



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

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

(11)



1-0053999

(51)^{2020.01} C07K 16/40; C07K 16/24

(13) B

(21) 1-2020-05187

(22) 13/02/2019

(86) PCT/US2019/017877 13/02/2019

(87) WO2019/160976 22/08/2019

(30) 62/630,571 14/02/2018 US

(45) 25/11/2025 452

(43) 26/04/2021 397A

(73) Horizon Therapeutics Ireland DAC (IE)

Pottery Road, Dun Laoghaire Dublin, A96 F2A8 Ireland

(72) HANSEN, Anna (US); XIAO, Xiaodong (US); PAVLIK, Peter (US); CHEN, Yan (US); ETTINGER, Rachel (US).

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

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI FLT3L, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2020-05187

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với Feline McDonough Sarcoma (FMS)-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) ligand (FLT3L), chứa tập hợp các vùng xác định bổ sung (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.33, và SEQ ID NO.34; axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó; tế bào vật chủ được biến nạp với axit nucleic này; tế bào lai sản xuất kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó; và phương pháp sản xuất kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

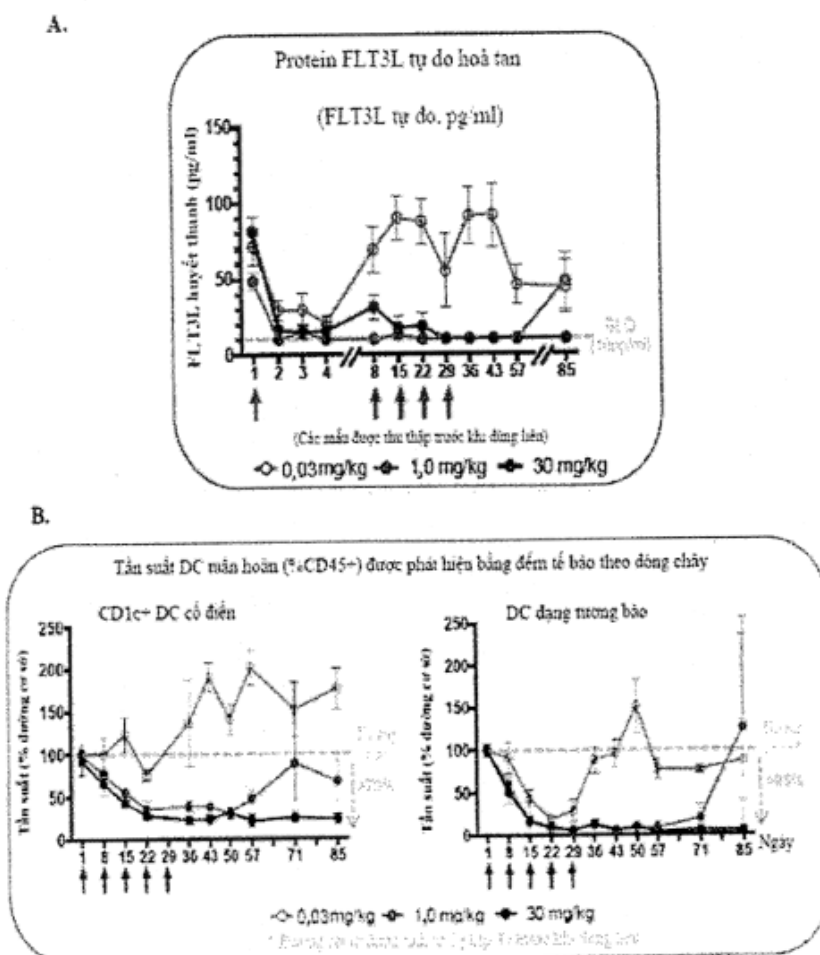


Fig.15

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L, được phẩm và phương pháp sản xuất kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các bệnh tự miễn, mà xảy ra khi hệ miễn dịch của cơ thể sản sinh các tự kháng thể, không may là phổ biến. Ví dụ, ước tính có trên 23 triệu người Mỹ bị ảnh hưởng bởi bệnh tự miễn. Hiện nay có hơn 80 loại bệnh tự miễn được ghi nhận. Các ví dụ cụ thể về các bệnh tự miễn bao gồm bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh viêm cơ, hội chứng Sjögren nguyên phát, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm màng bồ đào trước, bệnh vẩy nến, và bệnh viêm khớp dạng thấp.

Bệnh lupus ban đỏ hệ thống (SLE) được đặc trưng bởi các khớp bị đau, các hạch bạch huyết bị sưng và ban hình cánh bướm trên má. Ở SLE, các tự kháng thể chống lại các mô khỏe mạnh tấn công hệ miễn dịch của đối tượng bị bệnh dẫn đến chứng viêm. Ở mức độ tế bào, đối tượng bị bệnh SLE có các tế bào T và B tự phản ứng, có nguồn gốc từ các tế bào đuôi gai (Palucka A.K. *et al. Immunology and Cell Biology* (2002) 80: 484-488). Hội chứng Sjögren được đặc trưng bởi chứng viêm toàn thân mạn tính của các cơ quan ngoại tiết dẫn đến sự rối loạn chức năng của cơ quan (Holdgate N. and St. Clair E.W., *F1000 Research*. 1412 10.12688/f1000research.8352.1).

Bệnh đa xơ cứng (MS) được đặc trưng bởi sự mất myelin của các tế bào thần kinh ở bệnh viêm não và cột sống và hệ thần kinh trung ương (CNS). Bệnh vẩy nến là bệnh tự miễn mà thể hiện là các mảng da ngứa, màu đỏ. Bệnh viêm khớp dạng thấp (RA) là rối loạn viêm của mô hoạt dịch khớp được đặc trưng bởi chứng viêm màng hoạt dịch dai dẳng và sự phá hủy sụn và xương ở khớp. Tổn hại có thể tiến triển để ảnh hưởng đến nhiều hệ thống cơ thể. Bệnh viêm thận lupus, có liên quan đến bệnh lupus ban đỏ hệ thống và dẫn đến chứng viêm thận. Khi bị viêm, thận làm rò protein và cuối cùng có thể dẫn đến suy. Bệnh viêm màng bồ đào trước là nhóm các bệnh viêm mà tấn công, và có thể phá hủy mô mắt dẫn đến mất thị giác.

Ngoài ra, các trạng thái tiền viêm cấp và mạn tính đã có liên quan đến và có thể là nguyên nhân gây ra vô số bệnh ở đối tượng. Các ví dụ cụ thể về các bệnh được tin là có liên quan đến chứng viêm mạn tính bao gồm bệnh tiểu đường Typ 1 và Typ 2, bệnh thận mạn tính (CKD), bao gồm, ví dụ CKD gây ra bởi bệnh tiểu đường, bệnh thận do đái tháo đường, và bệnh huyết áp cao; chứng xơ vữa động mạch, bệnh Alzheimer, bệnh ung thư, và các biến chứng liên quan của các bệnh này, bao gồm bệnh tim, chứng tăng huyết áp, bệnh thiếu máu, bệnh viêm màng ngoài tim, chứng loạn dưỡng xương do thận, và các bệnh khác. Giống như các bệnh tự miễn, ở các bệnh liên quan đến chứng viêm mạn tính, cơ thể xuất hiện tăng phản ứng tiền viêm liên tục, quá mức mà có thể dẫn đến làm suy nhược và thường là hôn mê gây tử vong.

Nguyên nhân gây bệnh tự miễn là chưa được biết rõ. Về mặt cơ chế, tiềm ẩn tất cả bệnh tự miễn là sự đáp ứng tự miễn đang tiếp diễn mà được thúc đẩy (và/hoặc không bị ức chế) bởi hệ thống điều hòa phức tạp mà bổ sung liên tục các tế bào miễn dịch tự phản ứng. Cơ chế hoạt động tương tự xảy ra ở bệnh viêm mạn tính không phải tự miễn. Đối với lý do này, sự can thiệp trị liệu ở các bệnh tự miễn và đối với chứng viêm mạn tính đã hướng đích vô số hệ thống điều hòa, các thác truyền tín hiệu, và các thành phần cấu tạo của chúng.

Một lớp đích trị liệu giả định bao gồm các thụ thể tyrosin kinaza (TKR), mà các thụ thể xuyên màng mà liên kết các yếu tố sinh trưởng riêng biệt và các protein để điều hòa nội cân bằng tế bào. Hơn năm mươi loại TKR người đã biết được chia thành 20 lớp phân biệt được xác định bởi sự phát sinh loài về mặt di truyền của chúng (Robins D.R., *et al. Oncogene*. (2000) 19: 5548-5557; Lemmon M.A., và Schlessinger J. *Cell*. (2010) 141: 1117-1134). TKR lớp III được đặc trưng bởi sự có mặt của năm đến bảy miền giống globulin miễn dịch trong phần ngoại bào chứa từ 70 đến 100 gốc ưa nước. Bên trong các TKR lớp III, thụ thể tyrosin kinaza 3 tương tự ung thư tổ chức liên kết McDonough của mèo (FMS) (FLT3) là thụ thể liên kết màng được biểu hiện trên các tế bào gốc của người, các tiền chất tế bào tạo huyết, các tế bào đuôi gai, các tế bào T và B được hoạt hóa, các bạch cầu đơn nhân, và tiểu thần kinh đệm. FLT3 liên kết với phối tử FLT3 (FLT3L), xytokin tạo huyết được biểu hiện bởi nhiều loại tế bào bao gồm các tế bào T đã hoạt hóa, màng trong đã hoạt hóa, và các tế bào đệm tủy xương. FLT3L được biểu hiện dưới dạng cả bề mặt tế bào và homodime được tiết và các tín hiệu qua thụ thể cùng nguồn gốc của

nó, FLT3. FLT3 được biểu hiện trên bề mặt tế bào dưới dạng monome và được hoạt hóa dựa vào sự gắn kết với FLT3L. Dựa vào sự gắn kết FLT3L, FLT3 dime hóa, tự phosphoryl hóa, và hoạt hóa các con đường truyền tín hiệu bao gồm RAS/kinaza được điều hòa bởi tín hiệu ngoại bào (ERK), phosphatidylinositit 3-kinaza (PI3K) và yếu tố tải nạp tín hiệu và yếu tố hoạt hóa sự phiên mã (STAT) 3 và 5. Sau quá trình tự phosphoryl hóa, FLT3 được dime hóa được nội hóa và được thoái biến.

FLT3L được sản sinh trong sự đáp ứng với các tín hiệu viêm, cụ thể là các xytokin chuỗi γ : IL-2, IL-7 và IL-15, và sự tương tác của nó với FLT3 điều khiển quá trình viêm chủ yếu qua vai trò của nó trong quá trình biệt hóa, tăng sinh và sống sót của các DC. Cũng có vai trò giả định đối với sự truyền tín hiệu FLT3 ở sự sống sót tế bào T và B sau khi hoạt hóa, với cả hai loại tế bào được báo cáo là điều hòa tăng một cách tạm thời thụ thể (Astier AL *et al.*, *J. Immunology*. 2010 v184: 685-93 và Tobon *et al. Arthritis & Rheumatism*. 2010; 62(11): 3447-56). Ngoài ra, sự sống sót tế bào NK được cho rằng phụ thuộc gián tiếp vào FLT3L qua yêu cầu của nó đối với IL-15 thu được từ các DC, mặc dù sự quan sát này được dựa trên dữ liệu của chuột nhắt (Guimond M *et al.*, *J. Immunology* 2010; 184: 2769-75) và vẫn chưa được chứng minh ở người.

Các DC là được quan tâm đặc biệt ở chứng viêm vì chúng là lính gác của hệ miễn dịch, di trú từ vị trí viêm đến hạch bạch huyết và bắt đầu sự đáp ứng miễn dịch thích ứng mà cuối cùng được yêu cầu để sinh ra bệnh tự miễn. Rộng hơn là, có hai tập con của DC: Các tế bào đuôi gai tủy/cổ điển (cDC) và các tế bào đuôi gai dạng tương bào (pDC). Các cDC sản sinh ra các xytokin viêm thuật ngữ, IFN α -III, IL-23, IL-12, IL-6, và IL-1 β), trình diện kháng nguyên đối với các tế bào T trong bối cảnh đồng kích thích, và các chemokin bí mật mà huy động các tế bào đến vị trí viêm và đảm bảo chúng đồng định vị khi được yêu cầu đối với sự tương tác tế bào-tế bào quan trọng. Thông qua cơ chế này, các cDC kích thích các bạch cầu trung tính, các tế bào B, các tế bào T, và các tế bào NK dẫn đến quá trình hoạt hóa và giải phóng NET (NETosis), quá trình sản sinh tự kháng thể, sản sinh IL-17, và sản sinh xytokin viêm bổ sung. Các pDC là nguồn chủ yếu của IFN loại I, xytokin quan trọng trong sự đáp ứng bẩm sinh mà tăng cường sự hoạt hóa của tất cả các nhánh của hệ miễn dịch.

Tuyến nước bọt từ đối tượng bị bệnh mắc hội chứng Sjögren thể hiện sự biểu hiện FLT3 và FLT3L trên các tế bào B thâm nhiễm (Tobon *et al. Arthritis & Rheumatism*.

(2010) 62(11): 3447 - 3456). Ngoài ra, các đối tượng bị bệnh mắc hội chứng Sjögren thể hiện tần suất tăng của các tế bào B biểu hiện FLT3 trong hệ tuần hoàn và sự sống sót của chúng được tăng cường khi được đồng nuôi cấy với các tế bào nước bọt người biểu hiện FLT3L. Các đối tượng có MS biểu hiện protein FLT3 ở các thương tổn mạn tính và hoạt động cũng như các chất xám và chất trắng (DeBoy C.A. *et al. Exp Mol Pathol.* (2010); 89(2): 109-116). Hơn nữa, FLT3 được đồng định vị với các DC chưa trưởng thành ở não quanh mạch chỉ dẫn sự thâm nhiễm của các DC dương tính FLT3 vào trong não của đối tượng có MS (Deboy *et al.*). Ở RA, các mức FLT3L dịch hoạt dịch được tăng so với các đối tượng khỏe mạnh. Ngoài ra, các tế bào bạch cầu đơn nhân, các tế bào NK, và các DC từ đối tượng bị bệnh RA biểu hiện các mức FLT3L cao (Ramos M. *et al. Arthritis Res Ther.* (2013) 15(6): R209).

Hơn nữa, các mức FLT3L huyết thanh và vị trí viêm tăng đã được báo cáo đối với SLE, bệnh viêm cơ, hội chứng Sjögren nguyên phát, MS, bệnh viêm màng bồ đào trước, và RA (Andersson *et al. PLoS One* (2012) 7: e47668; DeBoy *et al. Exp và Mol Pathol* (2010) 89: 109-16).

Do đó, trong khi sự sống sót tiền viêm được trung gian bởi FLT3 thuật ngữ, qua các pDC và mDC) là đáp ứng sinh lý có lợi ở đối tượng khỏe mạnh, nó có khả năng có các tác động có hại ở các bệnh tự miễn. Do đó, sự phá hủy hoặc làm yếu con đường truyền tín hiệu FLT3/FLT3L có thể chứng tỏ là công cụ quan trọng để chống lại các bệnh tự miễn và các bệnh viêm khác cũng như để làm giảm chứng viêm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L mới để kiểm soát các bệnh tự miễn và các bệnh viêm cấp và/hoặc mạn tính khác.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với FLT3L, chứa tập hợp các vùng xác định bổ sung (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 trong đó HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 chứa các trình tự axit amin như nêu trong: (a) các SEQ ID NO.29, 30, 31, 32, 33, và 34, tương ứng; hoặc (b) các SEQ ID NO.29, 30, 31, 35, 33, và 34, tương ứng; hoặc (c) các SEQ ID NO.29, 36, 37, 32, 33, và 38, tương ứng.

Theo một phương án của khía cạnh thứ nhất, kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với: (a) SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2, tương ứng; hoặc (b) SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4, tương ứng; hoặc (c) SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6, tương ứng. Theo phương án khác, VH và VL bao gồm (a) SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2, tương ứng; hoặc (b) SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4, tương ứng; hoặc (c) SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6, tương ứng. Theo phương án khác, kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm (a) vùng chuỗi nặng chứa SEQ ID NO.61 và vùng chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO.62; hoặc (b) vùng chuỗi nặng chứa SEQ ID NO.65 và vùng chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO.66; hoặc (c) vùng chuỗi nặng chứa SEQ ID NO.69 và vùng chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO.70. Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó ức chế quá trình hoạt hóa FLT3 được trung gian bởi FLT3L. Theo phương án khác, kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó không phản ứng chéo với các phân tử phối tử TKR tương tự về mặt cấu trúc. Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó không phản ứng chéo với ít nhất một trong số huSCF và huCSF1. Theo phương án khác, kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó không phản ứng chéo với huSCF hoặc huCSF1. Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể đơn dòng, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể của người, kháng thể nhân tạo, hoặc kháng thể khảm. Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm miền hằng định globulin miễn dịch chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm: (a) miền hằng định IgA; (b) miền hằng định IgD; (c) miền hằng định IgE; (d) miền hằng định IgG1; (e) miền hằng định IgG2; (f) miền hằng định IgG3; (g) miền hằng định IgG4; và (h) miền hằng định IgM. Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm miền hằng định IgG1. Theo phương án khác, kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm miền hằng định globulin miễn dịch chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: (a) miền hằng định Ig kappa; và (b) miền hằng định Ig lambda. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên bao gồm miền hằng định IgG1 người và miền hằng định lambda người. Theo một phương án, miền hằng định IgG1 bao gồm một hoặc nhiều sự thế axit amin được chọn từ nhóm bao gồm L234F, L235E và P331S, được đánh số thứ tự theo chỉ số

đánh số thứ tự châu Âu của Kabat (Edelman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 63:78-85 (1969)).

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo khía cạnh thứ nhất và/hoặc các phương án của nó. Theo một phương án của khía cạnh thứ hai, axit nucleic này liên kết điều khiển với trình tự điều khiển.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến vector chứa axit nucleic theo khía cạnh thứ hai và/hoặc các phương án của nó.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ được biến nạp với axit nucleic của phân tử theo khía cạnh thứ hai và/hoặc các phương án của nó hoặc vector theo khía cạnh thứ ba. Theo một phương án, tế bào vật chủ là tế bào vật chủ động vật có vú. Theo phương án khác, tế bào vật chủ này là tế bào HEK293, tế bào u tủy chuột NS0, hoặc tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO).

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề cập đến dòng tế bào lai sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên hoặc các phương án của nó.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ được phân lập sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên hoặc các phương án của nó.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên hoặc các phương án của nó, bao gồm bước (a) nuôi cấy tế bào vật chủ biểu hiện kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên hoặc nuôi cấy tế bào vật chủ theo khía cạnh thứ ba hoặc phương án của nó hoặc dòng tế bào lai theo khía cạnh thứ tư; và (b) phân lập kháng thể nêu trên hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó từ tế bào vật chủ được nuôi cấy nêu trên.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được sản xuất theo phương pháp theo khía cạnh thứ sáu.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên

hoặc các phương án của nó, và tá được được dụng. Theo một phương án, được phẩm này được cung cấp để sử dụng làm thuốc.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh viêm cấp hoặc mạn tính, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể được phân lập hoặc mảnh của nó theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên hoặc các phương án của nó. Theo một phương án, bệnh viêm này bao gồm bệnh thận mạn tính (CKD) bao gồm, ví dụ CKD gây ra bởi bệnh tiểu đường, bệnh thận do đái tháo đường, và bệnh huyết áp cao.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh tự miễn, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể được phân lập hoặc mảnh của nó theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh nêu trên hoặc các phương án của nó. Theo một phương án, bệnh tự miễn này bao gồm bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh viêm cơ, hội chứng Sjögren nguyên phát, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm màng bồ đào trước, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh viêm khớp dạng thấp.

Các dấu hiệu và ưu điểm này và các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được hiểu đầy đủ hơn từ phần mô tả chi tiết sáng chế sau đây cùng với các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Lưu ý rằng phạm vi của sáng chế được xác định bởi bộ yêu cầu bảo hộ và không bởi việc thảo luận cụ thể các dấu hiệu và các ưu điểm trong phần mô tả sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A - 1C. Quá trình tiết kháng thể dẫn đầu. Fig.1A mô tả quy trình sàng lọc xen kẽ với huFLT3L và muFLT3L và sự làm giàu thu được của các thư viện thực khuẩn thể BMV, CS, DP47 và Dyax. Fig.1B mô tả quy trình mà nhờ đó các kết quả sàng lọc được tách dòng vào trong các vectơ đối với HTRF cạnh tranh xuôi dòng. Fig.1C mô tả các kết quả HTRF (sự phát huỳnh quang được quyết định bởi thời gian đồng nhất) cạnh tranh đối với các kháng thể chọn lọc dẫn đầu.

Fig.2A-2C. Sự biểu hiện FLT3L ở các dòng tế bào. Fig.2A chứng tỏ sự biểu hiện FLT3 tăng ở dòng tế bào RS4;11 so với các dòng tế bào EOL-1, MOLM13, và MV4-11. Fig.2B khẳng định rằng FLT3L tái tổ hợp liên kết với FLT3 trên dòng tế bào RS4;11 theo cách phụ thuộc liều. Fig.2C chứng tỏ rằng sự điều hòa giảm FLT3 trên bề mặt của các tế

bào RS4;11 có thể được phát hiện chính xác với kháng thể kháng FLT3 được bán sẵn có sử dụng phân tích đếm tế bào theo dòng và sự điều hòa giảm này xảy ra trong sự đáp ứng với sự ghép nối với FLT3L theo cách phụ thuộc liều.

Fig.3A và 3B. Sự phát sinh EC80 và thử nghiệm sau đó. Fig.3A thể hiện đường cong chuẩn độ FLT3L được sử dụng để thu được nồng độ mà tại đó 80% của FLT3 bề mặt tế bào được điều hòa giảm trên các tế bào RS4;11 (EC80). Fig.3B thể hiện đặc điểm ức chế của kháng thể kháng FLT3L được bán sẵn và cấu trúc tái tổ hợp của thụ thể FLT3 (FLT3-Fc) chống lại 96 pM FLT3L tái tổ hợp mà theo cách khác dẫn đến sự điều hòa giảm là 80% của FLT3 bề mặt tế bào trên các tế bào RS4;11.

Fig.4A-4C. Sự ức chế ứng viên kháng thể dẫn đầu của sFLT3 người và khỉ cyno. Fig.4A thể hiện các đặc điểm ức chế của năm kháng thể chọn lọc dẫn đầu chống lại 96 pM FLT3L người. Fig.4B thể hiện các đặc điểm ức chế của năm kháng thể chọn lọc dẫn đầu chống lại 96 pM FLT3L khỉ đuôi dài. Fig.4C thể hiện các đặc điểm ức chế của năm kháng thể chọn lọc dẫn đầu chống lại FLT3L chuột.

Fig.5A-C. Sự ức chế kháng thể chọn lọc dẫn đầu của FLT3 bề mặt tế bào. Fig.5A thể hiện khả năng của các kháng thể dẫn đầu liên kết với FLT3L người được biểu hiện trên bề mặt của các dòng tế bào CHO được tải nạp. Fig.5B thể hiện kháng thể dẫn đầu liên kết với FLT3L bề mặt tế bào của khỉ cyno. Fig.5C thể hiện kháng thể dẫn đầu liên kết với FLT3L bề mặt tế bào của chuột nhắt.

