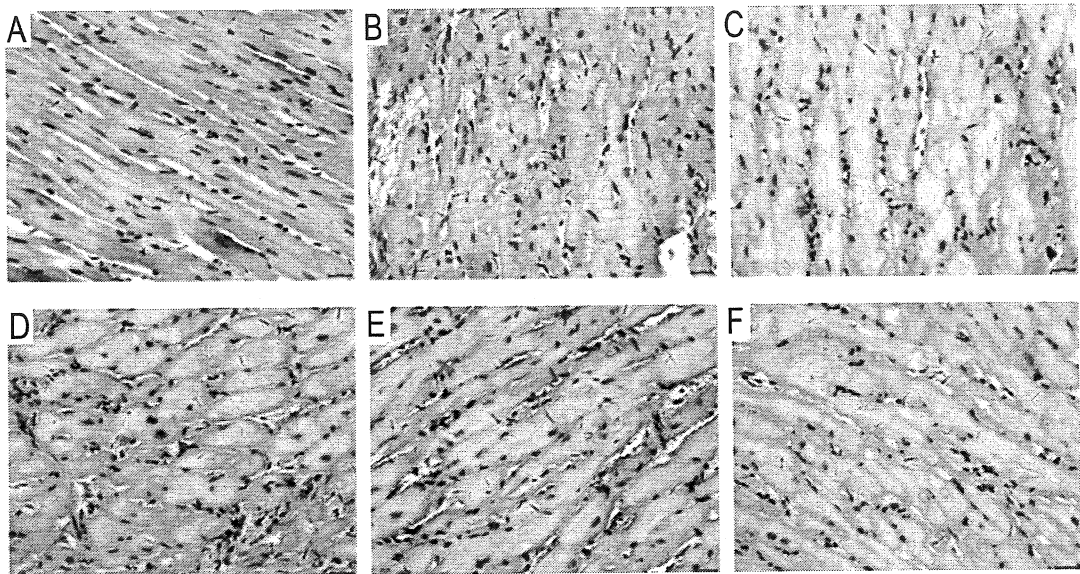


Fig. 9

12/13

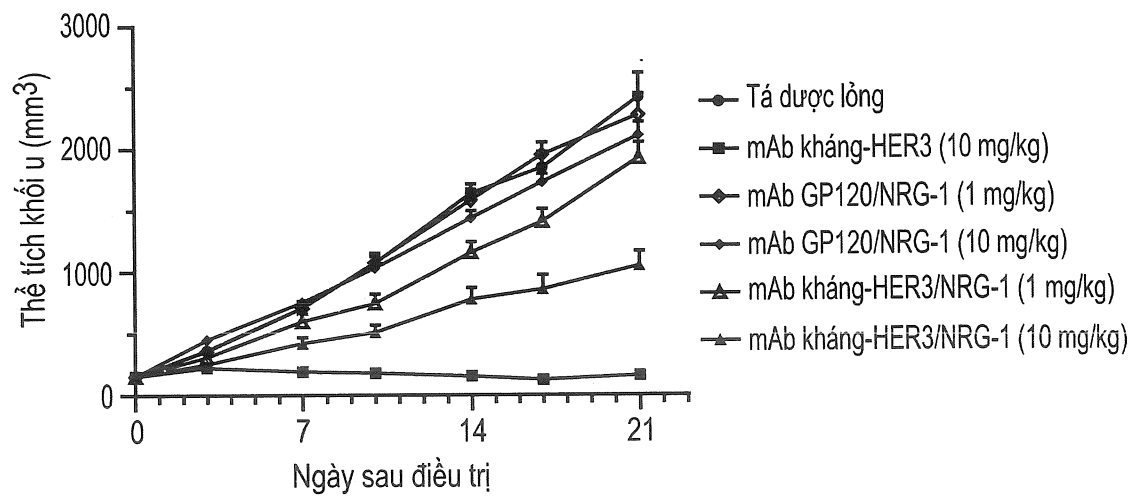


Fig. 10

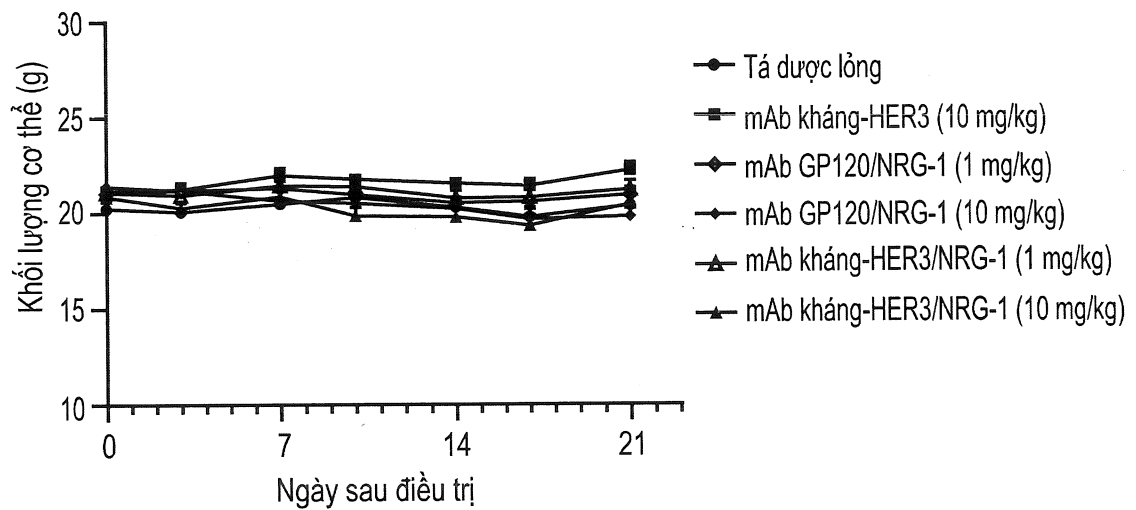


Fig. 11

13/13

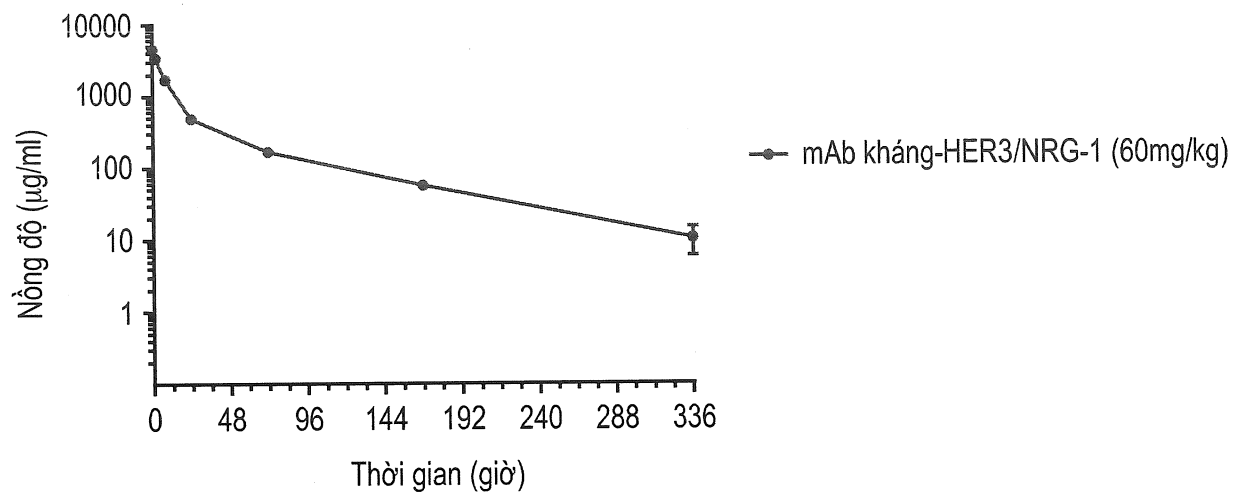


Fig. 12

<110> Salubris Biotherapeutics, Inc.
Salubris (Chengdu) Biotech Co., Ltd.

<120> PROTEIN DUNG HỢP TÁI TÔ HỢP, DƯỢC PHẨM VÀ BỘ KIT CÓ CHỨA PROTEIN
TÁI TÔ HỢP NÀY

<130> SBTI-001/001WO 332030-2002

<150> 62/656,246

<151> 11/04/2018

<160> 18

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 331

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
1 5 10 15

Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
20 25 30

Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr

35

40

45

Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu

50

55

60

Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile

65

70

75

80

Arg Glu Val Thr Gly Tyr Val Leu Val Ala Met Asn Glu Phe Ser Thr

85

90

95

Leu Pro Leu Pro Asn Leu Arg Val Val Arg Gly Thr Gln Val Tyr Asp

100

105

110

Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser

115

120

125

His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser

130

135

140

Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr

145

150

155

160

Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val
165 170 175

Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly
180 185 190

Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr
195 200 205

Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn
210 215 220

Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp
225 230 235 240

Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val
245 250 255

Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu
260 265 270

Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala

275

280

285

Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala
290 295 300

Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys
305 310 315 320

Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Phe
325 330

<210> 2

<211> 447

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50

55

60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65

70

75

80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115

120

125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130

135

140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145

150

155

160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

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

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ala Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290