Fig.6A-C. Kháng thể chọn lọc dẫn đầu liên kết với FLT3L người nội sinh. Fig.6A thể hiện sự biểu hiện FLT3L trên các tế bào T sơ cấp của người sau 7 ngày kích thích bằng IL-2. Fig.6B thể hiện khả năng của tất cả các kháng thể chọn lọc dẫn đầu liên kết với FLT3L nội sinh trên các tế bào T sơ cấp của người, ngoại trừ dòng vô tính 5D9. Fig.6C thể hiện rằng cải thiện ái lực của CAT5D9 bởi quá trình dime hóa trước khi ủ với các tế bào T sơ cấp được phép phát hiện sự liên kết phụ thuộc liều của dòng vô tính với FLT3L nội sinh trên bề mặt tế bào T.

Fig.7A và 7B. Sự ức chế truyền tín hiệu bề mặt tế bào bởi các kháng thể chọn lọc dẫn đầu. Fig.7A thể hiện đường cong đáp ứng liều của các tế bào RS4;11 đối với các tế bào CHO biểu hiện FLT3L, xác định 1000 CHO trên mỗi giếng khi số lượng tối ưu để cảm ứng 80% sự điều hòa giảm của FLT3 trên bề mặt tế bào RS4;11. Fig.7B thể hiện

rằng tất cả các kháng thể chọn lọc dẫn đầu đều có khả năng ức chế FLT3L bề mặt tế bào trên các tế bào CHO ở phạm vi nào đó.

Fig.8A và 8B. Sự hoạt hóa và trung hòa các con đường truyền tín hiệu ERK. Fig.8A thể hiện nghiên cứu bằng chứng của khái niệm thể hiện sự hoạt hóa sự truyền tín hiệu ERK ở các tế bào RS4;11 bởi FLT3L. Fig.8B thể hiện tác dụng ức chế sự hoạt hóa ERK được cảm ứng bởi FLT3L bằng kháng thể có bán trên thị trường.

Fig.9A và 9B. Sự phong bế kháng thể chọn lọc dẫn đầu của sự truyền tín hiệu xuôi dòng MEK 1/2 và ERK. Fig.9A thể hiện hoạt tính hoạt động của các ứng viên dòng vô tính dẫn đầu quá trình phosphoryl hóa MEK 1/2 được cảm ứng bởi FLT3L người ở các tế bào gốc người CD133+. Fig.9B đưa ra sự khẳng định bổ sung của hoạt tính hoạt động dòng vô tính chống lại sự truyền tín hiệu được cảm ứng bởi FLT3L ở các tế bào gốc người CD133+ sơ cấp, có sử dụng quá trình phosphoryl hóa ERK làm chỉ báo.

Fig.10A và 10B. Tính đặc hiệu đích và động lực học liên kết của các kháng thể chọn lọc dẫn đầu. Fig.10A thể hiện sự sàng lọc Pha III các ứng viên dòng vô tính dẫn đầu và FLT3-Fc chống lại dòng vô tính 5D9. Fig.10B thể hiện sự sàng lọc Pha III của tất cả các dòng vô tính dẫn đầu và FLT3-Fc chống lại CAT8, là đại diện của tất cả các dòng vô tính khác với CAT5D9.

Fig.11A và 11B. Khả năng phản ứng chéo của các kháng thể chọn lọc dẫn đầu đối với huSCF và huCSF. Fig.11A thể hiện rằng các kháng thể chọn lọc dẫn đầu không liên kết với huSCF tương đồng về mặt cấu trúc. Fig.11B thể hiện rằng các kháng thể chọn lọc dẫn đầu không liên kết với huCSF tương đồng về mặt cấu trúc.

Fig.12A và 12B. Sự tối ưu hóa dòng vô tính. Fig.12A thể hiện các kết quả của vòng thứ nhất của quá trình tối ưu hóa dòng vô tính so với CAT5D9 gốc với dòng vô tính 6 (C06) có sử dụng phép phân tích điều hòa giảm RS4;11 FLT3 làm chỉ báo. Fig.12B thể hiện các kết quả của vòng thứ hai của quá trình tối ưu hóa dòng vô tính so với CAT5D9 gốc với dòng vô tính 6 (C06), và các kháng thể chọn lọc dẫn đầu cuối cùng: AM40 và SC4017.

Fig.13A và 13B. Quá trình trung hòa hiệu quả FLT3L bề mặt tế bào nội sinh. Fig.13A thể hiện quá trình điều hòa giảm RS4;11 FLT3 trong sự đáp ứng với sự pha loãng theo bậc của các tế bào CD4+ T biểu hiện FLT3L. Fig.13B thể hiện các dòng vô

tính dẫn đầu trung hòa hoàn toàn hoạt tính của FLT3L bề mặt tế bào trên các tế bào CD4+ T.

Fig.14. Đề cương nghiên cứu về việc trung hòa FLT3L ở các con khỉ đuôi dài khỏe mạnh. Ba nhóm các con khỉ đực đuôi dài (n=4 trên mỗi nhóm) được sử dụng 0,03, 1, hoặc 30 mg/kg AM40 (MEDI1116) trong năm liều dùng hàng tuần trong một tháng, như được chỉ định. Giai đoạn theo dõi tám tuần sau liều cuối được sử dụng để xác định độ bền của kháng thể được sử dụng và hiệu quả của nó đối với các quần thể DC tuần hoàn.

Fig.15A và 15B. Protein FLT3L huyết thanh và tần suất DC tuần hoàn sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L (AM40/MEDI1116). Fig.15A thể hiện sự gắn kết đích bởi MEDI1116, đo các mức FLT3L huyết thanh tự do sau khi sử dụng tại 0,03, 1,0, và 30 mg/kg. Các phép đo huyết thanh hàng ngày được thực hiện từ Ngày 1-8, sau đó các phép đo hàng tuần được thực hiện tới Ngày 85. Fig.15B mô tả sự giảm và phục hồi tần suất CD1c+ (DC cổ điển) tuần hoàn (trái) và tần suất DC dạng tương bào (phải), được đo dưới dạng tỉ lệ phần trăm của đường cơ sở, sau khi xử lý bằng MEDI1116.

Fig.16A-16D. phép đo sự biểu hiện FLT3L và mối tương quan kết quả SLEDAI ở các đối tượng bị bệnh SLE so với phép đo huyết thanh và phân tích đếm tế bào theo dòng của các tế bào T. Fig.16A mô tả các mức FLT3L ở huyết thanh của đối tượng cho khỏe mạnh (HD) và đối tượng bị bệnh SLE. Fig.16B mô tả mối tương quan giữa các kết quả FLT3L SLEDAI huyết thanh. Fig.16C mô tả tần suất tế bào FLT3L+T tuần hoàn ở các đối tượng cho khỏe mạnh (HD) và đối tượng bị bệnh SLE. Fig.16D mô tả mối tương quan giữa các tế bào FLT3L+ CD4+ T và các kết quả SLEDAI.

Fig.17A - 17C. Sự biểu hiện FLT3L ở các tập con tế bào CD4+ T và các kết quả SLEDAI. Fig.17A mô tả phần trăm các tế bào CD4 T_{bất sinh} biểu hiện FLT3L ở HD và đối tượng bị bệnh SLE. Bảng bên dưới mô tả mối tương quan của các tế bào CD4 T_{bất sinh} biểu hiện FLT3L ở đối tượng bị bệnh SLE so với kết quả SLEDAI. Fig.17B mô tả phần trăm các tế bào CD4 T_{MEM} biểu hiện FLT3L ở HD và đối tượng bị bệnh SLE. Bảng bên dưới mô tả mối tương quan của các tế bào CD4 T_{MEM} biểu hiện FLT3L ở đối tượng bị bệnh SLE so với kết quả SLEDAI. Fig.17C mô tả phần trăm các tế bào CD4 T_{CM} biểu hiện FLT3L ở HD và đối tượng bị bệnh SLE. Bảng bên dưới mô tả mối tương quan của các tế bào CD4 T_{bất sinh} biểu hiện FLT3L ở đối tượng bị bệnh SLE so với kết quả SLEDAI.

Fig.18A - 18C. Sự biểu hiện FLT3L ở các tập con PBMC CD4 từ các đối tượng bị bệnh viêm cơ. Fig.18A mô tả phần trăm các tế bào CD4 T_b sinh biểu hiện FLT3L ở HD và đối tượng bị bệnh bị bệnh viêm cơ. Fig.18B mô tả phần trăm các tế bào CD4 T_{MEM} biểu hiện FLT3L ở HD và đối tượng bị bệnh bị bệnh viêm cơ. Fig.18C mô tả phần trăm các tế bào CD4 T_{CM} biểu hiện FLT3L ở HD và biểu hiện bị bệnh viêm cơ.

Fig.19A - 19B. Protein niệu và các kết quả viêm thận ở chuột nhắt MRL. Fig.19A mô tả sự giảm protein niệu tại 17 tuần sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L. Fig.19B mô tả các kết quả viêm thận tại 18 tuần sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L.

Fig.20A - 20C. Các quần thể tế bào đuôi gai lách ở chuột nhắt MRL. Fig.20A mô tả sự thay đổi ở tần suất CD11+ siglec-H+pDC sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L. Fig.20B mô tả tần suất CD11 c+CD11b+mDC sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L. Fig.20C mô tả tần suất CD11c+CD8+mDC sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L.

Fig.21A và 21B. Kết quả bệnh lý tuyến nước bọt ở mô hình chuột nhắt bị hội chứng Sjögren NOD.H2h4. Fig.21A thể hiện sự thay đổi ở bệnh lý tuyến nước bọt ở mô hình chuột nhắt bị hội chứng Sjögren NOD.H2h4 sau khi dùng liều điều trị của kháng thể kháng FLT3L so với đối chứng isotyp. Fig.21B thể hiện sự thay đổi ở bệnh lý tuyến nước bọt ở mô hình chuột nhắt bị hội chứng Sjögren NOD.H2h4 sau khi dùng liều dự phòng của kháng thể kháng FLT3L so với đối chứng isotyp.

Fig.22A - 22D. Các thay đổi sự có mặt tế bào đuôi gai sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L. Fig.22 A và 22B mô tả các thay đổi ở tần suất DC dạng tương bào (B220+CD11c+Siglec-H+) sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L, được thể hiện bằng phép đo tế bào theo dòng (A) và được định lượng (B). Fig.22C và 22D mô tả những thay đổi ở tần suất DC cổ điển (B220^{neg}CD11c^{HI}) sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L, được thể hiện bằng phép đo tế bào theo dòng (C) và được định lượng (D).

Fig.23A - 23C. PK của kháng thể kháng FLT3L (MEDI1116) ở khi đuôi dài tương quan với quá trình trung hòa chức năng của FLT3L, được khẳng định bởi sự ức chế và trở lại của các pDC. Như được chỉ ra bởi các mũi tên, kháng thể kháng FLT3L (MEDI1116) được sử dụng cho khi đuôi dài một lần một tuần vào các ngày 1, 8, 15, 22, 29. Fig.23 A mô tả PK của kháng thể kháng FLT3L (MEDI1116). Fig.23 B mô tả các mức FLT3L hòa tan tại các liều kháng thể kháng FLT3L (MEDI1116) là 0,03 mg/kg, 1,0 mg/kg, và 30

mg/kg. Fig.23 C mô tả tần suất pDC, được đo dưới dạng tỉ lệ phần trăm của đường cơ sở, tại các liều kháng thể kháng FLT3L (MEDI1116) là 0,03 mg/kg, 1,0 mg/kg, và 30 mg/kg.

Fig.24A - 24C. Mô hình định liều ở người đối với kháng thể kháng FLT3L (MEDI1116) phản chiếu liều dùng Q4W. Fig.24 A mô tả PK của kháng thể kháng FLT3L (MEDI1116) ở khi đuôi dài. Fig.24 B mô tả PD của kháng thể kháng FLT3L (MEDI1116) ở khi đuôi dài. Fig.24 C mô tả PD kháng thể kháng FLT3L (MEDI1116) được dự đoán ở người.

Fig.25A - 25B. Kháng thể đơn dòng kháng FLT3L (LFC-1) trung hòa một cách hiệu quả FLT3L trong toàn bộ thời gian điều trị và dẫn đến sự tích tụ phức hợp được chất/phối tử tuần hoàn. Fig.25A mô tả các mức FLT3L huyết thanh tự do sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L và kháng thể đối chứng isotyp. Các mức FLT3L tự do được đo bằng cách sử dụng FT3L-IgG làm chất bắt giữ và kháng thể đa dòng kháng FLT3L chuột nhất được gắn thẻ sulfo làm chất phát hiện. Fig.25B mô tả tổng các mức FLT3L huyết thanh (dạng tự do và liên kết) sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L và kháng thể đối chứng isotyp. Tổng các mức FLT3L được đo bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng kháng FLT3L chuột nhất để bắt giữ và phát hiện.

Fig.26A - 26D. Sự phong bế FLT3L ức chế quá trình hoạt hóa tế bào T ở lách và hạch bạch huyết (LN) dẫn lưu SG của các chuột nhất NOD-H2^{h4} già. Sự phong bế FLT3L bằng kháng thể đơn dòng kháng FLT3L (LFC-1) dẫn đến làm giảm tần suất tế bào CD44^{HI} CD4+ và CD8+ T trải qua kháng nguyên ở lách và LN dẫn lưu tuyến nước bọt (ở cuối của nghiên cứu tại 24-26 tuần tuổi). Các đồ thị thanh thu được từ phân tích đếm tế bào theo dòng của LN dẫn lưu và lách. Mỗi thanh thể hiện giá trị trung bình +/- sai số chuẩn của trung bình (SEM) của n = 4-5 chuột. Fig.26A mô tả các quần thể tế bào CD44^{HI} CD4+ T ở lách sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L và kháng thể đối chứng isotyp. Fig.26B mô tả các quần thể tế bào CD44^{HI} CD4+ T ở LN sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L và kháng thể đối chứng isotyp. Fig.26C mô tả các quần thể tế bào CD44^{HI} CD8+ T ở lách sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L và kháng thể đối chứng isotyp. Fig.26D mô tả các quần thể tế bào CD44^{HI} CD8+ T ở LN sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L và kháng thể đối chứng isotyp.

Fig.27. Sự phong bế kháng thể kháng FLT3L trị liệu làm giảm có chọn lọc hai độ đặc hiệu tự kháng thể IgG huyết thanh. Các mẫu huyết thanh tương ứng được đo bằng phân tích tự kháng thể UTSW IgG.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các kháng thể được phân lập hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết đặc hiệu với FLT3L. Theo một số khía cạnh, các phân tử này là các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết đặc hiệu với FLT3L. Theo một phương án, các kháng thể kháng FLT3L theo sáng chế có thể được sử dụng để ức chế hoặc làm giảm sự liên kết FLT3/FLT3L để ức chế hoạt hóa các quá trình truyền tín hiệu viêm. Cách tiếp cận này có ưu điểm là nó tấn công chứng viêm tại nguồn truyền tín hiệu cho phép cải thiện hơn hiệu quả điều trị kháng viêm. Các polynucleotit liên quan, các vector, các dược phẩm chứa các kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, cũng được đề cập đến. Cũng được đề cập đến là phương pháp sản xuất cũng như phương pháp sử dụng kháng thể kháng FLT3L và mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế, ví dụ phương pháp điều trị bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm mạn tính ở đối tượng (làm liệu pháp trực tiếp, liệu pháp hỗ trợ, hoặc liệu pháp kết hợp).

Để sáng chế có thể được hiểu rõ ràng hơn, thuật ngữ nhất định được định nghĩa trước tiên. Các định nghĩa bổ sung được nêu trong toàn bộ phần mô tả chi tiết.

Thuật ngữ

Trước khi mô tả chi tiết sáng chế, nên hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các thành phần hoặc các bước quy trình cụ thể, vì vậy có thể thay đổi. Trừ khi có quy định khác, tất cả thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế thuộc về. Các tài liệu tham khảo sau đây cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật định nghĩa chung về nhiều thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này: Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (tái bản lần thứ 2, 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, tái bản lần thứ 5, R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); và Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Thuật ngữ sau đây có ý nghĩa như được mô tả cho chúng dưới đây, trừ khi có quy định khác.

Thuật ngữ “kháng thể,” (hoặc đoạn, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó) được sử dụng trong bản mô tả để chỉ ít nhất một phần nhỏ của kháng thể mà có khả năng liên kết với kháng nguyên, ví dụ ít nhất miền biến đổi của chuỗi nặng (VH) và miền biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) trong ngữ cảnh kháng thể điển hình được sản sinh bởi tế bào B. Các cấu trúc kháng thể cơ bản ở các hệ động vật có xương sống là đã được hiểu tương đối rõ. *Xem, ví dụ* Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Tái bản lần thứ 2, 1988). Các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của chúng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các kháng thể đa dòng, đơn dòng, kháng thể của người, kháng thể nhân tạo hoặc kháng thể khảm, các mảnh gắn kết epitop thuật ngữ, Fab, F(ab')₂, Fv, các Fv đơn chuỗi (scFv), các kháng thể đơn chuỗi, các Fv được liên kết bởi disulfit (sdFv), các mảnh bao gồm miền VL hoặc VH (Fd), các mảnh được tạo ra bởi thư viện biểu hiện Fab, và các mảnh kháng thể khác và các tổ hợp của chúng mà vẫn giữ được chức năng liên kết kháng nguyên, *tức là*, khả năng liên kết với, ví dụ FLT3L, một cách đặc hiệu.

Kháng thể điển hình bao gồm ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối liền với nhau qua các liên kết disulfit. Mỗi chuỗi nặng được tạo thành từ vùng biến đổi chuỗi nặng (được gọi tắt ở đây là VH hoặc V_H) và vùng không đổi chuỗi nặng. Vùng không đổi chuỗi nặng này được tạo thành từ ba miền, CH1, CH2, và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ được tạo thành từ vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được gọi tắt ở đây là VL hoặc V_L) và vùng không đổi chuỗi nhẹ. Vùng không đổi chuỗi nhẹ này được tạo thành từ một miền, CL. Các vùng VH và VL có thể còn được chia nhỏ thành các vùng siêu biến đổi, được gọi là các vùng xác định bổ sung (CDR), được nằm xen giữa với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung (FW). Mỗi VH và VL được tạo thành từ ba CDR và bốn FW, được sắp xếp từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy theo thứ tự sau đây: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Các vùng biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền liên kết mà tương tác với kháng nguyên. Các vùng không đổi của các kháng thể có thể điều khiển sự liên kết của globulin miễn dịch với các mô hoặc các yếu tố chủ, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch thuật ngữ, các tế bào yếu tố tác động) và thành phần thứ nhất (Clq) của hệ bổ sung cổ điển. Các kháng thể làm ví dụ theo sáng chế bao gồm các kháng thể kháng FLT3L (gốc và được tạo dòng mầm), các dòng vô tính được tối ưu hóa ái lực, các kháng thể được tối ưu hóa thiếu ADCC, các kháng thể được liên hợp thuật ngữ, ADC), và các kháng thể được tối ưu hóa khác thuật ngữ, các

kháng thể được tối ưu hóa thời gian bán hủy huyết thanh bao gồm, ví dụ các đột biến YTE, xem Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006) và bằng sáng chế Mỹ số 7,083,784, mà được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn).

Theo các phương án nhất định, các CDR của VH (HCDR1, HCDR2, và HCDR3) và các CDR của VL (LCDR1, LCDR2, và LCDR3) gồm các trình tự axit amin của: (a) các SEQ ID NO.29, 30, 31, 32, 33, và 34, tương ứng; hoặc (b) các SEQ ID NO.29, 30, 31, 35, 33, và 34, tương ứng; hoặc (c) các SEQ ID NO.29, 36, 37, 32, 33, và 38, tương ứng.

Kháng thể có thể thuộc lớp bất kỳ trong số năm lớp globulin miễn dịch chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, hoặc các lớp phụ (các isotyp) của chúng thuật ngữ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2), dựa trên độ tương đồng của các miền hằng định chuỗi nặng của chúng được đề cập đến lần lượt là alpha, delta, epsilon, gamma, và mu. Các lớp globulin miễn dịch khác nhau có các cấu trúc tiểu đơn vị khác nhau và đã biết rõ và các cấu hình không gian ba chiều. Các kháng thể có thể là trần hoặc được liên hợp với các phân tử khác như độc tố, đồng vị phóng xạ, v.v. để tạo thành các ADC.

Kháng thể “phong bế” hoặc kháng thể “đôi kháng” là kháng thể mà ức chế hoặc làm giảm hoạt tính sinh học của kháng nguyên mà nó liên kết, như FLT3L. Theo khía cạnh nhất định, kháng thể phong bế hoặc kháng thể đôi kháng về cơ bản ức chế hoặc ức chế hoàn toàn hoạt tính sinh học của kháng nguyên. Ví dụ, sự hoạt hóa FLT3 được trung gian bởi FLT3L có thể được giảm bằng ít nhất 10%, ít nhất 15%, ít nhất 20%, ít nhất 25%, ít nhất 30%, ít nhất 35%, ít nhất 40%, ít nhất 45%, ít nhất 50%, ít nhất 55%, ít nhất 60%, ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc thậm chí 100%.

Thuật ngữ “kháng thể FLT3L,” “kháng thể mà liên kết với FLT3L,” hoặc “kháng thể kháng FLT3L” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà có khả năng liên kết FLT3L với ái lực đáng kể sao cho phân tử này hữu dụng làm chất trị liệu hoặc chất chẩn đoán ở FLT3L hướng đích. Thuật ngữ “kháng FLT3L” cũng bao hàm theo nghĩa rộng các phân tử bao gồm, ví dụ các CDR của các kháng thể theo sáng chế được kết hợp thành khung.

Thuật ngữ “tạo dòng mầm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các axit amin tại các vị trí đặc hiệu trong kháng thể được đột biến ngược thành các axit amin ở dòng mầm.

“Vùng biến đổi” của kháng thể để chỉ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ kháng thể hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng kháng thể, một mình hoặc trong sự kết hợp. Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mỗi loại gồm bốn vùng FW được kết nối bởi ba vùng CDR. Các CDR trong mỗi chuỗi được giữ cùng nhau trong vùng lân cận gần bởi các vùng FW và, với các CDR từ chuỗi còn lại, góp phần tạo nên thông tin của vị trí liên kết kháng nguyên của các kháng thể. Có ít nhất hai kỹ thuật để xác định các CDR: (1) phương pháp dựa trên độ biến đổi trình tự chéo loài (tức là, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (tái bản lần thứ, 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); và (2) phương pháp dựa trên các nghiên cứu tinh thể học về các phức hợp kháng nguyên - kháng thể (Al-lazikani *et al.* (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). Ngoài ra, những sự kết hợp của hai phương pháp này đôi khi được sử dụng trong lĩnh vực để xác định các CDR.

Hệ thống đánh số thứ tự Kabat thường được sử dụng khi đề cập đến gốc trong miền biến đổi (khoảng các gốc 1-107 của chuỗi nhẹ và các gốc 1-113 của chuỗi nặng) thuật ngữ, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, Tái bản lần thứ 5. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Thuật ngữ “đánh số thứ tự vị trí axit amin như theo Kabat” hoặc “vị trí Kabat” và loại tương tự để chỉ hệ thống đánh số thứ tự được sử dụng đối với các miền biến đổi chuỗi nặng hoặc các miền biến đổi chuỗi nhẹ của sự biên soạn các kháng thể trong Kabat *et al.*, 1991).