295

300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305

310

315

320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325

330

335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

340

345

350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355

360

365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370

375

380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385

390

395

400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405

410

415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 3

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

Ser Ser Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Gln
35 40 45

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

<210> 4

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln

50

55

60

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Cầu nối Glyxin-Serin

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

<210> 6

<211> 1614

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctataa taaaaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgc agcagtgggg agctggactg ctgaagccaa gcgagaccct gtctctgaca 120

tgcgccgtgt acggaggatc cttcagcgga tactattggt cttggatcag gcagccacct 180

ggcaagggac tggagtggat cggcgagatc aaccactctg gctccaccaa ctacaatccc 240

tctctgaagt cccgggtgac catctccgtg gagacaagca agaatcagtt ttccctgaag	300
ctgtccagcg tgaccgccgc tgacacagcc gtgtactatt gcgctaggga caagtggacc	360
tggtatttcg atctgtgggg aaggggcacc ctggtgacag tgtcttccgc ctctacaaag	420
ggccctccg tgtttcctct ggctccaagc tctaagagca cctctggagg aacagcogct	480
ctgggatgtc tggatgaagga ttacttcctt gagccagtga ccgtgagctg gaactctggc	540
gccctgacct ccggagtgc tacatttccc gctgtgctgc agtccagcgg cctgtatagc	600
ctgtcttccg tggatgacct gcctagctct tcctgggca ccagacata catctgcaac	660
gtgaatcaca agccctcaa tacaaggtg gacaagagag tggagcctaa gagctgtgat	720
aagaccata catgcccacc atgtccagct cctgagctgc tgggaggacc ttccgtgttc	780
ctgtttcctc caaagccaaa ggacacctg atgatctctc gcacctga ggtgacatgc	840
gtggtggtgg acgtgtccca cgaggatcca gaggtgaagt tcaactggta cgtggatggc	900
gtggaggtgc ataatgctaa gaccaagcct agggaggagc agtacaacag cacctatcgg	960
gtggtgtctg tgctgacagt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	1020
aaggtgagca ataaggccct gccagctccc atcgagaaga ccatctctaa ggccaagggc	1080
cagcccagag agcctcaggt gtatacactg cccctagacc gcgaggagat gaccaagaac	1140
caggtgtctc tgacatgtct ggtgaagggc ttctacccat ctgacatcgc tgtggagtgg	1200

gagtccaatg gccagcccga gaacaattat aagaccacac caccctgtgt ggactccgat 1260
 ggcagcttct ttctgtactc caagctgacc gtggataaga gcagggtggca gcagggcaac 1320
 gtgttttctt gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaatc attatacaca gaaatctctg 1380
 tccctgagcc caggcaaggg aggaggagga agcggaggag gaggcagctc tcactctggtg 1440
 aagtgtgctg agaaggagaa gaccttctgc gtgaacggcg gcgagtgttt tatggtgaag 1500
 gacctgtcta atccatccag atacctgtgc aagtgtccca acgagttcac aggcgatcgc 1560
 tgccagaatt acgtgatggc ctctttttat aaggctgagg agctgtacca gtaa 1614

<210> 7

<211> 1614

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

atggagtttg ggctgagctg gggttttctt gttgctataa taaaagggtg ccagtgtcag 60
 gtgcagctgc agcagtgggg agctggactg ctgaagccaa gcgagaccct gtctctgaca 120
 tgcgccgtgt acggaggatc cttcagcgga tactattggt cttggatcag gcagccacct 180
 ggcaagggac tggagtggat cggcgagatc aaccactctg gctccaccaa ctacaatccc 240
 tctctgaagt cccgggtgac catctccgtg gagacaagca agaatacagtt ttccctgaag 300

ctgtccagcg tgaccgccgc tgacacagcc gtgtactatt gcgctaggga caagtggacc 360

tggtatttcg atctgtgggg aaggggcacc ctggtgacag tgtcttcgc ctctacaaag 420

ggcccctccg tgtttcctct ggctccaagc tctaagagca cctctggagg aacagccgct 480

ctgggatgtc tggatgaagga ttacttcct gagccagtga ccgtgagctg gaactctggc 540

gccctgacct ctggagtgc tacatttccc gctgtgctgc agtccagcgg cctgtatagc 600

ctgtcttcgc tggatgaccgt gctagctct tccctgggca ccagacata catctgcaac 660

gtgaatcaca agccctcaa tacaagggtg gacaagagag tggagcctaa gagctgtgat 720

aagaccata catgcccacc atgtccagct cctgagttcc tgggaggacc tgccgtgttc 780

ctgtttcctc caaagccaaa ggacaccctg atgatctctc gcaccctga ggtgacatgc 840

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggatcca gaggtgaagt tcaactggta cgtggatggc 900