Thuật ngữ “miền liên kết kháng nguyên,” “mảnh gắn kết kháng nguyên,” và “mảnh gắn kết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một phần của phân tử kháng thể mà bao gồm các axit amin chịu trách nhiệm đối với sự gắn kết đặc hiệu giữa kháng thể và kháng nguyên. Vùng biến đổi cho phép kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên nhận biết một cách chọn lọc và gắn kết đặc hiệu các epitop trên kháng nguyên. Tức là, miền VH và VL, hoặc tập con các vùng xác định bổ sung (CDR), của kháng thể kết hợp để tạo ra vùng biến đổi mà xác định vị trí liên kết kháng nguyên không gian ba chiều. Cụ thể hơn là, miền liên kết kháng nguyên được xác định bởi ba CDR trên mỗi chuỗi trong số các chuỗi VH và VL. Như được sử dụng ở đây, một phần của phân tử kháng nguyên mà chịu trách nhiệm đối với các tương tác đặc hiệu với miền liên kết kháng nguyên được gọi là “epitop.” Miền liên kết kháng nguyên thường bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng

thể và vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể, tuy nhiên, không nhất thiết phải bao gồm cả hai. Ví dụ, mảnh kháng thể được gọi là “Fd” chỉ gồm miền VH, nhưng vẫn còn chức năng liên kết kháng nguyên nào đó của kháng thể nguyên vẹn.

Các mảnh gắn kết của kháng thể được tạo ra bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng sự phân tách bằng enzym hoặc hoá học các kháng thể nguyên vẹn. Các mảnh gắn kết bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, và các kháng thể đơn chuỗi. Việc cắt các kháng thể bằng enzym papain tạo thành hai mảnh gắn kết kháng nguyên giống nhau, cũng được biết đến là các mảnh “Fab”, và mảnh “Fc”, không có hoạt tính liên kết kháng nguyên nhưng có khả năng kết tinh. Việc cắt các kháng thể bằng enzym pepsin tạo thành mảnh F(ab')₂ trong đó hai nhánh của phân tử kháng thể được liên kết và bao gồm hai vị trí liên kết kháng nguyên. Mảnh F(ab')₂ có khả năng liên kết chéo với kháng nguyên. “Fv” khi được sử dụng ở đây để chỉ mảnh tối thiểu của kháng thể mà vẫn còn cả vị trí nhận biết kháng nguyên và vị trí liên kết kháng nguyên. “Fab” khi được sử dụng ở đây để chỉ mảnh của kháng thể mà bao gồm miền hằng định của chuỗi nhẹ và miền CH1 của chuỗi nặng.

Như được sử dụng ở đây, vùng Fc bao gồm các polypeptit bao gồm vùng không đổi của kháng thể không bao gồm miền globulin miễn dịch vùng không đổi thứ nhất. Do đó, Fc để chỉ hai miền globulin miễn dịch vùng không đổi cuối cùng của IgA, IgD, và IgG, và ba miền globulin miễn dịch vùng không đổi cuối cùng của IgE và IgM, và đầu cùng N vùng bản lề linh hoạt đối với các miền này. Đối với IgA và IgM, Fc có thể bao gồm chuỗi J. Đối với IgG, Fc bao gồm các miền globulin miễn dịch Cgamma₂ và Cgamma₃ (Cy₂ và Cy₃) và vùng bản lề giữa Cgamma₁ (Cyl) và Cgamma₂ (Cy₂). Mặc dù các đường bao của vùng Fc có thể thay đổi, vùng Fc chuỗi nặng IgG người luôn được xác định để bao gồm các gốc C226 hoặc P230 đối với đầu cùng carboxyl của nó, trong đó cách đánh số thứ tự là theo chỉ số châu Âu như được nêu trong Kabat *et al.*, 1991.

“Kháng thể đơn dòng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ quần thể kháng thể đồng nhất liên quan đến sự nhận biết và gắn kết đặc hiệu cao của yếu tố quyết định kháng nguyên đơn, hoặc epitop. Điều này là trái ngược với các kháng thể đa dòng mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau hướng đến chống lại các yếu tố quyết định kháng nguyên khác nhau.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” bao hàm cả các kháng thể đơn dòng nguyên vẹn và chiều dài đầy đủ cũng như các mảnh kháng thể (như Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), các mảnh

biến đổi đơn chuỗi (scFv), các protein dung hợp bao gồm một phần kháng thể, và phân tử globulin miễn dịch được cải biến khác bất kỳ bao gồm vị trí nhận biết kháng nguyên. Hơn nữa, “kháng thể đơn dòng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các kháng thể như vậy được tạo ra theo nhiều cách bất kỳ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bởi dòng tế bào lai, sự chọn lọc thực khuẩn thể, sự biểu hiện tái tổ hợp, và các động vật chuyển gen thuật ngữ, sự biểu hiện của kháng thể của người ở chuột chuyển gen).

Thuật ngữ “kháng thể nhân tạo” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể thu được từ globulin miễn dịch không phải người thuật ngữ, chuột), mà đã được thiết kế để làm tăng độ tương đồng với các biến thể kháng thể được sản sinh ở người.

Thuật ngữ “kháng thể của người” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể được sản sinh bởi người hoặc kháng thể có trình tự axit amin tương ứng với kháng thể được sản sinh bởi người được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực thuật ngữ, sự biểu hiện tái tổ hợp ở các tế bào được nuôi cấy, hoặc sự biểu hiện ở động vật chuyển gen). Do đó, thuật ngữ kháng thể của người cũng bao hàm kháng thể có trình tự axit amin tương ứng với kháng thể về mặt nguồn gốc được sản sinh bởi người (hoặc biến thể được thiết kế hoặc dẫn xuất của nó) nhưng được biểu hiện ở hệ thống không phải người thuật ngữ, được sản sinh bởi quá trình tổng hợp hoá học; được biểu hiện tái tổ hợp ở tế bào vi khuẩn, động vật có vú, hoặc côn trùng; hoặc được biểu hiện ở đối tượng động vật). Do đó, kháng thể thu được từ đối tượng người hoặc từ tế bào người thuật ngữ, tế bào lai hoặc dòng tế bào biểu hiện kháng thể tái tổ hợp hoặc mảnh của nó) và sau đó được biểu hiện ở động vật, ví dụ chuột nhắt, được coi là kháng thể của người. Định nghĩa về kháng thể của người này bao gồm các kháng thể nguyên vẹn hoặc có chiều dài đầy đủ, các mảnh của chúng, và/hoặc các kháng thể bao gồm ít nhất một polypeptit chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của người như, ví dụ kháng thể bao gồm polypeptit chuỗi nhẹ chuột và chuỗi nặng người.

Thuật ngữ “kháng thể khảm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các kháng thể trong đó trình tự axit amin của phân tử globulin miễn dịch có nguồn gốc từ hai hoặc nhiều loài động vật. Thông thường, vùng biến đổi của cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng tương ứng với vùng biến đổi của các kháng thể có nguồn gốc từ một loài động vật có vú thuật ngữ, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, v.v.) với độ đặc hiệu, và/hoặc ái lực, và/hoặc khả năng được mong muốn trong khi các vùng không đổi là tương đồng với các trình tự trong các

kháng thể có nguồn gốc từ loài khác (luôn là người) để tránh gọi ra sự đáp ứng miễn dịch ở loài đó.

Thuật ngữ “polynucleotit” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một axit nucleic cũng như nhiều axit nucleic và để chỉ phân tử hoặc cấu trúc axit nucleic được phân lập, ví dụ ARN thông tin (mARN) hoặc ADN plasmit (pADN). Polynucleotit có thể bao gồm liên kết phosphodiester thông thường hoặc liên kết không thông thường thuật ngữ, liên kết amit, như được phát hiện ở các axit nucleic peptit (PNA)). Thuật ngữ “axit nucleic” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một hoặc nhiều đoạn axit nucleic bất kỳ, ví dụ các mảnh ADN hoặc ARN, có mặt ở polynucleotit. Thuật ngữ axit nucleic hoặc polynucleotit “được phân lập” được nhằm đến là axit nucleic, ADN hoặc ARN, mà đã được loại bỏ khỏi môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, polynucleotit tái tổ hợp mã hoá tiểu đơn vị polypeptit trong vector được coi là được phân lập như theo sáng chế. Các ví dụ khác về polynucleotit được phân lập bao gồm các polynucleotit tái tổ hợp được duy trì ở các tế bào vật chủ khác loại hoặc các polynucleotit tinh khiết (một phần hoặc gần như tinh khiết) trong dung dịch. Các phân tử ARN được phân lập bao gồm các bản phiên mã ARN in vivo hoặc in vitro của các polynucleotit. Các polynucleotit hoặc axit nucleic được phân lập còn bao gồm các phân tử được sản xuất bằng cách tổng hợp. Ngoài ra, polynucleotit hoặc axit nucleic có thể có hoặc không bao gồm yếu tố điều hòa như trình tự khởi động, vị trí liên kết ribosom, hoặc trình tự kết thúc phiên mã.

Theo các phương án nhất định, polynucleotit hoặc axit nucleic là ADN. Trong trường hợp là ADN, polynucleotit bao gồm axit nucleic mà mã hóa polypeptit thông thường có thể bao gồm trình tự khởi động và/hoặc các yếu tố kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã khác liên kết điều khiển với một hoặc nhiều vùng mã hóa. Liên kết hoặc gắn kết điều khiển là khi vùng mã hóa cho sản phẩm gen, ví dụ polypeptit, được liên kết với một hoặc nhiều trình tự điều hòa theo cách như vậy để đặt sự biểu hiện của sản phẩm gen trong sự tác động hoặc kiểm soát của (các) trình tự điều hòa. Hai mảnh ADN (như vùng mã hóa polypeptit và trình tự khởi động liên kết với nó) được “liên kết điều khiển” hoặc “gắn kết điều khiển” nếu quá trình cảm ứng hoạt động của trình tự khởi động dẫn đến sự phiên mã mARN mã hóa sản phẩm gen mong muốn và nếu bản chất của liên kết giữa hai mảnh ADN không cản trở khả năng của trình tự điều hòa biểu hiện kiểm soát sự biểu hiện của sản phẩm gen hoặc cản trở khả năng của khuôn ADN được phiên mã. Do đó, vùng

trình tự khởi động sẽ được liên kết điều khiển với axit nucleic mã hóa polypeptit nếu trình tự khởi động này có khả năng tác động đến quá trình phiên mã axit nucleic đó. Trình tự khởi động này có thể là trình tự khởi động đặc hiệu tế bào mà kiểm soát quá trình phiên mã thực sự của ADN chỉ ở các tế bào đã xác định trước. Các yếu tố kiểm soát quá trình phiên mã khác, bên cạnh trình tự khởi động, ví dụ trình tự tăng cường, trình tự điều khiển, trình tự ức chế, và các tín hiệu kết thúc phiên mã, có thể được liên kết điều khiển với polynucleotit để điều khiển quá trình phiên mã đặc hiệu tế bào. Các trình tự khởi động thích hợp và các vùng kiểm soát phiên mã khác theo sáng chế.

Theo các phương án khác, polynucleotit có thể là ARN, ví dụ ở dạng ARN thông tin (mARN).

Thuật ngữ “vector” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ axit nucleic khi được đưa vào trong tế bào vật chủ, nhờ đó tạo ra tế bào vật chủ được biến nạp. Vector có thể bao gồm các trình tự axit nucleic mà cho phép nó sao chép trong tế bào vật chủ, như gốc tái bản. Vector cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều gen chỉ thị chọn lọc và các yếu tố di truyền khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Tế bào “được biến nạp”, hoặc tế bào “chủ”, là tế bào mà axit nucleic đã được đưa vào trong đó bằng các kỹ thuật sinh học phân tử. Thuật ngữ sự biến nạp bao gồm tất cả các kỹ thuật mà nhờ đó axit nucleic có thể được đưa vào trong tế bào này, bao gồm sự chuyển nạp bằng các vector virus, sự biến nạp bằng các vector plasmit, và được ADN trần vào bằng xung điện, chuyển nhiễm qua liposom, và gia tốc súng bắn hạt. Tế bào được biến nạp hoặc tế bào vật chủ có thể là tế bào vi khuẩn hoặc tế bào nhân chuẩn.

Thuật ngữ “FLT3L” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phối tử tyrosin kinaza 3 giống như ung thư tổ chức liên kết McDonough của mèo (FMS), polypeptit mà là xytokin tạo huyết mà liên kết với thụ thể tyrosin kinaza 3 giống FMS (FLT3). FLT3L được biểu hiện ban đầu dưới dạng protein liên kết màng, trước khi được tách bằng enzym thành dạng hòa tan. Cả dạng được liên kết màng (mFLT3L) và được tiết (sFLT3L) được bao gồm trong định nghĩa về FLT3L.

Trong bản mô tả này, “bao gồm,” “gồm có,” “chứa,” và “có” và dạng tương tự có thể có nghĩa được gán cho chúng trong Luật sáng chế Mỹ và có thể có nghĩa là “bao gồm,” “gồm có,” và dạng tương tự; “về cơ bản gồm” hoặc “cơ bản gồm” cũng có nghĩa được gán cho trong Luật sáng chế Mỹ và thuật ngữ này có nghĩa kết thúc mở, cho phép

sự hiện diện của nhiều hơn những gì được liệt kê miễn là các đặc điểm cơ bản hoặc mới của chúng được liệt kê không bị thay đổi khi có sự hiện diện của nhiều hơn những gì đã được liệt kê, nhưng loại trừ các phương án đã biết trong tình trạng kỹ thuật.

Thuật ngữ “xác định,” “đánh giá,” “phân tích,” “đo,” và “phát hiện” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cả sự xác định về mặt định lượng và định tính, và vì vậy, thuật ngữ “xác định” có thể được sử dụng thay thế nhau ở đây với “phân tích,” “đo,” và dạng tương tự. Khi sự xác định định lượng được hướng đến, cụm từ “xác định lượng” của chất phân tích và loại tương tự có thể được sử dụng. Khi sự xác định định tính và/hoặc định lượng được hướng đến, cụm từ “xác định mức” của chất phân tích hoặc “phát hiện” chất phân tích được sử dụng.

Thuật ngữ “tương đồng” hoặc “phần trăm độ tương đồng” trong ngữ cảnh của hai hoặc nhiều axit nucleic hoặc polypeptit, dùng để chỉ hai hoặc nhiều trình tự hoặc tiểu trình tự mà giống hoặc có tỉ lệ phần trăm nhất định của nucleotit hoặc các gốc axit amin giống, khi được so sánh và được căn trình tự (các khoảng trống đưa vào, nếu cần) cho sự tương xứng tối đa, không xem xét đến sự thể axit amin bảo thủ bất kỳ là một phần của độ tương đồng trình tự. Phần trăm độ tương đồng có thể được đo bằng cách sử dụng phần mềm hoặc thuật toán so sánh trình tự hoặc bằng cách quan sát bằng mắt thường. Thuật toán và phần mềm khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật mà có thể được sử dụng để thu được sự căn trình tự axit amin hoặc nucleotit (xem ví dụ, Karlin *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268, như được cải biến trong Karlin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877, và được kết hợp vào các chương trình NBLAST và XBLAST (Altschul *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402). Theo các phương án nhất định, BLAST có khoảng trống có thể được sử dụng như được mô tả trong Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) hoặc Megalign (ADNSTAR).

Thuật ngữ “được phân lập” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phân tử mà không ở trong hoàn cảnh tự nhiên của nó. Không có mức độ tinh chế cụ thể nào được yêu cầu. Ví dụ, kháng thể được phân lập là kháng thể mà không được tạo ra hoặc được đặt trong môi trường bẩm sinh hoặc tự nhiên của nó. Các vật liệu sinh học được tạo ra theo cách tái tổ hợp được coi là được phân lập như được mô tả ở đây mà được tạo ra ở tế bào

không tự nhiên, như tế bào lai. Cơ chất, ví dụ protein được phân lập, như kháng thể, cũng được coi là “được phân lập” nếu nó được tách, được tách phân đoạn, hoặc được tinh chế một phần hoặc về cơ bản được tinh chế bằng kháng thể bất kỳ thích hợp. Ví dụ, kháng thể được coi là “được phân lập” nếu nó về cơ bản không chứa vật liệu tế bào hoặc các protein khác từ nguồn tế bào hoặc nguồn mô mà nó thu được từ đó.

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chất thuật ngữ, phối tử hoặc kháng thể) mà nhận biết và liên kết với phân tử thuật ngữ, thụ thể hoặc epitop), và mà liên kết này đòi hỏi tính bổ sung nào đó giữa chất thuật ngữ, kháng thể) và phân tử thuật ngữ, phối tử). Với định nghĩa này, kháng thể được cho là “gắn kết đặc hiệu” với phối tử khi nó liên kết với phối tử đó dễ dàng hơn là liên kết với phân tử ngẫu nhiên, không liên quan. Thuật ngữ “độ đặc hiệu” được sử dụng ở đây để định lượng ái lực tương đối mà nhờ đó kháng thể nhất định liên kết với phối tử nhất định. Ví dụ, kháng thể “A” có thể được cho rằng có độ đặc hiệu cao hơn đối với phối tử đã cho thuật ngữ, FLT3L) hơn kháng thể “B.”

Thuật ngữ “ái lực” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ số đo cường độ liên kết của epitop riêng rẽ với CDR của kháng thể. Xem, ví dụ Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press), Tái bản lần 2, 1988) tại các trang 27-28. Thuật ngữ “sự thu hút” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ độ ổn định tổng quát của phức hợp giữa quần thể kháng thể và kháng nguyên, tức là, cường độ kết hợp hoạt động của hỗn hợp kháng thể với kháng nguyên. Xem *ví dụ*, Harlow tại các trang 39-34. Sự thu hút liên quan đến cả ái lực của các kháng thể riêng rẽ trong quần thể với các epitop đặc trưng, và cả hiệu giá của các kháng thể và kháng nguyên.

Thuật ngữ “ức chế” hoặc “phong bế” được sử dụng thay thế nhau ở đây và để chỉ sự giảm có ý nghĩa thống kê hoạt tính sinh học, bao gồm sự phong bế hoàn toàn hoạt tính. Ví dụ, “sự ức chế” có thể để chỉ sự giảm bằng khoảng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc 100% hoạt tính sinh học.

Thuật ngữ “chức năng yếu tố tác động” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các hoạt tính của kháng thể mà thu được từ sự tương tác của các thành phần Fc của chúng với các thụ thể Fc hoặc các thành phần của phần bổ sung. Các hoạt tính này bao gồm, ví dụ khả năng gây độc tế bào được gây ra bởi tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), khả năng gây độc tế bào phụ thuộc phần bổ sung (CDC), và sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể

(ADCP). Do đó, protein liên kết kháng nguyên thuật ngữ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó) với chức năng yếu tố tác động thay đổi để chỉ protein liên kết kháng nguyên thuật ngữ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó) mà chứa sự thay đổi ở vùng Fc thuật ngữ, sự thể, sự làm khuyết, hoặc sự bổ sung axit amin hoặc sự thay đổi ở oligosacarit) mà làm thay đổi hoạt tính của ít nhất một chức năng yếu tố tác động thuật ngữ, ADCC, CDC, và/hoặc ADCP). Protein liên kết kháng nguyên thuật ngữ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó) với chức năng yếu tố tác động được cải thiện để chỉ protein liên kết kháng nguyên thuật ngữ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó) mà chứa sự thay đổi ở vùng Fc thuật ngữ, sự thể, sự làm khuyết, hoặc sự bổ sung axit amin hoặc sự thay đổi ở oligosacarit) mà làm tăng hoạt tính của ít nhất một chức năng yếu tố tác động thuật ngữ, ADCC, CDC, và/hoặc ADCP).

Thuật ngữ “đối tượng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ động vật bất kỳ thuật ngữ, động vật có vú), bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở người, động vật linh trưởng không phải là người, loài gặm nhấm, và động vật tương tự, mà là đối tượng tiếp nhận điều trị cụ thể. Thông thường, thuật ngữ “đối tượng” và “đối tượng bị bệnh” và “cá thể” được sử dụng thay thế nhau ở đây. Các ví dụ bổ sung về các đối tượng bao gồm động vật có vú không phải người, như bò, ngựa, chó, cừu, hoặc mèo.

Thuật ngữ “được phẩm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chế phẩm ở dạng mà cho phép hoạt tính sinh học của hoạt chất thuật ngữ, kháng thể kháng FLT3L theo sáng chế) có hiệu quả, và không chứa các thành phần bổ sung mà độc hại đến mức không chấp nhận được đối với đối tượng mà sẽ sử dụng chế phẩm này. Chế phẩm như vậy có thể vô trùng.

“Lượng có hiệu quả” của kháng thể kháng FLT3L như theo sáng chế là lượng đủ để thực hiện mục đích cụ thể đã đưa ra. “Lượng có hiệu quả” có thể được xác định theo kinh nghiệm và theo cách thông thường, liên quan đến mục đích đề ra.

Thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” và “lượng có hiệu quả được lý” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng kháng thể kháng FLT3L theo sáng chế hoặc thuốc khác có hiệu quả để “điều trị” bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng.

Thuật ngữ như “việc điều trị” hoặc “sự điều trị” hoặc “điều trị” hoặc “làm thuyên giảm” hoặc “thuyên giảm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cả (1) phép đo trị liệu mà cứu chữa, làm chậm lại, làm giảm các triệu chứng của, và/hoặc đình chỉ sự tiến triển của

tình trạng hoặc rối loạn bệnh lý được chẩn đoán và (2) phép đo phòng ngừa hoặc ngăn ngừa mà ngăn ngừa và/hoặc làm chậm sự phát triển của tình trạng hoặc rối loạn bệnh lý được hướng đích. Do đó, đối tượng cần điều trị bao gồm đối tượng đang có rối loạn; đối tượng có nguy cơ mắc rối loạn này; và đối tượng mà rối loạn này cần phải được ngăn ngừa. Theo các khía cạnh nhất định, đối tượng “được điều trị” thành công đối với bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm theo các phương pháp của sáng chế nếu đối tượng bị bệnh thể hiện, ví dụ sự giảm toàn bộ, một phần, hoặc tạm thời các triệu chứng liên quan đến bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm.

Các phạm vi được đưa ra ở đây được hiểu là dạng tốc ký đối với tất cả các giá trị nằm trong phạm vi này. Ví dụ, phạm vi từ 1 đến 50 được hiểu là bao gồm số bất kỳ, tổ hợp của các số, hoặc phạm vi con từ nhóm bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, hoặc 50.

Thuật ngữ “điều trị,” việc điều trị,” “sự điều trị,” và dạng tương tự, để chỉ việc làm giảm và/hoặc cải thiện rối loạn và/hoặc các triệu chứng liên quan đến nó. Sẽ được hiểu rõ ràng rằng, mặc dù không được loại trừ, việc điều trị rối loạn hoặc tình trạng bệnh không yêu cầu là rối loạn, tình trạng bệnh, hoặc triệu chứng liên quan đến nó phải được loại bỏ hoàn toàn. Ví dụ, như được dự tính ở đây, sự điều trị rối loạn bao gồm bước ngăn ngừa việc làm tăng các triệu chứng của rối loạn này.

Thuật ngữ “hoặc” được hiểu là bao gồm trừ khi được quy định cụ thể hoặc hiển nhiên từ nội dung là khác. Như được sử dụng ở đây, các danh từ chỉ số ít được hiểu là bao hàm cả dạng số nhiều trừ khi có quy định cụ thể hoặc hiển nhiên từ nội dung là khác.

Hơn nữa, “và/hoặc” khi được sử dụng ở đây được lấy là sự bộc lộ cụ thể của mỗi dấu hiệu hoặc thành phần trong số hai hoặc nhiều dấu hiệu hoặc thành phần đặc trưng có hoặc không có dấu hiệu hoặc thành phần khác. Do đó, thuật ngữ “và/hoặc” khi được sử dụng trong cụm từ như “A và/hoặc B” ở đây được nhằm để bao gồm “A và B,” “A hoặc B,” “A” (một mình), và “B” (một mình). Tương tự, thuật ngữ “và/hoặc” như được sử dụng trong cụm từ như “A, B, và/hoặc C” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ từng phương án trong số các phương án sau đây: A, B, và C; A, B, hoặc C; A hoặc C; A hoặc B; B hoặc C; A và C; A và B; B và C; và A (một mình); B (một mình); và C (một mình).

Trừ khi có quy định cụ thể hoặc hiển nhiên từ nội dung, thuật ngữ “khoảng” được hiểu là nằm trong phạm vi dung sai bình thường trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ nằm trong 2 độ lệch chuẩn của trung bình. “Khoảng” có thể được hiểu là nằm trong lớn hơn hoặc nhỏ hơn 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, hoặc 0,01% của giá trị nêu trên. Trừ khi được chỉ ra là khác, tất cả các giá trị số được đưa ra ở đây được coi là được thay đổi hoàn toàn bởi thuật ngữ “khoảng.”

FLT3L được biểu hiện ban đầu dưới dạng protein liên kết màng, trước khi được tách bằng enzym thành dạng hòa tan. Cả dạng liên kết màng (mFLT3L) và được tiết (sFLT3L) đều có hoạt động chức năng. Vùng liên kết FLT3L được bảo toàn cao giữa các loài, đến mức mà có khả năng phản ứng chéo loài được quan sát thấy giữa các tổ hợp phổi tử/thụ thể người, loài gặm nhấm và khỉ đuôi dài. Tuy nhiên, các đột biến quan trọng xung quanh vị trí liên kết được cho rằng để giải thích cho sự thiếu hụt khả năng phản ứng chéo loài của các kháng thể trung hòa được tạo ra với FLT3L. Các kháng thể trung hòa kháng FLT3L có thể tác động đến các quần thể DC cổ điển và dạng tương bào, làm giảm khả năng của hệ miễn dịch cảm ứng và chống chịu sự đáp ứng viêm kéo dài. Các hiệu quả thứ phát có thể bao gồm làm giảm các tế bào NK tuần hoàn và sự hoạt hóa tế bào T và B giảm, dẫn đến sự sống sót của cả hai loại tế bào này giảm. Nói chung là, sự điều hòa giảm của các con đường này có thể làm giảm chứng viêm tự miễn.

Theo một phương án, được dự tính là kháng thể kháng FLT3L trung hòa thúc đẩy nội cân bằng miễn dịch bằng cách làm ức chế FLT3L khỏi liên kết với FLT3. Chiến lược kháng thể kháng FLT3L hướng đích phổi tử qua thụ thể để tránh nguy cơ quá trình dime hóa thụ thể hoặc truyền tín hiệu không mong đợi. Không giống như thụ thể của nó, không có miền truyền tín hiệu nào liên kết với FLT3L liên kết màng.

Các kháng thể kháng FLT3L

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến các phân tử liên kết FLT3L được phân lập, ví dụ các kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, gắn kết đặc hiệu với FLT3L, ví dụ FLT3L người. Trình tự axit amin và nucleotit có chiều dài đầy đủ đối với FLT3L là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ UniProt Acc. No. P36888 đối với FLT3L người, hoặc UniProt Acc. No. Q00342 đối với FLT3L chuột nhắt). Các kháng thể kháng FLT3L theo sáng chế ức chế sự hoạt hóa do FLT3L gây ra của FLT3 và nhờ đó làm giảm sự truyền tín hiệu tiền viêm và làm giảm chứng viêm ở đối tượng.

Theo phương án được ưu tiên, các kháng thể kháng FLT3L không phản ứng chéo với yếu tố tế bào gốc người thể tương đồng TKR tương tự về mặt cấu trúc (huSCF) hoặc yếu tố kích thích tạo máu người (huCSF1). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận ra rằng SCF và CSF là các phối tử mà cũng liên kết với các thụ thể tyrosin kinaza. Các chất ức chế FLT3 không đặc hiệu mà liên kết với các thành viên họ tyrosin kinaza bổ sung gây ra độc tính từ sự ức chế toàn bộ sự truyền tín hiệu tyrosin kinaza. Do đó, quan trọng là các kháng thể kháng FLT3L chỉ liên kết với FLT3L, và không liên kết với thể tương đồng tương tự về mặt cấu trúc. Nhiều kháng thể kháng FLT3L và các chất ức chế thiếu tính đặc hiệu và liên kết trong phạm vi rộng của thụ thể tyrosin kinaza. Do đó, theo phương án được ưu tiên, kháng thể kháng FLT3L phải chứng tỏ ái lực cao đối với và gắn kết đặc hiệu với FLT3L.

Theo một phương án, các kháng thể kháng FLT3L theo sáng chế là các kháng thể đơn dòng, các kháng thể tái tổ hợp, các kháng thể của người, các kháng thể nhân tạo, và/hoặc các kháng thể khảm.

Theo một số khía cạnh, các phân tử liên kết FLT3L bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv đơn chuỗi hoặc scFv, Fv được liên kết disulfit, miền V-NAR, IgNar, kháng thể bên trong, IgG CH₂, kháng thể nhỏ, F(ab')₃, kháng thể tetrame, kháng thể trime, kháng thể dime, kháng thể đơn miền, DVD-Ig, Fcab, mAb², (scFv)₂, hoặc scFv-Fc. Theo một số khía cạnh, các kháng thể kháng FLT3L là thuộc loại IgG, ví dụ thuộc loại IgG1 (bao gồm miền hằng định globulin miễn dịch chuỗi nặng IgG1). Theo các phương án khác, các kháng thể kháng FLT3L có miền hằng định globulin miễn dịch chuỗi nặng IgA, IgD, IgE, IgG2, IgG3, IgG4, hoặc IgM.

Theo một số phương án, vùng không đổi IgG bao gồm vùng không đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm miền (vùng) không đổi Ig kappa và miền hằng định Ig lambda. Theo một phương án cụ thể, các kháng thể kháng FLT3L bao gồm miền hằng định IgG1 người và miền hằng định lambda người. Theo phương án cụ thể khác, các kháng thể kháng FLT3L có định dạng IgG1-TM sao cho các đột biến được hướng đích trong vùng Fc thay đổi leuxin tại 243 thành phenylalanin (L243F), leuxin tại 235 thành axit glutamic (L235E), và prolin tại 331 thành serin (P331S); cách đánh số thứ tự axit amin là theo chỉ số châu Âu. Các đột biến được hướng đích làm giảm liên kết FcR và chức năng yếu tố tác động ADCC (xem Organesyan *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol*

Crystallogr. 2008 Jun 1; 64(Pt 6): 700-4; và WO 2009100309 A2, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn).

Theo một số khía cạnh, các kháng thể kháng FLT3L là các kháng thể của người thuật ngữ, các kháng thể CAT5D9, SC4017, AM40, CAT8, CAT26, DTAX3, và DYAX5).

Kháng thể CAT5D9

Theo một phương án, kháng thể CAT5D9 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm các vùng xác định bổ sung (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO.29, 36, 37, 32, 33, và 38, tương ứng.

Theo phương án khác, kháng thể CAT5D9 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm hai miền VL có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.6 và hai miền VH có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.5.

Theo phương án khác, kháng thể CAT5D9 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL có trình tự axit amin là SEQ ID NO.6 và hai miền VH có trình tự axit amin là SEQ ID NO.5.

Theo phương án khác, kháng thể CAT5D9 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.20 và hai miền VH được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.19.

Theo một phương án, kháng thể CAT5D9 để chỉ kháng thể IgG1 gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO.70 và chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO.69.

Theo phương án khác, kháng thể CAT5D9 để chỉ kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.72 và chuỗi nặng được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.71.

Kháng thể SC4017

Theo một phương án, kháng thể SC4017 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm các vùng xác định bổ sung (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3,

LCDR1, LCDR2, và LCDR3. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO.29, 30, 31, 35, 33, và 34, tương ứng.

Theo phương án khác, kháng thể SC4017 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm hai miền VL có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.4 và hai miền VH có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.3.

Theo phương án khác, kháng thể SC4017 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL có trình tự axit amin là SEQ ID NO.4 và hai miền VH có trình tự axit amin là SEQ ID NO.3.

Theo phương án khác, kháng thể SC4017 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.18 và hai miền VH được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.17.

Theo một phương án, kháng thể SC4017 để chỉ kháng thể IgG1 gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO.66 và chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO.65.

Theo phương án khác, kháng thể SC4017 để chỉ kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.68 và chuỗi nặng được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.67.

Kháng thể AM40 (MEDI1116)

Theo một phương án, kháng thể AM40 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm các vùng xác định bổ sung (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO.29, 30, 31, 32, 33, và 34, tương ứng.

Theo phương án khác, kháng thể AM40 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm hai miền VL có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.2 và hai miền VH có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.1.

Theo phương án khác, kháng thể AM40 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL có trình tự axit amin là SEQ ID NO.2 và hai miền VH có trình tự axit amin là SEQ ID NO.1.

Theo phương án khác, kháng thể AM40 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.16 và hai miền VH được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.15.

Theo một phương án, kháng thể AM40 để chỉ kháng thể IgG1 gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO.62 và chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO.61.

Theo phương án khác, kháng thể AM40 để chỉ kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.64 và chuỗi nặng được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.63.

Kháng thể CAT8

Theo một phương án, kháng thể CAT8 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm các vùng xác định bổ sung (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO.39, 40, 41, 42, 43, và 44, tương ứng.

Theo phương án khác, kháng thể CAT8 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm hai miền VL có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.8 và hai miền VH có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.7.

Theo phương án khác, kháng thể CAT8 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL có trình tự axit amin là SEQ ID NO.8 và hai miền VH có trình tự axit amin là SEQ ID NO.7.

Theo phương án khác, kháng thể CAT8 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.22 và hai miền VH được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.21.

Theo một phương án, kháng thể CAT8 để chỉ kháng thể IgG1 gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO.74 và chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO.73.

Theo phương án khác, kháng thể CAT8 để chỉ kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.76 và chuỗi nặng được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.75.

Kháng thể CAT26

Theo một phương án, kháng thể CAT26 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm các vùng xác định bổ sung (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO.45, 40, 46, 47, 48, và 49, tương ứng.

Theo phương án khác, kháng thể CAT26 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm hai miền VL có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.10 và hai miền VH có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.9.

Theo phương án khác, kháng thể CAT26 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL có trình tự axit amin là SEQ ID NO.10 và hai miền VH có trình tự axit amin là SEQ ID NO.9.

Theo phương án khác, kháng thể CAT26 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.24 và hai miền VH được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.23.

Theo một phương án, kháng thể CAT26 để chỉ kháng thể IgG1 gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO.78 và chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO.77.

Theo phương án khác, kháng thể CAT26 để chỉ kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.80 và chuỗi nặng được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.79.

Kháng thể DYAX3

Theo một phương án, kháng thể Dyax3 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm các vùng xác định bổ sung (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO.50, 51, 52, 53, 54, và 55, tương ứng.

Theo phương án khác, kháng thể Dyax3 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm hai miền VL có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.82 và hai miền VH có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.81.

Theo phương án khác, kháng thể Dyax3 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL có trình tự axit amin là SEQ ID NO.12 và hai miền VH có trình tự axit amin là SEQ ID NO.11.

Theo phương án khác, kháng thể Dyax3 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.26 và hai miền VH được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.25.

Theo một phương án, kháng thể Dyax3 để chỉ kháng thể IgG1 gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO.82 và chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO.81.

Theo phương án khác, kháng thể Dyax3 để chỉ kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.84 và chuỗi nặng được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.83.

Kháng thể DYAX5

Theo một phương án, kháng thể Dyax5 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm các vùng xác định bổ sung (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO.56, 57, 52, 58, 59, và 60, tương ứng.

Theo phương án khác, kháng thể Dyax5 để chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm hai miền VL có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.86 và hai miền VH có độ tương

đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO.85.

Theo phương án khác, kháng thể Dyax5 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL có trình tự axit amin là SEQ ID NO.14 và hai miền VH có trình tự axit amin là SEQ ID NO.13.

Theo phương án khác, kháng thể Dyax5 để chỉ kháng thể mà bao gồm hai miền VL được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.28 và hai miền VH được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.27.

Theo một phương án, kháng thể Dyax5 để chỉ kháng thể IgG1 gắn kết đặc hiệu với FLT3L và bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO.86 và chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO.85.

Theo phương án khác, kháng thể Dyax5 để chỉ kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.88 và chuỗi nặng được mã hoá bởi trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.87.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với FLT3L, chứa tập hợp các vùng xác định bổ sung (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 trong đó HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 chứa các trình tự axit amin như nêu trong: (a) các SEQ ID NO.29, 30, 31, 32, 33, và 34, tương ứng; hoặc (b) các SEQ ID NO.29, 30, 31, 35, 33, và 34, tương ứng; hoặc (c) các SEQ ID NO.29, 36, 37, 32, 33, và 38, tương ứng.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn vùng khung (FW), được sắp xếp từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy theo thứ tự sau đây: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, và FW4.

Theo các khía cạnh nhất định, các vùng VH và VL có độ tương đồng trình tự và trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với: (a) SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2, tương ứng; hoặc (b) SEQ ID NO.3 và SEQ ID NO.4, tương ứng; hoặc (c) SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6, tương ứng.

Theo các khía cạnh nhất định, các CDR của VH (HCDR1, HCDR2, và HCDR3) và các CDR của VL (LCDR1, LCDR2, và LCDR3) gồm các trình tự axit amin của: (a) các SEQ ID NO.29, 30, 31, 32, 33, và 34, tương ứng; hoặc (b) các SEQ ID NO.29, 30, 31, 35, 33, và 34, tương ứng; hoặc (c) các SEQ ID NO.29, 36, 37, 32, 33, và 38, tương ứng.

Bảng tổng hợp các trình tự kháng thể kháng FLT3L được thể hiện dưới đây trong Bảng 1.

Bảng 1. Bảng tổng hợp trình tự kháng thể kháng FLT3L.

Bảng 1A

Kháng thể	VH (axit amin)	VL (axit amin)
AM40	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSS SYALSWVRQAPGQGLEWMGTRPPTSRTASY AQKFQGRVTITVDESTSTGYMELSSLRSED TAVYYCASNDFVYGSYRFGWGQGTITVTVSSA (SEQ ID NO.1)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRTSGNIAG YFVQWYQQRPGSSPTTVIYEDYQRPSGVP DRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC QSYDDYRRAAFGGGTKLTVL (SEQ ID NO.2)
SC4017	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSS YALSWVRQAPGQGLEWMGTRPPTSRTASY AQKFQGRVTITVDESTSTGYMELSSLRSED AVYYCASNDFVYGSYRFGWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO.3)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRTSGWIA GYFVQWYQQRPGSSPTTVIYEDYQRPSGV PDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC QSYDDYRRAAFGGGTKLTVL (SEQ ID NO.4)
CAT5D9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKISGGTFSS YALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPVFTASYA QKFQGRVTITVDESASTGYIELSSLKSEDTAT YYCASNNYVWGSYRFGWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO.5)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRTSGNIAG YFVQWYQQRPGSSPTTVIYEDYQRPSGVP DRFSGSIDRSSNSASLTISGLKPDDEADYYC QSYDDTSQGVFGAGTKVTVL (SEQ ID NO.6)
CAT8	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARSSGYYGANFDFWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO.7)	QSVLTQPPSASGTPGQRVAISCSGSSSNIGS GYVYQWYQQVPGTAPTLIHRNNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCA AWDDSLSGYVFGTGKTVTV (SEQ ID NO.8)
CAT26	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAVSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCVKDAYGSSWYFYFDYWGQGTMTV TVSS (SEQ ID NO.9)	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGSSSNIGIN PVNWWYQQLPGTAPKVLIIYSDKYRPSGVAD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAA WDDSLN GRVFGTGKTLTVL (SEQ ID NO.10)
Dyax3	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSM YEMRVRQAPGKGLEWVSVIPSGGKTFYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARYSRWFGQLGFYSHYAMDVWSQG TTVTVSS (SEQ ID NO.11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRAITCRASQSIDT YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASKLEDGVPS RFSGSGTGTDFTLTIRSLQPEDFASYFCQQS YSSPGITFGPGTKVEIK (SEQ ID NO.12)
Dyax5	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YIMVWVRQAPGKGLEWVSSIYSSGGSTSYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCTRYSRWFGQLGFYSHYAMDVWSQG TTVTVSS (SEQ ID NO.13)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPPWTFGQGTVEIK (SEQ ID NO.14)

Bảng 1B

Kháng thể	VH (ADN)	VL (ADN)
AM40	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGA GGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGG TCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCA GCAGTTATGCTCTTAGCTGGGTGCGACAGG CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA ACGCGGCCGCCGACCTCCCGGACAGCAAG CTACGCACAGAAATTTAGGGCAGAGTCA CGATTACCGTGGACGAATCCACGAGCACA GGCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGTC AAACGACTTCGTGTACGGGAGTTATCGTTT CTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCAGCG (SEQ ID NO.15)	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTC GGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCATCTCC TGCACCCGCACCAAGTGGGAACATTGCCGGCT ACTTTGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGG CAGTTCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATT ACCAACGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTT CTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTG CCTCCCTCACCCTCTCTGGACTGAAGACTGA GGACGAGGCTGACTACTATTGTCACTCTTATG ATGACTACCGGCGGGCGGCGTTTCGGCGGAGG GACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO.16)
SC4017	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGA GGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGG TCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCA GCAGTTATGCTCTTAGCTGGGTGCGACAGG CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA ACGCGGCCGCCGACCTCCCGGACAGCAAG CTACGCACAGAAATTTAGGGCAGAGTCA CGATTACCGTGGACGAATCCACGAGCACA GGCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGTC AAACGACTTCGTGTACGGGAGTTATCGTTT CTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCA (SEQ ID NO.17)	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTC GGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCATCTCC TGCACCCGCACCAAGTGGGTGGATTGCCGGCT ACTTTGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGG CAGTTCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGAT TACCAACGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCT GCCTCCCTCACCCTCTCTGGACTGAAGACTG AGGACGAGGCTGACTACTATTGTCACTCTTA TGATGACTACCGGCGGGCGGCGTTTCGGCGGA GGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO.18)
CAT5D9	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGA GGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGG TCTCCTGCAAGATTTCTGGAGGCACCTTCA GCAGTTATGCTCTTAGCTGGGTGCGACAGG CCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA GGGATCATCCCTGTCTTTCGGACAGCAAGC TACGCACAGAAATTTAGGGCAGAGTCAC GATTACCGTGGACGAATCCGCGAGCACAG GCTACATAGAACTGAGCAGCCTGAAATCT GAGGACACGGCCACATATTACTGTGCGTC AAATAATTACGTTTGGGGGAGTTATCGTTT CTGGGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCA (SEQ ID NO.19)	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTC GGAGTCTCCGGGGAAGACGGTACCATCTCC TGCACCCGCACCAAGTGGGAACATTGCCGGCT ACTTTGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGG CAGTTCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGAT TACCAACGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGT TCTCTGGCTCCATCGACAGGTCCTCCAACCTCT GCCTCCCTCACCCTCTCTGGACTGAAGCCTG ACGACGAGGCTGACTACTATTGTCACTCTTA TGATGACACCTCTCAAGGTGTGTTTCGGCGCA GGGACCAAGGTACCGTCCTA (SEQ ID NO.20)
CAT8	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGG CTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAG CAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGG CTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA GCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATAC TACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAC CATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAG AAGCAGCGGCTACTACGGGGCCAATTTTG ACTTCTGGGGGCAGGGGACCACGGTCACCG GTCTCGAGT (SEQ ID NO.21)	CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGCGT CCGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCGCCATCTC TTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGT GGTTATGTATACTGGTATCAGCAGGTCCCAG GAACGGCCCCCACACTCCTCATCCATAGGAA TAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGA TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTC CCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGAT GAGGCTGATTATTACTGTGACGCGTGGGATG ACAGCCTGAGTGGTTATGTCTTCGGAACCTGG GACCAAGGTACCGTC (SEQ ID NO.22)

CAT26	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGG CTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAG CAGCTATGCCGTGAGCTGGGTCCGCCAGG CTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA GCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATAC TACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAC CATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCC GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGTGAA AGACGCATATGGCAGCAGCTGGTACTTTTA CTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACAAT GGTCACCGTCTCGAGT (SEQ ID NO.23)	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCTTCAGCGT CTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC TTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAATC AATCCTGTGAACTGGTACCAACAACCTCCCCG GAACGGCCCCCAAAGTCTCTATTTATAGTGA TAAATACCGGCCCTCAGGGGTCGCTGACCGC TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGAACCTCAGCCTC CCTGGCCATCAGTGGCCTCCAGTCTGAGGAT GAGGCTGATTACTTCTGTGCAGCATGGGATG ACAGCCTGAATGGTCGCGTCTTCGGAAGTGG GACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO.24)
Dyax3	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGT CTTGTTACGCCTGGTGGTCTTTACGTCTTT CTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTAT GTACGAGATGCGTTGGGTTTCGCCAAGCTCC TGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTGTTAT CCCTTCTGGTGGCAAGACTTTTTATGCTGA CTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAG AGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGCA GATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGG CCGTGTATTACTGTGCGAGATACAGCAGAT GGTTCGGGCAGCTAGGGTTTTACTCCCACT ACGCTATGGACGTCTGGAGCCAAGGGACC ACGGTCACCGTCTCAAGC (SEQ ID NO.25)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC TGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCGCCAT CACTTGCCGCGCAAGTCAGAGCATCGACACC TATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA AAGCCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTGCATC CAAGTTGGAAGACGGGGTCCCATCAAGATTC AGTGGCAGTGGAACTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGAAGTCTGCAACCTGAAGATTT TGCAAGTTATTTCTGTCAACAGAGCTACTCTA GTCCAGGGATCACTTTTCGGCCCTGGGACCAA GGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO.26)
Dyax5	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGT CTTGTTACGCCTGGTGGTCTTTACGTCTTT CTTGCGCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCTTC TTACATTATGGTTTGGGTTTCGCCAAGCTCC TGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTTCTTCTAT CTATTCTTCTGGTGGCTCTACTTCTTATGCT GACTCCGTAAAGGTCGCTTCACTATCTCT AGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTG CAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACAC AGCCGTGTATTACTGTACGAGATACAGCA GATGGTTTCGGGCAGCTAGGGTTTTACTCCC ACTACGCTATGGACGTCTGGAGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCAAGC (SEQ ID NO.27)	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC TGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT CACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGC TATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA AAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATC CAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT AGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT TGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGT ACCCCTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCA AGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO.28)

Bảng 1C

Kháng thể	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
AM40	SYALS (SEQ ID NO.29)	TRPPTSRTASYA QKFQG (SEQ ID NO.30)	NDFVYGS YRF (SEQ ID NO.31)	TRTSGNIAGYF VQ (SEQ ID NO.32)	EDYQRPS (SEQ ID NO.33)	QSYDDYRRAA (SEQ ID NO.34)
SC4017	SYALS (SEQ ID NO.29)	TRPPTSRTASYA QKFQG (SEQ ID NO.30)	NDFVYGS YRF (SEQ ID NO.31)	TRTSGWIAGYF VQ (SEQ ID NO.35)	EDYQRPS (SEQ ID NO.33)	QSYDDYRRAA (SEQ ID NO.34)
CAT5D9	SYALS (SEQ ID NO.29)	GIIPVFRASYA QKFQG (SEQ ID NO.36)	NNYVWG SYRF (SEQ ID NO.37)	TRTSGNIAGYF VQ (SEQ ID NO.32)	EDYQRPS (SEQ ID NO.33)	QSYDDTSQGV (SEQ ID NO.38)
CAT8	SYAMS (SEQ ID NO.39)	AISGSGGSTYY ADSVKG (SEQ ID NO.40)	SSGYIGA NDFD (SEQ ID NO.41)	SGSSSNIGSGY VY (SEQ ID NO.42)	RNNQRPS (SEQ ID NO.43)	AAWDDSLSGYV (SEQ ID NO.44)