gtggaggtgc ataatgctaa gaccaagcct agggaggagc agtacaacag cacctatcgg 960

gtggtgtctg tgctgacagt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020

aaggtgagca ataaggccct gccagctccc atcgagaaga ccatctctaa ggccaagggc 1080

cagcccagag agcctcaggt gtatacactg cccctagcc gcgaggagat gaccaagaac 1140

caggtgtctc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccat ctgacatcgc tgtggagtgg 1200

gagtcgaatg gccagcccga gaacaattat aagaccacac caccctgtgt ggactccgat 1260

ggcagcttct ttctgtactc caagctgacc gtggataaga gcaggtggca gcagggcaac 1320

gtgttttctt gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacgctc attatacaca gaaatctctg 1380

tccctgagcc caggcaaggg aggaggagga agcggaggag gaggcagctc tcatctggtg 1440

aagtgtgctg agaaggagaa gaccttctgc gtgaacggcg gcgagtgttt tatggtgaag 1500

gacctgtcta atccatccag atacctgtgc aagtgtccca acgagttcac aggcgatcgc 1560

tgccagaatt acgtgatggc ctctttttat aaggctgagg agctgtacca gtaa 1614

<210> 8

<211> 723

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

atggtgttgc agaccaggt cttcatttct ctgttgcctt ggatctctgg tgccctacggg 60

gacatcgaga tgaccagtc tccagattcc ctggccgtga gcctgggaga gagggctaca 120

atcaactgcc ggtccagcca gtctgtgctg tactcttcca gcaacaggaa ttacctggcc 180

tggtatcagc agaatcccgg ccagccccct aagctgctga tctattgggc tagcaccaga 240

gagtctggag tgccctgaccg cttctctgga tccggaagcg gcacagactt caccctgaca 300

atctcttccc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactatt gccagcagta ttactctacc 360
cctaggacat tcggccaggg caccaagggtg gagatcaagc ggacagtggc cgctccatcc 420
gtgttcatct ttccaccctc cgacgagcag ctgaagtccg gaaccgctag cgtggtgtgc 480
ctgctgaaca acttctaccc aagagaggcc aagggtgcagt ggaagggtgga taacgctctg 540
cagagcggca attctcagga gtccgtgacc gagcaggaca gcaaggattc tacatattcc 600
ctgagctcta ccctgacact gtccaaggcc gattacgaga agcacaaggt gtatgcttgc 660
gaggtgaccc atcagggcct gtccagcccc gtgacaaaga gttcaaccg cggcgagtgt 720
taa 723

<210> 9

<211> 537

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys

20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe

35

40

45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro

65

70

75

80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln

85

90

95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

100

105

110

Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg

115

120

125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

130

135

140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

145

150

155

160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser His Leu Val
465 470 475 480

Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys
485 490 495

Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys
500 505 510

Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser
515 520 525

Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln

530

535

<210> 10

<211> 537

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys

20

25

30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe

35

40

45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro

65

70

75

80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu Thr Ser Lys Asn Gln

85

90

95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr

100

105

110

Tyr Cys Ala Arg Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg

115

120

125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

130

135

140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

145

150

155

160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

165

170

175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

180

185

190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

195

200

205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
245 250 255

Pro Ala Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

24

Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser His Leu Val
465 470 475 480

Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys
485 490 495

Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys
500 505 510

Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser
515 520 525

Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
530 535

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 12

<211> 240

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Val Leu Tyr Ser Ser Ser Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Asn Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly
20

<210> 14

<211> 518

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Thành phần chuỗi nặng của protein dung hợp tái tổ hợp

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

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

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ala Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser His Leu Val Lys Cys Ala
450 455 460

Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val

465 470 475 480

Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu
485 490 495

Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys
500 505 510

Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
515

<210> 15

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

His Ala Arg Lys Cys Asn Glu Thr Ala Lys Ser Tyr Cys Val Asn Gly
1 5 10 15

Gly Val Cys Tyr Tyr Ile Glu Gly Ile Asn Gln Leu Ser Cys Lys Cys
20 25 30

Pro Asn Gly Phe Phe Gly Gln Arg Cys Leu

35

40

<210> 16

<211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

His Phe Lys Pro Cys Arg Asp Lys Asp Leu Ala Tyr Cys Leu Asn Asp
1 5 10 15

Gly Glu Cys Phe Val Ile Glu Thr Leu Thr Gly Ser His Lys His Cys
20 25 30

Arg Cys Lys Glu Gly Tyr Gln Gly Val Arg Cys Asp
35 40

<210> 17

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
1 5 10 15

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

Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu
35 40

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng miền giống EGF

<400> 18

Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Glu Cys Phe Met Val
1 5 10 15

Lys Asp Leu Ser Asn Pro
20