CAT26	SYAVS (SEQ ID NO.45)	AISGSGGSTYY ADSVKG (SEQ ID NO.40)	DAYGSSW YFYFDY (SEQ ID NO.46)	SGSSSNIGINP VN (SEQ ID NO.47)	SDKYRPS (SEQ ID NO.48)	AAWDDSLNGRV (SEQ ID NO.49)
DYAX3	MYEMR (SEQ ID NO.50)	VIPSGGKTFYA DSVKG (SEQ ID NO.51)	YSRWFGQ LGFYSHY AMDV (SEQ ID NO.52)	RASQSIDTYLN (SEQ ID NO.53)	AASKLED (SEQ ID NO.54)	QQSYSSPGIT (SEQ ID NO.55)
DYAX5	SYIMV (SEQ ID NO.56)	SIYSSGGSTSYA DSVKG (SEQ ID NO.57)	YSRWFGQ LGFYSHY AMDV (SEQ ID NO.52)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO.58)	AASSLQS (SEQ ID NO.59)	QQSYSTPPWT (SEQ ID NO.60)

Bảng 1D

Kháng thể	HC	LC
AM40 (axit amin)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGG TFSSYALSWVRQAPGQGLEWMGTRPPT SRTASYAQKFQGRVTITVDESTSTGYME LSSLRSED TAVYYCASNDFVYGSYRFGW QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO.61)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRTSGNIAGYF VQWYQQRPGSSPTTVIYEDYQRPSGVPDRFSGS IDSSSNSASLTISGLKTEDEADYCYQSYDDYRR AAFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTPPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO.62)
AM40 (ADN)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCT GAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTG AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGC ACCTTCAGCAGTTATGCTCTTAGCTGG GTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTT GAGTGGATGGGAACGCGGCCGCCGAC CTCCCGACAGCAAGCTACGCACAGA AATTCAGGGCAGAGTCACGATTACCG TGGACGAATCCACGAGCACAGGCTAC ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG GACACGGCCGTGTATTACTGTGCGTCA AACGACTTCGTGTACGGGAGTTATCGT TTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC GTCTCCTCAGCGTCGACCAAGGGCCCA TCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC CTGGGACTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCCTGTGACGGTGTCTGGAAC TCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTTGAGCCCAAATCTTGAGACAA AACTCACACATGCCACCGTGCCACG	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGCG GAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCATCTCCTG CACCCGCACCAAGTGGGAACATTGCCGGCTACT TTGTGCACTGGTACCAGCAGCGCCCGGCGAG TTCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATTACCA ACGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTG GCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCC CTCACCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGA GGCTGACTACTATTGTCACTTATGATGACTA CCGGCGGGCGGCGTTCCGGCGGAGGGACCAAG CTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCGGCGC CCTCGGTCACTCTGTTCCTCCCTCCTCTGAG GAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGT GTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTG ACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCG TCAAGGCGGGAGTGAGACCACACACCCCTC CAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGA AGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCAC GCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTG GCCCCACAGAATGTTCA (SEQ ID NO.64)

	ACCTGAATTTCGAGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTCTACACCTGCCCCCATCCCGGGA GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA CAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCTTAAGCCTGTCTC CGGGTAAA (SEQ ID NO.63)	
SC4017 (axit amin)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGG TFSSYALSWVRQAPGQGLEWMGTRPPT SRTASYAQKFQGRVTITVDESTSTGYME LSSLRSEDVAVYYCASNDFVYGSYRFW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO.65)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRTSGWIAGYF VQWYQQRPGSSPTTVIYEDYQRPSGVPDRFSGS IDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDDYRR AAFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO.66)
SC4017 (ADN)	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTC TTGGTAGCAACAGCTACAGGTAAGGG GCTCACAGTAGCAGGCTTGAGGTCTAG ACATATATATGGGTGACAATGACATCC ACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTACA CTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG GGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCTC GGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG AGGCACCTTCAGCAGTTATGCTCTTAG CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAG GGCTTGAGTGAGTGGGAACGCGGCCG CCGACCTCCCGGACAGCAAGCTACGCA CAGAAATTTAGGGCAGAGTCACGATT ACCGTGAGCAATCCACGAGCACAGG CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC GTCAAACGACTTCGTGTACGGGAGTTA TCGTTTCTGGGGCCAAGGGACCACGGT	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTC GGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCATCTCC TGCACCCGCACCAAGTGGGTGGATTGCCGGCT ACTTTGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGG CAGTTCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATT ACCAACGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTT TCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGC CTCCCTCACCCTCTCTGGACTGAAGACTGAGG ACGAGGCTGACTACTATTGTGACTCTTATGAT GACTACCGGCGGGCGGCGTTCCGGCGGAGGGA CCAAGCTGACCGTCCTAGGTGAGCCCAAGGC GGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCGCGCCCTCCT CTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACT GGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAG CCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAG CCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACA CCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGG CCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCA

	CACCGTCTCCTCAGCGTCGACCAAGGG CCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGG AACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCC TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAAACTCACACATGCCACCGTGCCC AGCACCTGAATTCGAGGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTCTACACCCTGCCCCATCCC GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCTTAAGCCTGTC TCCGGGTAAA (SEQ ID NO.67)	GTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAG GTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGA CAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO.68)
CAT5D9 (axit amin)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKISGGT FSSYALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPVF RTASYAQKFQGRVTITVDESASTGYIEL SSLKSEDTATYYCASNNYVWGSYRFGW QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO.69)	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRTSGNIAGYF VQWYQQRPGSSPTTVIYEDYQRPSGVPDRFSGS IDRSSNSASLTISGLKPDDEADYYCQSYDDTSQ GVFGAGTKVTVL (SEQ ID NO.70)
CAT5D9 (ADN)	AGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTG AGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGA AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGTTATGCTCTTAGCTGGG TGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTC GGAGTCTCCGGGGAAGACGGTCACCATCTCC TGCACCCGCACCAAGTGGGAACATTGCCGGCT ACTTGTGTCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGG CAGTTCCCCCACCACTGTGATCTATGAGGATT

AGTGGATGGGAACGCGGCCGCGACC TCCCGGACAGCAAGCTACGCACAGAA ATTTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGT GGACGAATCCACGAGCACAGGCTACA TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG ACACGGCCGTGTATTACTGTGCGTCAA ACGACTTCGTGTACGGGAGTTATCGTT TCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCG TCTCCTCAGCGTCGACCAAGGGCCCAT CCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTC AGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACAC CTTCCCGGTGTCTTACAGTCCTCAGG ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA GAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCGAGCAC CTGAATTTCGAGGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAG CCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTCTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAG CTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCTTAAGCCTGTCTCC GGGTAAA (SEQ ID NO.71)	ACCAACGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTT TCTGGCTCCATCGACAGGTCCTCCAACCTGTC CTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAGCCTGACG ACGAGGCTGACTACTATTGTCTGATCTTATGAT GACACCTCTCAAGGTGTGTTTCGGCGCAGGGA CCAAGGTCACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGC GGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCT CTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACT GGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAG CCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAG CCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACA CCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGG CCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCA GTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAG GTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGA CAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO.72)
---	---

Các dẫn xuất

Các kháng thể kháng FLT3L theo sáng chế có thể bao gồm các biến thể của các trình tự được đề cập đến mà vẫn giữ được khả năng gắn kết đặc hiệu với FLT3L. Các biến thể này có thể thu được từ các trình tự của các kháng thể bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, sự thể, làm khuyết, hoặc bổ sung axit amin, có thể được tạo ra trong các vùng FR và/hoặc trong các CDR của các kháng thể kháng FLT3L mà không ngăn chặn sự

liên kết của các kháng thể này với các epitop của chúng. Trong khi các thay đổi ở các FR luôn được thiết kế để cải thiện độ ổn định và khả năng gây miễn dịch của miền liên kết kháng nguyên, sự thay đổi ở các CDR thường được thiết kế để làm tăng ái lực của miền liên kết kháng nguyên đối với đích của nó. Các biến thể của các FR cũng bao gồm các alotyp globulin miễn dịch xuất hiện tự nhiên. Những thay đổi làm tăng ái lực này có thể được xác định bằng kinh nghiệm bởi các kỹ thuật thông thường mà bao gồm thay đổi CDR và thử nghiệm ái lực của miền liên kết kháng nguyên đối với đích của nó. Ví dụ, sự thay thế axit amin bảo toàn có thể được tạo ra bên trong CDR bất kỳ trong số các CDR đã bộc lộ. Những thay đổi khác nhau có thể được tạo ra theo các phương pháp được mô tả trong tài liệu *Antibody Engineering*, tái bản lần thứ 2, Oxford University Press, ed. Borrebaeck, 1995. Những thay đổi này bao gồm nhưng không bị giới hạn ở các trình tự nucleotit mà được thay đổi bởi sự thay thế các codon khác nhau mà mã hóa gốc axit amin tương đương về mặt chức năng bên trong trình tự, do đó tạo ra sự thay đổi “câm”. Ví dụ, các axit amin không phân cực bao gồm alanin, leuxin, isoleuxin, valin, prolin, phenylalanin, tryptophan, và methionin. Các axit amin trung tính phân cực bao gồm glyxin, serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin. Các axit amin tích điện dương (bazo) bao gồm arginin, lysin, và histidin. Các axit amin tích điện âm (axit) bao gồm axit aspartic và axit glutamic.

Các dẫn xuất và các chất tương tự của các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm các phương pháp tái tổ hợp và tổng hợp (Maniatis (1990) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, tái bản lần 2, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., và Bodansky *et al.* (1995) *The Practice of Peptide Synthesis*, Tái bản lần 2, Spring Verlag, Berlin, Đức).

Theo một phương án, phương pháp sản xuất miền VH mà là biến thể trình tự axit amin của miền VH theo sáng chế bao gồm bước bổ sung, loại bỏ, thế, hoặc chèn thêm một hoặc nhiều axit amin trong trình tự axit amin của miền VH được bộc lộ trong sáng chế, tùy ý kết hợp miền VH do đó được đề cập đến với một hoặc nhiều miền VL, và thử nghiệm miền VH hoặc tổ hợp hoặc các tổ hợp VH/VL đối với sự gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Phương pháp tương tự có thể được sử dụng trong đó một hoặc nhiều biến thể trình tự của miền VL theo sáng chế được kết hợp với một hoặc nhiều miền VH.

Các kỹ thuật xáo trộn hoặc tổ hợp tương tự cũng được bộc lộ bởi Stemmer (Nature (1994) 370: 389-391), người mà mô tả kỹ thuật liên quan đến gen β -lactamaza nhưng quan sát thấy rằng phương pháp này có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể.

Theo các phương án khác, có thể tạo ra các vùng VH hoặc VL mới mang một hoặc nhiều trình tự có nguồn gốc từ các trình tự theo sáng chế có sử dụng sự gây đột biến ngẫu nhiên một hoặc nhiều gen VH và/hoặc VL được chọn. Một kỹ thuật như vậy, PCR có khả năng gây sai sót, được mô tả bởi Gram *et al.* (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1992) 89: 3576-3580).

Phương pháp khác mà có thể được sử dụng để hướng sự gây đột biến đến các CDR của các gen VH hoặc VL. Các kỹ thuật này được bộc lộ bởi Barbas *et al.* (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (1994) 91: 3809-3813) và Schier *et al.* (J. Mol. Biol. (1996) 263: 551-567).

Tương tự, một, hai, hoặc cả ba CDR của miền liên kết kháng nguyên có thể được ghép vào danh mục các miền VH hoặc VL, mà sau đó được sàng lọc mảnh gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với FLT3L.

Một phần của miền biến đổi globulin miễn dịch hữu dụng ở đây có thể bao gồm ít nhất một trong số các CDR về cơ bản như được nêu ra ở đây và, tùy ý, can thiệp vào các vùng khung từ các mảnh scFv như được nêu ra ở đây. Phần này có thể bao gồm ít nhất khoảng 50% của một trong hai hoặc cả hai FR1 và FR4, 50% là 50% đầu cùng C của FR1 và 50% đầu cùng N của FR4. Các gốc bổ sung tại đầu cùng N hoặc đầu cùng C của phần cơ bản của miền biến đổi có thể là phần thường không liên kết với các vùng miền biến đổi xuất hiện tự nhiên. Ví dụ, sự tạo cấu trúc của kháng thể bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể dẫn đến việc đưa các gốc đầu cùng N hoặc đầu cùng C được mã hóa bởi các cầu nối được đưa vào để thúc đẩy việc tách dòng hoặc các bước thao tác khác. Các bước thao tác khác bao gồm đưa các cầu nối vào để nối các miền biến đổi với các trình tự protein khác bao gồm các vùng không đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch, các miền biến đổi khác thuật ngữ, trong quá trình sản xuất các kháng thể dime), hoặc các chất đánh dấu có protein như được thảo luận chi tiết hơn dưới đây.

Các miền liên kết kháng nguyên của sáng chế theo sáng chế có thể được liên kết với phân tử hoạt động khác, ví dụ peptit hoặc protein khác (albumin, kháng thể khác, v.v.). Ví dụ, các miền liên kết kháng nguyên có thể được liên kết bởi phương pháp liên

kết chéo hóa học hoặc bởi phương pháp tái tổ hợp. Các miền liên kết kháng nguyên này có thể cũng được liên kết với một trong số nhiều polyme không chứa protein, ví dụ polyetylen glycol, polypropylen glycol, hoặc polyoxyalkylen, theo cách được nêu trong Bảng sáng chế Mỹ các số 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192; hoặc 4,179,337. Các miền liên kết kháng nguyên này có thể được cải biến về mặt hóa học bởi sự liên hợp cộng hóa trị với polyme, ví dụ để tăng chu kỳ bán hủy tuần hoàn của chúng. Các polyme và các phương pháp làm ví dụ để gắn chúng cũng được thể hiện trong Bảng sáng chế Mỹ số 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285, và 4,609,546.

Kháng thể được bọc lộ có thể cũng được thay đổi để có mô hình glycosyl hóa mà khác với mô hình tự nhiên. Ví dụ, một hoặc nhiều gốc carbohydrat có thể được loại bỏ và/hoặc một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được bổ sung. Việc bổ sung các vị trí glycosyl hóa vào các mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được hoàn thành bởi việc thay đổi trình tự axit amin để chứa các trình tự liên ứng vị trí glycosyl hóa đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các phương pháp khác để làm tăng số lượng các gốc carbohydrat trên các mảnh kháng thể là bằng cách ghép cặp hóa học hoặc enzym của các glycosit với các gốc axit amin của kháng thể. Các phương pháp này được mô tả trong WO 87/05330, và trong Aplin *et al.* (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., 22: 259-306. Việc loại bỏ các gốc carbohydrat bất kỳ khỏi kháng thể có thể được hoàn thành theo cách hóa học hoặc enzym, ví dụ như được mô tả bởi Hakimuddin *et al.* (1987) Arch. Biochem. Biophys., 259: 52; và Edge *et al.* (1981) Anal. Biochem., 118: 131 và bởi Thotakura *et al.* (1987) Meth. Enzymol., 138: 350. Các mảnh kháng thể này cũng có thể được gắn thể với chất đánh dấu phát hiện được, hoặc chất đánh dấu hoạt động. Các chất đánh dấu phát hiện được bao gồm các chất đánh dấu phóng xạ như ^{131}I hoặc ^{99}Tc , mà cũng có thể được gắn vào các mảnh kháng thể bằng cách sử dụng hóa học thông thường. Các chất đánh dấu phát hiện được cũng bao gồm các chất đánh dấu enzym như peroxidaza cải ngựa hoặc phosphataza kiềm. Các chất đánh dấu phát hiện được còn bao gồm các gốc hóa học như biotin, mà có thể được phát hiện qua sự liên kết với gốc phát hiện được cùng nguồn gốc đặc trưng, ví dụ avidin được đánh dấu.

Các miền liên kết kháng nguyên, trong đó trình tự CDR chỉ khác nhau không đáng kể với trình tự được nêu ở đây được bao hàm trong phạm vi của sáng chế. Thông thường, axit amin được thể bởi axit amin liên quan có điện tích, các đặc điểm kỵ nước, hoặc hóa

học lập thể tương tự. Các sự thể này là nằm trong hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Không giống như trong các CDR, sự thay đổi đáng kể hơn có thể được tạo ra ở các FR mà không ảnh hưởng bất lợi đến các tính chất liên kết của kháng thể. Những thay đổi đối với các FR bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, việc nhân hóa các gốc khung nhất định được thiết kế hoặc có nguồn gốc không phải từ người mà quan trọng đối với sự tiếp xúc kháng nguyên hoặc để ổn định hóa vị trí liên kết, ví dụ thay đổi lớp hoặc lớp phụ của vùng không đổi, thay đổi các gốc axit amin đặc hiệu mà có thể thay đổi chức năng yếu tố tác động như liên kết thụ thể Fc, ví dụ như được mô tả trong Bằng sáng chế Mỹ số 5,624,821 và 5,648,260 và Lund *et al.* (1991) J. Immun. 147: 2657-2662 và Morgan *et al.* (1995) Immunology 86: 319-324, hoặc thay đổi các loài mà từ đó vùng không đổi thu được.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ đánh giá rằng các cải biến được mô tả trên đây không phải là tất cả, có thể được sử dụng cho các tiểu đơn vị protein được mô tả ở đây, và có thể các cải biến khác cũng có khả năng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật từ các bộ lọc của sáng chế.

Ái lực và độ đặc hiệu kháng thể kháng FLT3L

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận biết rằng các kháng thể kháng FLT3L để sử dụng trong bệnh tự miễn yêu cầu liên kết ái lực cao, nhưng phải không có độc tính mà ngăn việc sử dụng chúng ở người. Các thể tương đồng tương tự về mặt cấu trúc của FLT3L bao gồm yếu tố tế bào gốc (SCF, cũng được biết đến là phối tử KIT) và yếu tố kích thích tạo máu 1 (CSF1, cũng được biết đến là yếu tố kích thích tạo máu thực khuẩn thể "M-CSF"). Kháng thể kháng FLT3L không đặc hiệu mà liên kết với FLT3L và cũng liên kết với SCF và CSF1 có thể dẫn đến độ độc ngoài đích. Do đó các kháng thể kháng FLT3L theo sáng chế vẫn có tính đặc hiệu liên kết với chỉ FLT3L, nhưng không liên kết với các xytokin tương tự về mặt cấu trúc như SCF và CSF1. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ biết sử dụng, nhưng không bị giới hạn ở, các động lực học liên kết, bao gồm K_{on} , K_{off} và K_D làm các phép đo độ đặc hiệu liên kết.

FLT3L huyết thanh và pDC tuần hoàn là các chỉ thị sinh học mà có thể được sử dụng làm chất chỉ thị độ độc liên quan đến các dòng vô tính dẫn đầu kháng thể kháng FLT3L. Giảm nhanh pDC khi FLT3L được trung hòa chỉ ra sự ức chế việc truyền tín hiệu tế bào qua trung gian FLT3L mà tăng cường sự đáp ứng miễn dịch. Sự phục hồi nhanh

tần suất pDC trong sự có mặt của FLT3L tự do có thể phản ánh việc không có tính độc trong kháng thể kháng FLT3L. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể kháng FLT3L trung hòa FLT3L và cho phép làm suy kiệt một cách đảo ngược được cDC và pDC khi FLT3L tự do phục hồi. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ nhận biết rằng giảm các tế bào đuôi gai sau quá trình trung hòa FLT3L, sau đó trở lại đường cơ sở là chỉ dẫn của độc tính thấp của dòng vô tính dẫn đầu.

Phương pháp sản xuất kháng thể kháng FLT3L

Thực hành sáng chế sử dụng, trừ khi được chỉ ra là khác, các kỹ thuật sinh học phân tử (bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp), vi sinh vật học, sinh học tế bào, hóa sinh và miễn dịch học, mà cũng tốt trong tầm nhìn của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các kỹ thuật này được giải thích đầy đủ trong tài liệu, như, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, tái bản lần thứ hai (Sambrook, 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (Gait, 1984); “Animal Cell Culture” (Freshney, 1987); “Methods in Enzymology” “Handbook of Experimental Immunology” (Weir, 1996); “Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells” (Miller and Calos, 1987); “Current Protocols in Molecular Biology” (Ausubel, 1987); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis, 1994); “Current Protocols in Immunology” (Coligan, 1991). Các kỹ thuật này có thể áp dụng được để sản xuất polypeptit theo sáng chế, và, như vậy, có thể được xem xét trong quá trình tạo ra và thực hành sáng chế. Các kỹ thuật đặc biệt hữu dụng đối với các phương án cụ thể sẽ được thảo luận trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Theo một phương án, axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được liên kết điều khiển với một hoặc nhiều trình tự điều khiển sự biểu hiện trong tế bào vật chủ. Axit nucleic được phân lập có thể được kết hợp tái tổ hợp vào trong vectơ, mà đến lượt vectơ được chuyển nạp vào trong tế bào vật chủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết.

Theo một phương án, các tế bào vật chủ được biến nạp với axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà được liên kết điều khiển với một hoặc nhiều trình tự điều khiển được dự tính ở đây. Các ví dụ về các tế bào vật chủ được dự tính bao gồm các tế bào động vật có vú, như tế bào HEK293, tế bào u tủy chuột NS0, hoặc tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO).

Theo một phương án, các kháng thể đơn dòng kháng FLT3L thuật ngữ, CAT5D9, SC4017, hoặc AM40) và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp tế bào lai, như các phương pháp được mô tả bởi Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495. Sử dụng phương pháp tế bào lai, chuột nhắt, chuột đồng, hoặc động vật chủ thích hợp khác, được gây miễn dịch như được mô tả trên đây để khiến cho các tế bào lympho sản xuất kháng thể mà sẽ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên gây miễn dịch.

Theo phương án khác, các lympho bào cũng có thể được gây miễn dịch *in vitro*. Sau khi gây miễn dịch, các lympho bào được phân lập và được dung hợp với dòng tế bào u tủy thích hợp bằng cách sử dụng, ví dụ polyetylen glycol, để tạo thành tế bào thuộc dòng tế bào lai mà sau đó có thể được chọn ra khỏi các lympho bào và các tế bào u tủy chưa được dung hợp. Các tế bào lai mà sản xuất các kháng thể đơn dòng hướng đặc hiệu chống lại kháng nguyên được chọn như được xác định bằng phương pháp kết tủa miễn dịch, thẩm tách miễn dịch, hoặc bằng thử nghiệm liên kết *in vitro* thuật ngữ, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA); thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA)) sau đó có thể được nhân lên trong môi trường nuôi cấy *in vitro* bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) hoặc *in vivo* dưới dạng các khối u cổ trướng ở động vật. Các kháng thể đơn dòng này sau đó có thể được tinh chế từ môi trường nuôi cấy hoặc dịch cổ trướng như được mô tả cho các kháng thể đa dòng trên đây.

Theo cách khác, các kháng thể đơn dòng kháng FLT3L thuật ngữ, CAT5D9, SC4017, hoặc AM40) và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp ADN tái tổ hợp như được mô tả, ví dụ trong Bằng sáng chế Mỹ số 4,816,567. Các polynucleotit mã hóa kháng thể đơn dòng được phân lập từ các tế bào B trưởng thành hoặc các tế bào lai, như bằng RT-PCR sử dụng các môi oligonucleotit mà khuếch đại đặc hiệu các gen mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể, và trình tự của chúng được xác định bằng cách sử dụng các quy trình thông thường. Sau đó, các polynucleotit được phân lập mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ được tách dòng vào trong các vector biểu hiện thích hợp mà khi được chuyển nạp vào trong các tế bào vật chủ như tế bào *E. coli*, các tế bào COS khi, các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), hoặc các tế bào u tủy mà theo cách khác không sản xuất protein globulin

miễn dịch, sản xuất các kháng thể đơn dòng bởi tế bào vật chủ. Còn nữa, các kháng thể đơn dòng tái tổ hợp kháng FLT3L hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó của các loài mong muốn có thể được phân lập từ các thư viện biểu hiện biểu hiện các CDR của loài mong muốn như được mô tả (McCafferty *et al.*, 1990, Nature, 348:552-554; Clarkson *et al.*, 1991, Nature, 352:624-628; và Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

(Các) polynucleotit mã hóa kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể còn được cải biến theo nhiều cách khác nhau có sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp để tạo ra các kháng thể thay thế. Theo một số khía cạnh, các miền hằng định của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của, ví dụ kháng thể đơn dòng chuột nhắt có thể được thế (1) đối với các vùng đó của, ví dụ kháng thể của người để tạo ra kháng thể khảm hoặc (2) đối với polypeptit không phải globulin miễn dịch để tạo ra kháng thể dung hợp. Theo một số khía cạnh, các vùng không đổi được cắt cụt hoặc được loại bỏ để tạo ra mảnh kháng thể mong muốn của kháng thể đơn dòng. Sự gây đột biến hướng vị trí hoặc mật độ cao của vùng biến đổi có thể được sử dụng để tối ưu hóa độ đặc hiệu, ái lực v.v. của kháng thể đơn dòng.

Theo các khía cạnh nhất định, kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Các kháng thể của người có thể được tạo ra trực tiếp bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực. Các lympho bào B người được bất tử hóa được gây miễn dịch *in vitro* hoặc được phân lập từ cá thể được gây miễn dịch mà sản xuất kháng thể hướng đến chống lại kháng nguyên đích có thể được tạo ra (Xem, ví dụ Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer *et al.*, 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; và Bằng sáng chế Mỹ số 5,750,373).

Còn nữa, kháng thể của người kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể được chọn từ thư viện thực khuẩn thể, nơi mà thư viện thực khuẩn thể đó biểu hiện các kháng thể của người, như được mô tả, ví dụ trong Vaughan *et al.*, 1996, Nat. Biotech., 14:309-314, Sheets *et al.*, 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162, Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381, và Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Các kỹ thuật để tạo ra và sử dụng các thư viện thực khuẩn thể kháng thể cũng được mô tả trong Bằng sáng chế Mỹ số 5,969,108, 6,172,197, 5,885,793, 6,521,404;

6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; và 7,264,963; và Rothe *et al.*, 2007, J. Mol. Bio., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018 (mỗi tài liệu được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn).

Chiến thuật trưởng thành ái lực và chiến thuật xáo trộn chuỗi (Marks *et al.*, 1992, Bio/Technology 10:779-783, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn) là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể của người ái lực cao hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số khía cạnh, kháng thể đơn dòng kháng FLT3L có thể là kháng thể nhân tạo. Các phương pháp để thiết kế, nhân hóa, hoặc tái tạo bề mặt các kháng thể không phải người hoặc người cũng có thể được sử dụng và đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Kháng thể nhân tạo, được tái tạo bề mặt hoặc đương thiết kế tương tự có thể có một hoặc nhiều gốc axit amin từ nguồn mà không phải là người, ví dụ nhưng không bị giới hạn ở, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, động vật linh trưởng không phải người, hoặc động vật có vú khác. Các gốc axit amin không phải của người này được thay thế bởi các gốc mà được đề cập đến là các gốc “nhập”, mà thường lấy từ miền biến đổi, không đổi “nhập” hoặc miền khác của trình tự người đã biết. Các trình tự được nhập này có thể được sử dụng để làm giảm khả năng gây miễn dịch hoặc làm giảm, tăng cường hoặc thay đổi liên kết, ái lực, tốc độ liên kết, tốc độ phân ly, độ thu hút, độ đặc hiệu, thời gian bán hủy, hoặc đặc điểm thích hợp bất kỳ khác, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Nói chung, các gốc CDR liên quan trực tiếp và cơ bản nhất đến việc ảnh hưởng đến liên kết FLT3L. Do đó, một phần hoặc toàn bộ các trình tự CDR không phải của người hoặc của người được giữ lại trong khi các trình tự không phải của người của các vùng biến đổi và không đổi có thể được thay thế bằng các axit amin của người hoặc các axit amin khác.

Các kháng thể cũng có thể tùy ý nhân tạo, được tái tạo bề mặt, được thiết kế hoặc các kháng thể của người được thiết kế có giữ lại ái lực cao đối với kháng nguyên FLT3L và các tính chất sinh học có lợi khác. Để đạt được mục đích này, các kháng thể kháng FLT3L nhân tạo (hoặc của người) hoặc được thiết kế và các kháng thể được tái tạo bề mặt có thể tùy ý được tạo ra bởi quy trình phân tích trình tự gốc và các sản phẩm nhân tạo và được thiết kế thuộc về khái niệm khác nhau có sử dụng các mô hình ba chiều của các trình tự gốc, được thiết kế, và nhân tạo này. Các mô hình globulin miễn dịch ba chiều thường sẵn có và quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ

thuật. Các chương trình máy tính là sẵn có mà minh họa và thể hiện các cấu trúc hình thể không gian ba chiều có khả năng của các trình tự globulin miễn dịch ứng viên được chọn. Sự kiểm tra các hiện thị này cho phép phân tích vai trò có khả năng của các gốc trong việc tạo chức của trình tự globulin miễn dịch ứng viên, *tức là*, phân tích các gốc mà ảnh hưởng đến khả năng của globulin miễn dịch ứng viên liên kết với kháng nguyên của nó, như FLT3L. Theo cách này, các gốc khung (FW) có thể được chọn và được kết hợp từ các trình tự liên ứng và nhập sao cho đặc tính kháng thể mong muốn, như ái lực tăng đối với (các) kháng nguyên, được.

Quá trình nhân hóa, tái tạo bề mặt hoặc thiết kế các kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết, như nhưng không bị giới hạn ở các phương pháp được mô tả trong, Jones *et al.*, Nature 321 :522 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239: 1534 (1988)), Sims *et al.*, J. Immunol. 151 : 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993), Bằng sáng chế Mỹ các số 5,639,641, 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 5,955,358; 6,204,023; 6,180,370; 6,331,431; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; 4,816,567; 5,969,108; 7,635,666; 7,723,270; 7,557,189; 7,538,195; và 7,342,110; Đơn Quốc tế số PCT/US98/16280; PCT/US91/05939; PCT/US94/01234; PCT/GB92/01755; Công bố đơn sáng chế Quốc tế số WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; và Công bố bằng sáng chế châu Âu số EP 229246; mỗi tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn, bao gồm các tài liệu được trích dẫn trong đó.

Các kháng thể nhân tạo kháng FLT3L và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó cũng có thể được tạo ra ở các chuột nhắt chuyển gen chứa locut globulin miễn dịch người mà có khả năng sau khi gây miễn dịch tạo ra danh mục đầy đủ các kháng thể của người khi không có mặt quá trình sản xuất globulin miễn dịch nội sinh. Phương pháp tiếp cận này được mô tả trong Bằng sáng chế Mỹ số 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; và 5,661,016.

Theo các khía cạnh nhất định, mảnh kháng thể kháng FLT3L được đề cập đến. Nhiều kỹ thuật khác nhau là đã biết để sản xuất các mảnh kháng thể. Theo truyền thống,

các mảnh này thu được qua quá trình cắt bằng phân giải protein các kháng thể nguyên vẹn thuật ngữ Morimoto et al, 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117; Brennan et al, 1985, Science, 229:81). Theo các khía cạnh nhất định, các mảnh kháng thể kháng FLT3L được sản xuất tái tổ hợp. Các mảnh kháng thể Fab, Fv, và scFv tất cả có thể được biểu hiện trong và được tiết từ *E. coli* hoặc các tế bào vật chủ khác, do đó cho phép sản xuất lượng lớn các mảnh này. Các mảnh kháng thể kháng FLT3L này cũng có thể được tách từ các thư viện thực khuẩn thể kháng thể được thảo luận trên đây. Các mảnh kháng thể kháng FLT3L cũng có thể là các kháng thể mạch thẳng như được mô tả trong Bảng sáng chế Mỹ số 5,641,870. Các kỹ thuật khác để sản xuất các mảnh kháng thể, ví dụ tổng hợp hóa học, sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo sáng chế, các kỹ thuật có thể được làm thích ứng đối với quá trình sản xuất các kháng thể đơn chuỗi đặc hiệu đối với FLT3L (xem, ví dụ Bảng sáng chế Mỹ số 4,946,778). Ngoài ra, các phương pháp có thể được làm thích ứng đối với việc xây dựng cấu trúc của các thư viện biểu hiện Fab (xem, ví dụ Huse *et al.*, Science 246: 1275-1281 (1989)) để cho phép xác định nhanh chóng và có hiệu quả các mảnh Fab đơn dòng có độ đặc hiệu mong muốn đối với FLT3L, hoặc các dẫn xuất, các mảnh, các chất tương tự hoặc các thể tương đồng của nó. Các mảnh kháng thể có thể được tạo ra bởi các kỹ thuật trong lĩnh vực kỹ thuật bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: (a) mảnh F(ab')₂ được tạo ra bởi quá trình phân hủy pepsin của phân tử kháng thể; (b) mảnh Fab được tạo ra bằng cách khử các cầu liên kết disulfit của mảnh F(ab')₂, (c) mảnh Fab được tạo ra bởi quá trình xử lý phân tử kháng thể bằng papain và chất khử, và (d) các mảnh Fv.

Kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được cải biến để làm tăng thời gian bán hủy huyết thanh của nó. Điều này có thể đạt được, ví dụ bằng sự kết hợp epitop liên kết thụ thể cứu trợ vào trong kháng thể hoặc mảnh kháng thể bằng cách đột biến vùng thích hợp trong kháng thể hoặc mảnh kháng thể hoặc bằng cách kết hợp epitop vào thể peptit mà sau đó được dung hợp với kháng thể hoặc mảnh kháng thể tại đầu hoặc ở giữa thuật ngữ, bằng kháng thể tổng hợp ADN hoặc peptit), hoặc bằng cách đột biến YTE. Các phương pháp khác để tăng thời gian bán hủy huyết thanh của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ sự liên hợp với phân tử khác loại như PEG là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Dược phẩm

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa các kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị cho đối tượng.

Lượng có hiệu quả của dược phẩm theo sáng chế nên được sử dụng, trong đó “lượng có hiệu quả” được xác định là lượng mà đủ để tạo ra sự đáp ứng phòng ngừa, trị liệu hoặc cải thiện mong muốn ở đối tượng. Lượng có hiệu quả sẽ thay đổi phụ thuộc vào loài và khối lượng của đối tượng cần được sử dụng, nhưng có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề cập đến các chế phẩm trị liệu và phòng ngừa để cho đối tượng cần điều trị sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa (làm giảm khả năng) bệnh tự miễn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh viêm cơ, hội chứng Sjögren nguyên phát, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm màng bồ đào trước, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh viêm khớp dạng thấp.

Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế bao gồm kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng. Đối với vấn đề này, “các chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng” bao gồm nhưng không bị giới hạn ở chất hỗ trợ, chất mang, tá dược, chất làm trượt, chất tạo ngọt, chất pha loãng, chất bảo quản, thuốc nhuộm/chất nhuộm màu, chất tăng cường vị, chất hoạt động bề mặt, chất tạo ẩm, chất phân tán, chất gây thấm ổn định, chất tạo ổn định, chất đẳng trương, dung môi, hoặc chất nhũ hóa mà có thể có hoặc không được phê chuẩn bởi Cơ quan Quản lý Dược phẩm và Thực phẩm Hoa Kỳ (United States Food and Drug Administration) là có thể chấp nhận được để sử dụng ở người hoặc các vật nuôi. Ví dụ, các chất mang thích hợp là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm chất ổn định hóa, chất pha loãng, và chất đệm. Các chất ổn định thích hợp bao gồm các carbohydrat, như sorbitol, lactoza, mannitol, tinh bột, sucroza, dextran, và glucoza, và protein, như albumin hoặc casein. Các chất pha loãng thích hợp bao gồm nước muối, muối cân bằng Hanks, và dung dịch Ringers. Các chất đệm thích hợp bao gồm phosphat kim loại kiềm, carbonat kim loại kiềm, hoặc carbonat kim loại kiềm thổ.

Theo các khía cạnh nhất định, các dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều chất bổ trợ, như một hoặc nhiều lipit, phospholipit, carbohydratt, và lipopolysacarit. Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế tùy ý chứa một hoặc nhiều hoạt chất bổ sung.

Trong trường hợp cụ thể, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Tổng quan về chế phẩm và/hoặc quy trình sản xuất các dược phẩm này có thể được tìm thấy, ví dụ trong Remington: The Science and Practice of Pharmacy, tái bản lần thứ 21, Lippincott Williams & Wilkins, 2005 (được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn). Thông thường, kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được trộn với chất mang để tạo thành dung dịch, hỗn dịch, hoặc nhũ tương. Một hoặc nhiều chất bổ trợ được thảo luận ở đây có thể được bổ sung trong chất mang hoặc có thể được bổ sung sau đó. Dược phẩm theo sáng chế có thể là dung dịch, nhũ tương hoặc hỗn dịch chứa nước hoặc có thể là chế phẩm khô. Theo các khía cạnh nhất định, dược phẩm theo sáng chế có thể được làm khô hoặc được làm đông khô, ví dụ bằng cách sấy đông lạnh hoặc sấy phun để cho các mục đích bảo quản hoặc bào chế. Chúng có thể được hoàn nguyên thành chế phẩm lỏng bằng cách bổ sung chất mang dạng lỏng thích hợp hoặc được sử dụng ở dạng chế phẩm khô bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng qua nhiều con đường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các con đường làm ví dụ để sử dụng các dược phẩm này bao gồm đường miệng, niêm mạc, tại chỗ, qua da, hít, ngoài đường tiêu hóa, dưới lưỡi, qua má, trực tràng, âm đạo, và qua mũi. Do đó, theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được bào chế để được sử dụng qua các con đường được chọn từ nhóm bao gồm đường miệng, tại chỗ, qua da, hít, ngoài đường tiêu hóa, dưới lưỡi, qua má, trực tràng, âm đạo, và qua mũi. Thuật ngữ ngoài đường tiêu hóa như được sử dụng ở đây bao gồm các kỹ thuật tiêm hoặc truyền dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong xương ức. Theo các khía cạnh nhất định, dược phẩm theo sáng chế được bào chế để cho phép kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được chứa trong đó là sinh khả dụng khi sử dụng cho đối tượng.

Lựa chọn sử dụng dược phẩm sẽ phụ thuộc vào quá trình bào chế được lựa chọn. Dược phẩm theo sáng chế được sử dụng theo cách tương thích với chế phẩm dạng liều, và ở lượng mà sẽ có hiệu quả trị liệu. Theo các khía cạnh nhất định, dược phẩm theo sáng chế được bào chế thành các chế phẩm ở dạng rắn, bán rắn, dạng lỏng hoặc dạng khí; bao gồm, nhưng không giới hạn ở, viên nén, viên nang, bột, hạt, mỡ, dung dịch, thuốc đạn, dạng tiêm, dạng xông hít, dạng gel, dạng vi cầu và khí dung.

Trong các trường hợp nhất định, dược phẩm bao gồm kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể là ở dạng rắn hoặc dạng lỏng. Theo một số khía cạnh, (các) chất mang là dạng hạt để chế phẩm là, ví dụ ở dạng viên nén hoặc dạng bột. Theo các khía cạnh khác, (các) chất mang này là dạng lỏng, với chế phẩm là, ví dụ dạng siro uống, dạng lỏng tiêm được hoặc dạng sol khí, mà hữu dụng để sử dụng, ví dụ qua đường hít. Khi được dự tính sử dụng đường miệng, dược phẩm chứa kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là ở dạng rắn hoặc dạng lỏng, trong đó dạng bán rắn, bán lỏng, hỗn dịch và dạng gel được bao gồm trong các dạng này ở đây được coi là dạng rắn hoặc lỏng.

Theo các khía cạnh nhất định, là chế phẩm dạng rắn để sử dụng qua đường miệng, dược phẩm chứa kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng bột, dạng hạt, dạng viên nén, dạng viên tròn, dạng viên nang, dạng kẹo nhai, dạng bánh quế hoặc dạng tương tự. Trong một số trường hợp, chế phẩm dạng rắn này thường sẽ chứa một hoặc nhiều chất pha loãng trơn hoặc chất mang ăn được. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều chất sau đây có thể có mặt thêm: chất kết dính như carboxymethylxenluloza, etyl xenluloza, xenluloza vi tinh thể, gồm tragacan hoặc gelatin; các tá dược như tinh bột, lactoza hoặc dextrin, chất gây rã như axit alginic, natri alginat, Primogel, tinh bột ngô và chất tương tự; chất làm trơn như magie stearat hoặc Sterotex; chất làm trượt như silic dioxit keo; chất tạo ngọt như sucroza hoặc saccharin; chất tạo hương vị như peppermint, methyl salixylat hoặc chất tạo hương cam; và chất tạo màu.

Các chế phẩm này có thể lấy dạng vi cầu, dạng dung dịch, dạng hỗn dịch, dạng viên nén, viên tròn, viên nang, c giải phóng kéo dài hoặc dạng bột và chứa khoảng từ 0,001 đến 95% kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo

sáng chế. Một số dạng liều dùng có thể chứa từ 50 µg đến 250 µg kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số khía cạnh, khi được phẩm theo sáng chế ở dạng viên nang, ví dụ viên nang gelatin, nó có thể chứa, ngoài các nguyên liệu theo sáng chế, chất mang dạng lỏng như polyetylen glycol hoặc dầu. Các chế phẩm dùng đường miệng cũng có thể chứa các chất khởi phát được sử dụng thông thường như, ví dụ loại được lý của saccharin, xenluloza và magie carbonat.

Theo các khía cạnh khác, được phẩm theo sáng chế ở dạng lỏng, ví dụ còn ngọt, siro, dung dịch, nhũ tương hoặc hỗn dịch. Theo các phương án nhất định, chất lỏng này có thể để sử dụng qua đường miệng hoặc để phân phối bằng cách tiêm. Theo các phương án nhất định, khi được dự tính dùng qua đường miệng, được phẩm theo sáng chế chứa, ngoài kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, một hoặc nhiều loại trong số chất tạo ngọt, chất bảo quản, thuốc nhuộm/chất nhuộm màu và chất tăng cường hương vị. Theo các khía cạnh nhất định, trong được phẩm được dự tính sử dụng bằng cách tiêm, một hoặc nhiều loại trong số chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất tạo ẩm, chất phân tán, chất gây thấm ổn định, chất đệm, chất tạo ổn định và chất đẳng trương có thể được bao gồm.

Trong các trường hợp nhất định, được phẩm dạng lỏng chứa kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, dù chúng ở dạng dung dịch, hỗn dịch hoặc dạng tương tự khác, có thể chứa một hoặc nhiều thành phần sau đây: chất pha loãng vô trùng như nước để tiêm, dung dịch nước muối, ví dụ nước muối sinh lý, dung dịch Ringer, natri clorit đẳng trương, các dầu cố định như mono hoặc diglyxerit tổng hợp mà đóng vai trò là dung môi hoặc môi trường tạo hỗn dịch, polyetylen glycol, glyxerin, propylen glycol hoặc các dung môi khác; các chất kháng khuẩn như rượu benzylic hoặc metyl paraben; các chất chống oxy hóa như axit ascorbic hoặc natri bisulfit; chất tạo chelat như axit etylendiaminetetraaxetic; các chất đệm như axetat, xitrat hoặc phosphat và các chất để điều chỉnh trương lực như natri clorit hoặc dextroza. Trong một số trường hợp, chế phẩm này có thể được bọc trong ống tiêm, các ống tiêm sẵn dùng hoặc các lọ đa liều được làm bằng thủy tinh hoặc chất dẻo. Theo một số phương án, được phẩm tiêm được tốt hơn là vô trùng.

Theo các phương án khác, dược phẩm bao gồm kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được nhằm để sử dụng tại chỗ, trong trường hợp đó chất mang một cách thích hợp có thể bao gồm nền dung dịch, nhũ tương, thuốc mỡ hoặc gel. Theo các khía cạnh nhất định, nền, ví dụ có thể bao gồm một hoặc nhiều loại sau đây: vazolin, lanolin, polyetylen glycol, sáp ong, dầu khoáng, các chất pha loãng như nước và rượu, và các chất nhũ hóa và các chất ổn định hóa. Theo các khía cạnh khác, các chất làm đặc có thể có mặt trong dược phẩm để sử dụng tại chỗ. Theo các phương án nhất định, nếu được dự tính sử dụng qua da, dược phẩm chứa kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được bao gồm với miếng dán qua da hoặc thiết bị điện chuyển ion.

Theo các phương án khác, dược phẩm chứa kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được dự tính để sử dụng qua trực tràng, ở dạng, ví dụ thuốc đạn. Đối với các thuốc đạn, chất gắn kết và chất mang có thể bao gồm, ví dụ polyalkalen glycol hoặc triglyxerit. Trong các trường hợp nhất định, chế phẩm để sử dụng qua trực tràng chứa nền có dầu dưới dạng tá dược không gây kích ứng thích hợp. Các nền này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, lanolin, bơ ca cao hoặc polyetylen glycol.

Theo các khía cạnh khác, dược phẩm chứa kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế bao gồm các đơn vị liều mà có thể được sử dụng dưới dạng sol khí. Thuật ngữ sol khí được sử dụng để chỉ nhiều hệ thống nằm trong phạm vi từ hệ thống có bản chất keo đến các hệ thống gồm các bao gói được điều áp. Theo các phương án nhất định, sự phân phối được thực hiện bằng khí hóa lỏng hoặc khí nén hoặc bằng hệ thống bơm thích hợp mà phát tán hoạt chất. Theo một số phương án, sol khí của kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được phân phối ở hệ thống pha đơn, pha kép, hoặc ba pha để phân phối (các) hoạt chất. Theo các phương án khác, sự phân phối sol khí bao gồm vật chứa, chất kích hoạt, van, vật chứa phụ cần thiết, và các loại tương tự, mà cùng nhau có thể tạo thành kit. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng xác định chế phẩm dạng sol khí và các chế độ phân phối.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng trong chất mang dược lý thích hợp, không độc, có thể được chứa trong các vi nang, vi hạt, và/hoặc có thể được chứa trong thể cấy giải phóng kéo dài.

Theo các khía cạnh khác, dược phẩm theo sáng chế bao gồm nguyên liệu mà tạo thành vỏ phủ xung quanh hoạt chất. Trong một số trường hợp, nguyên liệu mà tạo thành vỏ phủ thường là trơ, và có thể được chọn từ, ví dụ đường, senlắc, và các chất phủ ruột khác.

Theo các khía cạnh khác, dược phẩm theo sáng chế ở dạng rắn hoặc dạng lỏng chứa chất mà liên kết với kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế và nhờ đó giúp phân phối kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Trong các trường hợp nhất định, các chất thích hợp mà có khả năng này bao gồm protein hoặc liposom.

Theo các khía cạnh nhất định, dược phẩm mà sẽ được sử dụng cho đối tượng dùng dạng của một hoặc nhiều liều đơn vị, mà, ví dụ viên nén có thể là dạng liều đơn vị đơn, và vật chứa chứa kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế ở dạng sol khí có thể chứa nhiều liều đơn vị. Các phương pháp chính xác để bào chế các dạng liều này đã biết, hoặc sẽ rõ ràng, đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, *xem* Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Tái bản lần thứ 20 (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). Chế phẩm để sử dụng sẽ, trong trường hợp bất kỳ, chứa lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, hoặc muối dược dụng của nó, để giúp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh quan tâm theo sự bộc lộ trong sáng chế.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế chứa một hoặc nhiều hoạt chất trị liệu bổ sung. Theo các phương án khác, liều có hiệu quả trị liệu của dược phẩm theo sáng chế được cho đối tượng cần điều trị sử dụng ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất trị liệu bổ sung. Như được sử dụng ở đây, “dạng kết hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hỗn hợp bao gồm kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế và một hoặc nhiều hoạt chất trị liệu bổ sung, mỗi loại có thể được sử dụng lần lượt (liên tiếp), cùng thời điểm hoặc đồng thời.

Dược phẩm theo sáng chế có thể mong muốn được sử dụng tại một số cách quãng để duy trì các mức trị liệu. Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng liên hợp với các phương pháp diệt khuẩn hoặc kìm hãm vi khuẩn.

Mặc dù phần mô tả về dược phẩm được đề cập đến ở đây về nguyên lý hướng đến dược phẩm mà thích hợp để sử dụng cho người, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng các chế phẩm này thường thích hợp để sử dụng cho tất cả các loại đối tượng. Theo các khía cạnh nhất định, đối tượng này là động vật có vú. Theo các khía cạnh nhất định, động vật có vú bao gồm động vật linh trưởng, như người, khỉ và vượn người, và động vật không phải linh trưởng như vật nuôi, bao gồm động vật thí nghiệm và thú cưng nuôi trong nhà và động vật trang trại thuật ngữ, mèo, chó, lợn, gia súc, cừu, dê, ngựa, thỏ), và động vật chưa thuần hóa, như động vật hoang dã, chim, hoặc loại tương tự.

Điều trị bệnh tự miễn/kháng viêm

Sáng chế cũng đề cập đến các chế phẩm và phương pháp mà hữu dụng để điều trị các bệnh tự miễn và/hoặc các bệnh viêm khác (tức là, các bệnh liên quan đến hệ miễn dịch phản ứng quá mức và/hoặc bị trục trặc) bao gồm các kháng thể kháng FLT3L, như các kháng thể được mô tả trên đây. Theo các phương án khác nhau, các kháng thể kháng FLT3L có thể được sử dụng kết hợp với các thuốc điều hòa miễn dịch khác được thiết kế để ức chế hoặc làm suy yếu hệ miễn dịch của đối tượng hoặc đáp ứng miễn dịch đặc hiệu đối với kháng nguyên cụ thể hoặc tập hợp các kháng nguyên và nhờ đó làm giảm hoặc ngăn ngừa bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm khác.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp để điều trị bệnh tự miễn và/hoặc các bệnh viêm khác bao gồm bước sử dụng một hoặc nhiều kháng thể kháng FLT3L. Như được thể hiện ở đây, việc sử dụng các kháng thể kháng FLT3L có thể dẫn đến ít nhất một trong số việc giảm sự đáp ứng miễn dịch, biểu hiện một hoặc nhiều cat-xet truyền tín hiệu miễn dịch học, hoặc giảm quần thể tế bào miễn dịch. Theo các khía cạnh nhất định, đối tượng bị bệnh hoặc đối tượng thể hiện bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm khác được sử dụng kháng thể kháng FLT3L.

Việc điều trị với liệu pháp trị liệu bệnh tự miễn và/hoặc bệnh viêm khác bao gồm kháng thể kháng FLT3L gây ra, ví dụ việc giảm tốc độ tiến triển của bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm, làm chậm hoặc làm ổn định quá trình tăng sinh tế bào miễn dịch, sự co lại các

thương tổn thuật ngữ, như ở đối tượng bị bệnh MS), và/hoặc thoái lui bệnh. Theo một số khía cạnh, các số đo để đo sự giảm hoặc làm chậm bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm thuật ngữ, chứng viêm giảm, các mức xytokin viêm, quần thể tế bào miễn dịch, và/hoặc tổn hại liên quan, như thương tổn mô) có thể có ý nghĩa thống kê. Sự giảm các số đo của bệnh tự miễn hoặc bệnh viêm có thể được đo bằng phép so sánh mức của các số đo của đối tượng bị bệnh tại đường cơ sở (trước khi điều trị) so với các mức được kỳ vọng của sự tiến triển bệnh của đối tượng, so với mức kỳ vọng của sự tiến triển bệnh dựa trên quần thể đối tượng bị bệnh lớn, hoặc so với mức kỳ vọng của sự tiến triển bệnh của quần thể đối chứng.

Theo một phương án, phương pháp điều trị được dự tính ở đây bao gồm bước sử dụng hoặc dùng phân tử liên kết kháng FLT3L, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế cho đối tượng hoặc đối tượng bị bệnh, hoặc sử dụng hoặc dùng phân tử liên kết kháng FLT3L cho mô hoặc dòng tế bào được phân lập từ đối tượng hoặc đối tượng bị bệnh, trong đó đối tượng hoặc đối tượng bị bệnh này bị bệnh, triệu chứng của bệnh, hoặc có xu hướng bị bệnh.

Các bệnh được nhắm đến bao gồm các bệnh viêm cấp hoặc mạn tính bao gồm bệnh tiểu đường Typ 1 và Typ 2, CKD, bao gồm, ví dụ CKD do bệnh tiểu đường gây ra, bệnh thận do đái tháo đường, và bệnh huyết áp cao, chứng xơ vữa động mạch, bệnh Alzheimer, bệnh ung thư, và các biến chứng liên quan đến các bệnh này, bao gồm bệnh tim, chứng tăng huyết áp, bệnh thiếu máu, bệnh viêm màng ngoài tim, chứng loạn dưỡng xương do thận, và các bệnh khác. Các bệnh được dự tính khác bao gồm bệnh tự miễn, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh viêm cơ, hội chứng Sjögren nguyên phát, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm màng bồ đào trước, bệnh vẩy nến, và bệnh viêm khớp dạng thấp.

Theo phương án khác, việc điều trị cũng được dự tính bao gồm bước sử dụng hoặc dùng được phẩm chứa phân tử liên kết kháng FLT3L, ví dụ kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế cho đối tượng hoặc đối tượng bị bệnh, hoặc sử dụng hoặc dùng được phẩm chứa phân tử liên kết kháng FLT3L cho mô hoặc dòng tế bào được phân lập từ đối tượng hoặc đối tượng bị bệnh, mà bị bệnh, triệu chứng của bệnh, hoặc có thiên hướng bị bệnh.

Theo các phương pháp của sáng chế, ít nhất một kháng thể kháng FLT3L như được xác định đầu đó ở đây được sử dụng để thúc đẩy sự đáp ứng trị liệu tích cực đối với bệnh tự miễn hoặc viêm. Thuật ngữ “đáp ứng trị liệu tích cực” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ việc giảm các triệu chứng liên quan đến bệnh tự miễn hoặc viêm. Do đó, ví dụ sự cải thiện bệnh có thể được đặc trưng là sự đáp ứng hoàn toàn. Thuật ngữ “đáp ứng hoàn toàn” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ không có mặt bệnh có thể phát hiện được về mặt lâm sàng với sự bình thường hóa các kết quả thử nghiệm bất kỳ trước đó. Theo cách khác, sự cải thiện bệnh có thể được chia loại là sự đáp ứng một phần. “Sự đáp ứng trị liệu tích cực” bao hàm việc giảm hoặc ức chế sự tiến triển và/hoặc khoảng thời gian bệnh tự miễn hoặc viêm, giảm hoặc cải thiện mức độ nghiêm trọng của bệnh tự miễn hoặc viêm, và/hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng của nó từ việc sử dụng phân tử liên kết kháng FLT3L theo sáng chế.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hội chứng Sjögren nguyên phát, bao gồm bước: cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả dược lý của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh viêm cơ, bao gồm bước: cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả dược lý của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh lupus ban đỏ hệ thống (SLE), bao gồm bước: cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả dược lý của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo một số khía cạnh, đối tượng này có các mức FLT3L huyết thanh tăng, khi được đo bằng tần suất của các tế bào CD4+ T biểu hiện FLT3L, so với đối tượng khỏe mạnh.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp chẩn đoán bệnh lupus ban đỏ hệ thống (SLE) ở đối tượng, bao gồm bước (a) đo mức FLT3L huyết thanh, hoặc (b) đo tần suất các tế bào CD4+ T biểu hiện FLT3L, trong đó các mức FLT3L huyết thanh tăng hoặc tần suất các tế bào CD4+ T biểu hiện FLT3L tăng ở đối tượng so với đối tượng cho khỏe mạnh chỉ ra rằng đối tượng này bị SLE. Theo các khía cạnh nhất định, các tế bào CD4+ T là các tế bào ghi nhớ yếu tố tác động (T_{EM}).

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp trung hòa FLT3L liên kết màng ở đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối

tượng này lượng có hiệu quả dược lý của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo các khía cạnh nhất định, FLT3L được trung hòa nghịch đảo sao cho hoạt tính của FLT3L liên kết màng có thể trở về các mức “trước khi sử dụng”.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp trung hòa FLT3L hòa tan ở đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng lượng có hiệu quả dược lý của kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo các khía cạnh nhất định, FLT3L được trung hòa nghịch đảo sao cho các mức của FLT3L hòa tan có thể trở về các mức trước khi sử dụng.

Theo các phương án cụ thể, phương pháp trung hòa FLT3L hòa tan còn bao gồm bước sử dụng cho đối tượng kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó dưới da, một lần một tuần, ở ngưỡng nằm trong khoảng từ khoảng 0,03 mg/kg đến khoảng 30 mg/kg. Theo các phương án khác, phương pháp này còn bao gồm bước sử dụng cho đối tượng kháng thể kháng FLT3L hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó dưới da, một lần mỗi bốn tuần, tại liều khoảng 150 mg/kg.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm quần thể tế bào đuôi gai cổ điển tuần hoàn (cDC) và tế bào đuôi gai dạng tương bào (pDC) ở đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng lượng có hiệu quả dược lý của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo các khía cạnh nhất định, các quần thể cDC và pDC được giảm theo cách nghịch đảo sao cho quần thể cDC và pDC này có khả năng trở về các mức trước khi sử dụng.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm sự biểu hiện FLT3L trên các tế bào CD4⁺ T, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả dược lý của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm tỉ lệ phần trăm các tế bào CD4⁺ T biểu hiện FLT3L, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng lượng có hiệu quả dược lý của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm sự truyền tín hiệu ERK ở nguyên bào lympho, bao gồm bước cho nguyên bào lympho này tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm quá trình phosphoryl hóa MEK 1/2 ở các tế bào gốc người CD133+ sơ cấp, bao gồm bước cho tế bào gốc này tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Các ví dụ sau đây được đưa ra để cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật với sự bộc lộ và mô tả đầy đủ cách để tạo ra và sử dụng các thử nghiệm, sàng lọc và phương pháp trị liệu theo sáng chế, và không nhằm để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả với sự tham chiếu đến các ví dụ sau đây. Các ví dụ chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không nên được hiểu là bị giới hạn ở các ví dụ này mà nên được hiểu là bao hàm các biến đổi bất kỳ và tất cả các biến đổi mà rõ ràng là kết quả từ sự bộc lộ của sáng chế được đưa ra ở đây.

Ví dụ 1. Sản xuất kháng thể kháng FLT3L

Tổng quan:

FLT3L là glycoprotein homodime được liên kết không qua cầu nối disulphit, kích thước 65 kDa. Độ tương đồng trình tự phôi tử và thụ thể đối với người, động vật linh trưởng không phải người, và chuột được trình bày trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Độ tương đồng đối với FLT3 và FLT3L người

	FLT3	FLT3-L ECD
Cyno	96%	95%
Rhesus	97%	96%
Chuột nhắt	85%	73%

Qua độ tương đồng của protein FLT3L chuột nhắt hoàn chỉnh chỉ là 73%, vị trí liên kết của nó với FLT3 được bảo toàn cao giữa các loài. Thực vậy, FLT3L người liên kết và hoạt hóa FLT3 chuột nhắt và ngược lại. FLT3L có độ tương đồng cấu trúc với yếu tố tế bào gốc (SCF hoặc phôi tử KIT) và yếu tố kích thích tạo máu 1 (CSF1), nhưng có độ tương đồng trình tự không đáng kể với các xytokin khác của người. Các thụ thể đối

với hai phối tử này, lần lượt là c-KIT và CSF1R, cũng có các TKR lớp III mà thường tương tác với các chất ức chế FLT3, dẫn đến tính độc ngoài đích không mong muốn ở sử dụng lâm sàng. Với các cân nhắc này, các kháng thể được tìm kiếm cho FLT3L mà không phản ứng chéo với SCF hoặc CSF1, tạo ra sự ức chế đặc hiệu cao con đường FLT3/FLT3L.

Các kháng thể dẫn đầu được chọn và được thử nghiệm bằng cách sử dụng sự chọn lọc xen kẽ trên FLT3-L hòa tan của người và chuột nhắt. Các sàng lọc thông lượng cao hóa sinh sơ cấp được thực hiện bằng cách sử dụng các thử nghiệm phát huỳnh quang được quyết định bởi thời gian đồng nhất (Homogenous Time Resolved Fluorescence - HTRF) hoàn toàn cạnh tranh FLT3/FLT3L người. Tất cả các sự trúng đích vùng kết tinh mảnh-mảnh biến đổi đơn chuỗi (scFv-Fc) được chuyển đổi thành định dạng IgG1 TM và thử nghiệm sàng lọc chức năng có sử dụng sự điều hòa giảm FLT3 trên bề mặt tế bào đích sau đó được sử dụng để khẳng định hoạt tính ức chế của các kháng thể dẫn đầu. Khả năng phản ứng chéo và tính chọn lọc của chuột nhắt và khi đuôi dài đối với FLT3L và sự loại trừ các thành viên khác thuộc họ, như yếu tố tế bào gốc (scf), được khẳng định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA và thử nghiệm chức năng.

Các hợp chất dẫn đầu còn được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm truyền tín hiệu FLT3 ở các dòng tế bào RS4;11 và các tế bào gốc CD133+ sơ cấp của người. Sự liên kết với FLT3L nội sinh được khẳng định bằng cách sử dụng các tế bào T sơ cấp của người. Vị trí gắn kết đặc hiệu và các ái lực gắn kết đặc hiệu được xác định qua lần lượt là Octet và BIAcore. Các dòng vô tính kháng thể dẫn đầu thu được được chọn để tối ưu hóa thêm, như được mô tả dưới đây.

Xác định kháng thể chọn lọc dẫn đầu (C5, B10-11)

Kháng thể dẫn đầu cho nghiên cứu liên kết kháng FLT3L được tạo ra bằng cách sàng lọc thứ nhất các thư viện thực khuẩn thể như được thể hiện trên Fig.1. Các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể Bone Marrow Vaughan (BMV), lá lách kết hợp (CS), thư viện DP47 (DP47), và thư viện kháng thể của người Dyax được sàng lọc (sàng lọc thay thế hoặc sàng lọc cạnh tranh) chống lại FLT3L người (huFLT3L) và/hoặc FLT3L chuột nhắt (muFLT3L). Vấn đề là, FLT3L được sản xuất nội bộ được đánh dấu bằng biotin có sử dụng kit đánh dấu EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific) làm kháng nguyên sàng lọc. Việc sàng lọc được thực hiện trong hai đến ba vòng với các thư viện scFv nội bộ

nư được mô tả (Xiao X *et al.*, 2017 mAbs 542 9, 996-1006 (2017)). Để tăng cường khả năng phản ứng chéo người/cyno, FLT3L tái tổ hợp của người và cyno được sử dụng làm kháng nguyên sàng lọc theo cách xen kẽ trong một số quy trình chọn lọc. Để chọn lọc các kháng thể ức chế sự tương tác FLT3L/FLT3, sàng lọc cạnh tranh được sử dụng đối với một số thí nghiệm. Đối với sàng lọc cạnh tranh, FLT3L người được sử dụng làm kháng nguyên sàng lọc, trong khi FLT3-Fc ở lượng dư (>100X) được sử dụng làm chất rửa giải thực khuẩn thể thay vì trypsin thông thường (Xiao X *et al.* mAbs 542 9, 996-1006 (2017)).

Thư viện BMV được làm giàu 100 lần, thư viện CS 350 lần và thư viện DP47 250 lần; thư viện Dyax không được làm giàu. Chỉ thư viện thực khuẩn thể BMV và Dyax được sàng lọc lần thứ ba thu được sự làm giàu 100 lần của thư viện thực khuẩn thể BMV và sự làm giàu 50 lần của thư viện Dyax so với vòng sàng lọc thứ hai (Fig.1A).

ELISA thực khuẩn thể đơn dòng được thực hiện để ước lượng tỉ lệ phần trăm các thực khuẩn thể đặc hiệu kháng nguyên sau mỗi vòng chọn lọc. Chỉ các chọn lọc mà đạt được ít nhất tỉ lệ dương tính 20% được tiến hành sàng lọc thông lượng cao. Với bộ tiêu chí này, sàng lọc BMV đầu ra ba, cùng với sàng lọc CS và DP47 đầu ra hai được tách dòng vào các vector pSplice V4 và pdLG hoặc pmLG và được chuyển đổi thành định dạng scFv-Fc (Xiao X, *et al.*, PLoS One, 2015 Oct 15;10(10):e0140691. doi: 10.1371/journal.pone.0140691) hoặc IgG (Xiao X, *et al.* mAbs 542 9, 996-1006 (2017)) đối với các sàng lọc chức năng bằng HTRF cạnh tranh.

Đối với sàng lọc chức năng, các tế bào dạng tự do 293 (Thermo Scientific) được chuyển nạp đầu tiên với cấu trúc scFv-Fc hoặc IgG được chuyển đổi từ các kết quả sàng lọc. Dịch nổi thu được được sử dụng trực tiếp trong các thử nghiệm ức chế tương tác FLT3L/FLT3 dựa trên HTRF. Đối với thử nghiệm HTRF, 10 nM FLT3L được đánh dấu biotin, 20 nM streptavidin-europi cryptat (Cisbio), 10 nM FLT3-mFc, và 20 nM kháng thể kháng mFc-A647 (Cisbio) được trộn với 10 μ L dịch nổi chuyển nạp ở tổng thể tích là 20 μ L/giếng trong đĩa Greiner 384 giếng. Đọc tại 665 nm và 620 nm được thực hiện năm phút sau khi trộn và sau đó cứ cách một giờ tới khi kết quả đọc trở nên ổn định. Các tỉ lệ 665 nm/620 nm sau đó được tính. Sự giảm tỉ lệ chỉ ra sự ức chế tương tác FLT3L/FLT3.

Kết quả sàng lọc từ sàng lọc kháng nguyên trực tiếp hoặc xen kẽ được chuyển đổi thành scFv-Fc và nhiều hơn >4,000 khuẩn lạc được chọn để sàng lọc thông lượng cao

(HTS) ở thử nghiệm ức chế tương tác HTRF FLT3L/FLT3-Fc. Mười kháng thể dẫn đầu được xác định, được chuyển đổi IgG TM, và được biểu hiện. Các kháng thể này được thử nghiệm lại ở thử nghiệm ức chế tương tác HTRF thứ hai và mười kháng thể dẫn đầu được xác định. Song song với đó, hơn bảy trăm sự trúng đích từ sàng lọc cạnh tranh được chuyển đổi PmIgG và được biểu hiện ở các tế bào động vật có vú. Các dòng vô tính được chuyển đổi trải qua cùng thử nghiệm ức chế tương tác HTRF FLT3L/FLT3-Fc và hai kháng thể dẫn đầu được xác định (Fig.1B).

Mười kháng thể dẫn đầu từ sàng lọc kháng nguyên xen kẽ và hai kháng thể dẫn đầu từ sàng lọc cạnh tranh được bổ sung và được tinh chế ở các lượng miligam để thử nghiệm thêm. Thử nghiệm thêm này bao gồm các thử nghiệm ức chế tương tác HTRF FLT3L/FLT3-Fc, điều biến giảm thụ thể, và ức chế tải nạp tín hiệu. Các kháng thể dẫn đầu này cũng được trải qua quá trình xác định sàng lọc epitop và ái lực. Đợt sàng lọc này xác định năm kháng thể dẫn đầu mà được nghiên cứu thêm: Dyax3, Dyax5, CAT8, CAT26 và CAT5D9. Các kết quả từ phân tích HTRF cạnh tranh đối với các kháng thể dẫn đầu được thể hiện trên Fig.1C.

Ví dụ 2. Thử nghiệm sàng lọc điều hòa giảm FLT3

Dựa vào sự ghép nối FLT3L, thụ thể FLT3 dime hóa, tự phosphoryl hóa, và hoạt hóa các con đường truyền tín hiệu xuôi dòng. Trong quy trình này, FLT3 bề mặt được nội hóa và được thoái biến. Đặc điểm nội hóa này được khai thác để phát triển thử nghiệm để sàng lọc các dòng vô tính ứng viên kháng FLT3L dẫn đầu. Sự biểu hiện FLT3 bề mặt tế bào có thể được đo bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy và sự ức chế liên kết thụ thể-phối tử có thể được xác định bằng cách định lượng sự thay đổi đối với các mức biểu hiện FLT3 bề mặt tế bào.

Các dòng tế bào RS4;11, EOL-1, MOLM13, và MV4-11 biểu hiện cơ định FLT3. Các tế bào được nuôi cấy trong các điều kiện bình thường và được sàng lọc sự biểu hiện tương đối của FLT3 sau 2 - 24 giờ nuôi cấy. Phép đếm tế bào theo dòng chảy được sử dụng để đo sự biểu hiện FLT3. Vấn đề là, dòng vô tính kháng CD135 (kháng FLT3) có bán trên thị trường BV10A4H2 (Biolegend) được sử dụng trong các thí nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy, và cường độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) được báo cáo ở dạng phép đo sự biểu hiện FLT3. Trong tất cả các thử nghiệm, kháng thể đơn dòng của chuột nhất kháng FLT3L người có bán trên thị trường (R&D) hoặc cấu trúc huFLT3-Fc

nội bộ được sử dụng làm đối chứng dương đối với sự trung hòa có hiệu quả hoạt tính FLT3L.

RS4;11, dòng bệnh bạch cầu cấp (tiền B), thể hiện sự biểu hiện phù hợp và cao FLT3 ở thể nuôi cấy so với các dòng bán sẵn khác được báo cáo để biểu hiện FLT3 (Fig.2A). Sự liên kết trực tiếp của FLT3L với FLT3 bề mặt tế bào được khẳng định bằng cách sử dụng sự pha loãng theo bậc huFLT3L tái tổ hợp (rhuFLT3L) được biotinyl hóa mà, sau 30 phút ủ với các tế bào RS4;11 tại 4°C, có thể được phát hiện được liên kết vật lý với bề mặt tế bào bằng cách sử dụng BV421-streptavidin, sau đó phân tích đếm tế bào theo dòng chảy để xác định cường độ phát huỳnh quang trung bình (Fig.2B).

Cuối cùng, khả năng của rhuFLT3L cảm ứng sự điều hòa giảm phát hiện được của FLT3 bề mặt tế bào trên các tế bào RS4;11 được khẳng định bằng cách ủ tế bào RS4;11 với các dung dịch pha loãng theo bậc của FLT3L tại 37°C trong 2 giờ. Độ ổn định của các điều kiện được đánh giá bằng cách sử dụng 2 nồng độ khác nhau của các tế bào RS4;11 (50,000 (50K) và 100,000 (100K) tế bào). Sự điều hòa giảm của FLT3 bề mặt tế bào được xác định bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD135 được đánh dấu huỳnh quang (dòng vô tính BV10A4H2). Cả hai mật độ tế bào thể hiện sự điều hòa giảm phụ thuộc liều của FLT3 bề mặt tế bào 2 giờ sau khi ủ với huFLT3L. Allophycoxyanin (APC) MFI, chỉ thị của sự biểu hiện FLT3, được giảm 25 lần qua phạm vi của huFLT3L được sử dụng trong thử nghiệm này (Fig.2C). Các kết quả này thể hiện thử nghiệm sàng lọc có hiệu quả trong việc đo sự đáp ứng phụ thuộc liều của FLT3L sinh khả dụng và sẽ thích hợp để thử nghiệm khả năng của các dòng vô tính ứng viên để trung hòa hoạt động của FLT3L. Đáp ứng này khác không đáng kể dù ở 50 hoặc 100 nghìn tế bào được sử dụng trên mỗi giếng.

Tối ưu hóa thử nghiệm sàng lọc

Các điều kiện thử nghiệm sàng lọc còn được tinh chỉnh để xác định các điều kiện nuôi cấy tế bào lý tưởng để đánh giá các dòng vô tính ứng viên kháng FLT3L. Các điều kiện cuối cùng là: 50,000 tế bào RS4;11 trên mỗi giếng được ủ với 96pM rhuFLT3L có hoặc không có các dòng vô tính ứng viên mAb kháng FLT3L trong các môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI) hoàn chỉnh với một phần trăm albumin huyết thanh bò (BSA) trong 2 giờ trong tủ ủ được tạo ẩm đặt tại 37°C, 5%CO₂. Sự điều hòa giảm tiếp theo của sự biểu hiện FLT3 được xác định bằng phép đếm tế bào theo dòng chảy như được đo theo MFI thô hoặc % sự điều hòa giảm. 96 pM rhuFLT3L (EC80) được

chọn vì tại điểm đó pha hàm mũ của đường cong đáp ứng liều được bắt đầu và như vậy đảm bảo ức chế hoạt động bất kỳ của FLT3L sẽ được phản ánh ngay lập tức bởi sự thay đổi mức độ điều hòa giảm FLT3 trên các bề mặt tế bào RS4;11. (Fig.3A). Hiệu quả thử nghiệm được khẳng định bằng cách sử dụng đối chứng kháng thể chuột nhất kháng huFLT3L có bán trên thị trường (MAB608, R&D Systems) (Fig.3B). Đối với khả năng phản ứng chéo loài của FLT3 với phối tử của nó, thử nghiệm này có hiệu quả để đánh giá các dòng vô tính kháng FLT3L người, cyno, và loài gặm nhấm, thay vì dòng tế bào người. Đối với FLT3L chuột nhất, EC80 là 36 pM.

Ví dụ 3. Hoạt tính trung hòa của kháng thể chọn lọc dẫn đầu kháng FLT3L hòa tan

Dựa vào sự ghép nối của FLT3L với FLT3, thụ thể này dime hóa, tự phosphoryl hóa, và nhân lên cat-xet truyền tín hiệu khi được nội hóa. Quy trình này, được đo bằng sự điều hòa giảm FLT3, có thể được ức chế bởi các kháng thể mà liên kết với FLT3L. Do đó, các kháng thể chọn lọc dẫn đầu được thử nghiệm về khả năng của chúng ức chế quá trình điều hòa giảm FLT3 trên các tế bào RS4;11 bằng sự liên kết với FLT3L hòa tan (sFLT3L) của người, chuột nhất, hoặc khỉ đuôi dài (cyno). Thử nghiệm sàng lọc được tối ưu hóa này được sử dụng để thử nghiệm khả năng trung hòa của các kháng thể chọn lọc dẫn đầu. Như được mô tả, các tế bào RS4;11 (50,000 tế bào trên mỗi giếng) được ủ trong hai giờ trong RPMI hoàn chỉnh với một phần trăm BSA trong sự có mặt của FLT3L người hoặc cyno (96 pM), hoặc sFLT3L chuột nhất (36 pM). Các dung dịch pha loãng theo bậc của mỗi dòng vô tính được bổ sung và cấu trúc FLT3-Fc hòa tan hoặc kháng thể của người kháng FLT3L bán sẵn được sử dụng làm đối chứng dương. Sự biểu hiện FLT3 trên các tế bào RS4;11 được xác định bằng cách sử dụng phép đếm tế bào theo dòng chảy và được báo cáo dưới dạng MFI.

Như được thể hiện trên Fig.4A và 4B, tất cả các kháng thể dòng vô tính dẫn đầu đều chứng tỏ khả năng ức chế cả sFLT3L người và cyno ở một ngưỡng nào đó. Tất cả CAT8, CAT26, Dyax3, và Dyax5 đều thể hiện sự ức chế tương tự nhau sFLT3L người và sFLT3L của khỉ cyno. Mặc dù được trình bày trong Bảng 3 dưới đây, các giá trị IC₅₀ đối với CAT8, CAT26, Dyax3, và Dyax5 thiếu tính giá trị vì IC_{MAX} chưa bao giờ đạt đến.

Ngược lại, CAT5D9 đạt được IC_{MAX} và tạo ra đường cong dạng hình chữ S mong đợi từ sự ức chế FLT3L (Fig.4A và 4B). Các giá trị IC₅₀ đối với CAT5D9 thể hiện trong

Bảng 3 chỉ ra khả năng phản ứng chéo với FLT3L người và cyno, nhưng không phản ứng chéo với FLT3L chuột (Fig.4C).

Bảng 3. IC₅₀ (nM) của các kháng thể chọn lọc dẫn đầu chống lại 96 pM sFLT3L người, cyno hoặc chuột nhắt.

	Người	Cyno	Chuột nhắt
R&D	0,04	0,10	0,12
CAT8	43,5	3001	N/A
CAT26	618	2584	N/A
DYAX3	54,8	3066	1489
DYAX5	245	6015	354
CAT5D9	385	564	N/A

Ví dụ 4. Khả năng liên kết của kháng thể chọn lọc dẫn đầu kháng FLT3L bề mặt tế bào

FLT3L được biểu hiện dưới dạng protein màng tế bào và tuần hoàn dưới dạng protein hoà tan khi được phân tách. Cả hai dạng liên kết màng và hoà tan có hoạt tính sinh học. Để phong bế có hiệu quả con đường truyền tín hiệu được trung gian bởi FLT3, các ứng viên kháng thể dẫn đầu nên liên kết với cả dạng hoà tan và liên kết màng của FLT3L.

Phù hợp với điều này, liên kết bề mặt tế bào với FLT3L người, cyno, và chuột được đánh giá bằng cách chuyển nạp các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) với protein có chiều dài đầy đủ tương ứng đối với mỗi loài. Các dòng vô tính ứng viên được ủ với các dòng tế bào biểu hiện FLT3L trong 1 giờ tại 4 °C trước khi được rửa hai lần để loại bỏ kháng thể không liên kết. Sau đó các tế bào được ủ với pAb để phát hiện thứ cấp kháng IgG người được đánh dấu PE để định lượng kháng thể liên kết mà được đo bằng phân tích đếm tế bào theo dòng của tín hiệu PE. Cấu trúc huFLT3-Fc, trên xương sống IgG người, được sử dụng làm chất phản ứng đối chứng dương cho sự biểu hiện FLT3L vì nó phản ứng chéo với phôi tử cyno và chuột nhắt, ngoài ra phôi tử người.

Tất cả các kháng thể chọn lọc dẫn đầu liên kết FLT3L người (Fig.5A), và tất cả trừ DYAX5 liên kết với FLT3L của cyno (Fig.5B). Ngược lại, chỉ Dyax5, và Dyax3 ở quy mô nhỏ hơn, thể hiện khả năng phản ứng chéo với FLT3L chuột nhắt (Fig.5C).

Do đó, tất cả các kháng thể chọn lọc dẫn đầu đều thể hiện khả năng liên kết FLT3L chéo loài, mặc dù với hiệu quả khác nhau. Vì sự chênh lệch là rõ ràng ở mức độ chiếm giữ thụ thể đối với mỗi dòng, cả EC₅₀ và sự chiếm giữ tối đa là rõ ràng (được thể hiện là

tỉ lệ phần trăm so với FLT3-Fc) và được tính ở đánh giá cuối cùng. Các kết quả được trình bày trong Bảng 4 đối với FLT3L người, cyno, và chuột nhất được biểu hiện trong tế bào CHO.

Bảng 4. EC50 (nM) và sự chiếm giữ tối đa (% so với FLT3-Fc)

	Người		Cyno		Chuột nhắt	
	EC50	%Ocp	EC50	%Ocp	EC50	%Ocp
FLT3-Fc	0,09	100	0,6	100	0,14	100
CAT8	0,08	60	9,0	32	N/A	N/A
CAT26	0,19	46	1,1	96	N/A	N/A
DYAX 3	0,27	33	1,8	35	0,39	16
DYAX 5	0,66	28	N/A	N/A	0,11	51
CAT 5D9	0,157	40	1,1	100	N/A	N/A

Ví dụ 5. Hoạt tính liên kết của kháng thể chọn lọc dẫn đầu với FLT3L nội sinh của người

FLT3L được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào T sơ cấp sau khi được kích thích bởi các xytokin chuỗi γ , cụ thể là IL-2, IL-7, hoặc IL-15, độc lập là sự gắn kết TCR. Trong Ví dụ 4, các ứng viên kháng thể dẫn đầu chứng tỏ khả năng liên kết với các tế bào CHO được chuyển nạp với protein FLT3L người. Bước tiếp theo là đảm bảo rằng chúng có thể liên kết với FLT3L nội sinh từ dòng tế bào người sơ cấp. Do đó, các ứng viên kháng thể dẫn đầu được thử nghiệm về khả năng của chúng liên kết với huFLT3L trên các tế bào T được kích thích bởi IL-2 thu được từ người cho.

Để cảm ứng sự biểu hiện FLT3L trên bề mặt tế bào, các tế bào T người vừa mới được phân lập được kích thích bằng 50 ng/mL IL-2 trong sự vắng mặt của kháng thể kháng CD3 (sự hoạt hoá tế bào T bằng kháng thể kháng CD3 sẽ dẫn đến sự toả ra của FLT3L từ bề mặt tế bào) trong 5 ngày. Sau thời gian này, sự biểu hiện trên tế bào T được khẳng định bằng cách sử dụng cấu trúc FLT3-Fc người (Fig.6A). Các dung dịch pha loãng theo bậc của mỗi dòng vô tính sau đó được ủ với các tế bào T được kích thích bằng IL-2 (100K/giếngl) trong 30 phút tại 4°C. Kháng thể dư được loại bỏ bằng cách rửa bằng chất đệm và các kháng thể liên kết bề mặt được phát hiện bằng kháng thể kháng IgG người được đánh dấu APC. Tất cả các dòng vô tính dẫn đầu, ngoại trừ CAT5D9, liên kết với FLT3L nội sinh trên tế bào T sơ cấp của người (Fig.6B). CAT5D9 liên kết với FLT3L nội sinh ban đầu không phát hiện được do ái lực liên kết của nó thấp. Tuy nhiên, khi CAT5D9 được dime hoá với kháng thể kháng IgG (được đánh dấu APC) trước khi ủ với

các tế bào T, ái lực của nó được tăng lên đáng kể để kháng định liên kết phụ thuộc liều với FLT3L nội sinh (Fig.6C).

Ví dụ 6. Hoạt tính ức chế FLT3L bề mặt tế bào của kháng thể chọn lọc dẫn đầu

Khả năng của các kháng thể chọn lọc dẫn đầu liên kết với FLT3L bề mặt tế bào tạo ra sự thâm nhập hạn chế đối với sự ức chế hoạt động của phối tử. Lý tưởng là, liên kết của các kháng thể chọn lọc dẫn đầu với FLT3L bề mặt tế bào nên giảm hoạt tính truyền tín hiệu của phức hợp phối tử-thụ thể.

Để kiểm tra điều này, 1,000 tế bào CHO biểu hiện huFLT3L/giếng được cấy qua đêm để kết dính. Ngày tiếp theo, môi trường nuôi cấy CHO được loại bỏ, các tế bào được rửa nhẹ bằng RPMI và các dung dịch pha loãng theo bậc của kháng thể được bổ sung trong 30 phút trước khi bổ sung FLT3+ RS4;11 (100K/giếng). Sau 2 giờ ủ tại 36°C, RS4;11 tế bào được chuyển nạp vào đĩa mới 96 giếng trên đá để nhuộm để phát hiện sự điều hoà giảm FLT3. Ngoài nhuộm được sử dụng cho các thử nghiệm điều hoà giảm RS4;11 FLT3 tiêu chuẩn, kháng thể kháng CD19 được bao gồm để loại trừ các tế bào CHO tạp nhiễm bất kỳ. Sự điều hoà giảm FLT3 được đo bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Ứng viên kháng thể dẫn đầu phong bế thử nghiệm chứng tỏ rằng tất cả các kháng thể chọn lọc dẫn đầu đều có khả năng ức chế FLT3L bề mặt tế bào ở mức độ nào đó, qua tất cả các ứng viên thể hiện hoạt tính tương đối thấp so với kháng thể đối chứng thương mại, phản ánh ái lực thấp (Fig.7).

Ví dụ 7. Tác dụng ức chế truyền tín hiệu FLT3 được cảm ứng bởi FLT3L của dòng vô tính dẫn đầu

Quá trình tự phosphoryl hoá của FLT3 dẫn đến hoạt hoá mạng lưới tải nạp tín hiệu chủ yếu qua PI3K và cat-xet RAS mà đến lượt nó hoạt hoá AKT (protein kinaza B, PKB), MEK, và ERK. Cat-xet truyền tín hiệu này cuối cùng dẫn đến sự phiên mã các gen mà thúc đẩy sự sống sót và tăng sinh của tế bào. Để kháng định các ứng viên kháng thể dẫn đầu đang phong bế sự truyền tín hiệu xuôi dòng của FLT3 bởi FLT3L ở các tế bào sơ cấp của người, quá trình phosphoryl hoá của ERK và MEK ở tế bào gốc CD133+ được đo bằng chất dung giải tế bào toàn phần Mesoscale MSD Phospho-ERK1/2 và MEK1/2 quang lân.

Sự đánh giá hiệu lực phân tích được thiết lập bằng cách sử dụng dòng tế bào RS4;11, với sự hoạt hoá ERK được cảm ứng bởi FLT3L theo cách phụ thuộc liều. (Fig.8A). Các dung dịch pha loãng theo bậc của FLT3L được ủ với 300,000 tế bào RS4;11 trên mỗi giếng trong 8 phút tại 36°C. Các tế bào sau đó được thu hoạch, được dung giải, và được phân tích đối với ERK được phosphoryl hoá như hướng dẫn của nhà sản xuất. Vì với các phân tích sớm hơn, EC80 cho sự hoạt hoá FLT3L của ERK được xác định (476 pM) và được sử dụng để thử nghiệm hoạt tính ức chế của các dòng vô tính kháng thể kháng FLT3L ứng viên. Hiệu quả thử nghiệm được khẳng định bằng cách sử dụng kháng thể chuột kháng FLT3L người có bán trên thị trường làm đối chứng dương cho quá trình trung hoà hoá có hiệu quả (Fig.8B).

Sử dụng các tham số được thiết lập này, các dòng vô tính dẫn đầu được thử nghiệm có sử dụng các tế bào gốc CD133+ sơ cấp được nhân rộng *in vitro* mà được đánh giá hiệu lực đối với sự biểu hiện FLT3 trước khi sử dụng. Các dòng vô tính dẫn đầu được ủ trước bằng 476 pM FLT3L trong 30 phút, sau đó được bổ sung vào các tế bào gốc CD133+. Sau khi ủ 8 phút tại 36°C, các tế bào được thu hoạch, được dung giải và được phân tích đối với ERK và MEK được phosphoryl hoá bằng cách sử dụng các thử nghiệm MSD như hướng dẫn của nhà sản xuất. Kháng thể chuột kháng FLT3L người có bán trên thị trường được sử dụng làm đối chứng dương.

Tất cả các dòng vô tính ứng viên đều thể hiện rõ ràng là ức chế sự cảm ứng MEK (Fig.9A) và ERK (Fig.9B) bởi FLT3L. Tuy nhiên, chỉ CAT5D9 đạt được IC_{MAX} và thể hiện đường cong đáp ứng liều dạng hình chữ S như mong đợi (Bảng 5). Kết hợp lại, các kết quả thể hiện trong các ví dụ gợi ý rằng CAT5D9 là dòng vô tính tốt nhất trong số các kháng thể chọn lọc dẫn đầu, và nên xử lý để tối ưu hoá có điều kiện để đánh giá sinh lý của ái lực và vị trí liên kết epitop.

Bảng 5. IC₅₀ (nM) chống lại 0,476 nM FLT3L

	MEK	ERK
R&D	0,19	0,19
CAT8	7,4e ⁶	0
CAT26	2,1e ¹⁷	2,4e ³⁸
DYAX3	93	2,4
DYAX5	2,4e ⁷	25
CAT5D9	181	187

Ví dụ 8. Kiểm chứng độ đặc hiệu đích

CAT5D9 thể hiện rõ ràng là kháng thể chọn lọc dẫn đầu tốt nhất bằng việc đánh giá hoạt động ở các thử nghiệm sinh học. Liên kết epitop Octet được sử dụng để xác định vùng liên kết CAT5D9 so với thụ thể FLT3.

Liên kết epitop được sử dụng để xác định các kháng thể dẫn đầu có thụ thể FLT3 trên FLT3L. Sàng lọc được thực hiện trong ba pha. Ở pha I, sự liên kết của Biotin-FLT3L với mẫu dò avidin được thực hiện. Ở pha II, các ứng viên riêng rẽ được liên kết với Biotin-FLT3L. Ở pha ba III, mỗi kháng thể trong số các kháng thể thử nghiệm được bổ sung vào kháng thể pha II. Liên kết bổ sung bất kỳ được phát hiện là dấu hiệu của hai kháng thể có vị trí liên kết không cạnh tranh với FLT3L đích. Chỉ chất đệm, không có kháng thể được bổ sung tại pha III và FLT3-Fc được sử dụng lần lượt làm đối chứng âm và dương. Nếu chỉ đệm được bổ sung tại pha III, các động lực phân ly thu được của kháng thể với FLT3L phản ánh ái lực sẵn có của dòng vô tính đối với đích.

Chỉ CAT5D9, được bổ sung tại các nồng độ 1x và 2x, liên kết bị ức chế bởi FLT3-Fc, gợi ý rằng CAT5D9 đã hướng đến vị trí đích mong muốn trên FLT3L (tức là, nó có chung cùng epitop hoặc epitop chồng lấp như FLT3-Fc) (Fig.10A). Quan trọng là, ngược lại, bốn dòng vô tính ứng viên còn lại không bị ức chế bởi CAT5D9, gợi ý rằng chúng đã liên kết với epitop FLT3 khác (Fig.10A). Ngoài ra, tốc độ phân ly nhanh chóng khi chỉ mình chất đệm được bổ sung củng cố cho thí nghiệm trước đó gợi ý rằng ái lực của CAT5D9 là thấp (nghĩa là hiệu quả của nó đối với hiệu lực được cải thiện với sự tối ưu hoá là cao). Phù hợp với điều này, khi mỗi dòng vô tính trong số 4 dòng vô tính còn lại được liên kết ở Pha II (CAT8 thể hiện là đồ thị đại diện thể hiện trên Fig.10B), liên kết bổ sung của CAT5D9 và FLT3-Fc có thể được phát hiện ở Pha III, phản ánh các vị trí liên kết khác nhau của chúng. Cũng được quan sát thấy rằng mỗi dòng vô tính trong số 4 dòng vô tính khác được sàng lọc với nhau và khi chỉ mình chất đệm được bổ sung, tốc độ phân ly của chúng là tương đối chậm.

Cùng với nhau, các số liệu này khẳng định rằng chỉ CAT5D9 cạnh tranh trực tiếp với FLT3 tại vùng liên kết FLT3L và thể hiện rõ ràng là có liên kết ái lực thấp, gợi ý rằng nó có tiềm năng để tối ưu hoá. Mặt khác, các dòng vô tính còn lại đều chạm đến vị trí mà, dựa vào số liệu hoạt động, không cạnh tranh trực tiếp với FLT3. Tốc độ phân ly chậm của chúng gợi ý rằng chúng đã liên kết với ái lực đáng kể với FLT3L và có ít tiềm năng để tối

ưu hoá. Sự ức chế ban đầu thể hiện ở các thử nghiệm sàng lọc ban đầu có khả năng do sự cản trở không gian hoặc phong bế một phần của vị trí liên kết thụ thể.

Ví dụ 9. Động lực học liên kết Biacore (C9)

Phân tích Biacore được sử dụng để xác định các động lực học liên kết của các kháng thể dẫn đầu và khẳng định số liệu Octet gợi ý rằng CAT5D9 có ái lực kém đối với FLT3L. Các động lực của mảnh gắn kết kháng nguyên kháng FLT3L và FLT3L người và khi đuôi dài được xác định ở CAT8, CAT26, Dyax3, và Dyax5 của người. Ngoài ra, các động lực học liên kết của mảnh gắn kết kháng nguyên CAT5D9 được xác định đối với cả FLT3L người và khi đuôi dài.

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 6. Hằng số cân bằng phân ly (K_D) là lớn hơn 50x ở CAT5D9 người và khi đuôi dài so với các kháng thể dẫn đầu còn lại. CAT5D9 thể hiện chất lượng thấp, các động lực phân ly nhanh (k_{off} = 70,72, cyno = 70,66). Kết quả là, dữ liệu liên kết ở trạng thái ổn định thu được khi kiểm tra dữ liệu động lực học K_D . Sự liên kết ở trạng thái ổn định củng cố cho kết quả của liên kết động lực học, thể hiện các giá trị tương tự (Bảng 3). Các dữ liệu này khẳng định ái lực thấp của CAT5D9 và tiềm năng của nó đối với hiệu quả được cải thiện với sự tối ưu hoá.

Bảng 6. Các động lực học liên kết của các kháng thể dẫn đầu kháng FLT3L.

Các Fab kháng FLT3L	Các loại FLT3L	k_{on} (x E +5/Mili giây)	k_{off} (x E -3/giây)	K_D (kin: k_{off}/k_{on}) (nM)	K_D (trạng thái ổn định) (nM)
CAT8	người	6,28	5,56	8,85	NA
CAT26	người	1,91	0,84	4,37	NA
Dyax3	người	0,66	1,23	18,69	NA
Dyax5	người	2,28	5,01	21,96	NA
CAT5D9	người	0,61	70,72	1157	1595
CAT5D9	cyno	0,61	70,66	1157	1607

Fab = mảnh gắn kết kháng nguyên; Hu = người; cyno = khi đuôi dài; k_{on} = hằng số liên kết của liên kết; K_{off} = hằng số phân ly liên kết; K_D = hằng số cân bằng phân ly

Ví dụ 10. Sự vắng mặt của khả năng phản ứng chéo CAT5D9

Ngoài khẳng định liên kết CAT5D9 với epitop FLT3L chính xác, cũng quan trọng để khẳng định rằng sẽ không liên kết với các thể tương đồng cấu trúc gần của FLT3L, yếu tố tế bào gốc (SCF) và yếu tố kích thích tạo máu (CSF1). Cả hai yếu tố đều là phối tử đối với thụ thể protein tyrosin kinaza (c-Kit và CSFR1, tương ứng) mà là các cú đánh ngoài đích sơ cấp đối với các chất ức chế FLT3 phân tử nhỏ hiện tại được sử dụng ở thiết lập

ung thư học để quản lý bệnh ác tính xuất hiện từ sự đột biến FLT3-IT9D được hoạt hoá cơ định.

Để thử nghiệm điều này, đĩa ELISA được phủ bằng 2 μ g SCF hoặc CSF1 người tái tổ hợp. Sau khi rửa, đĩa được phong bế bằng 3% sữa trong nước muối đệm tris-phosphat (TPBS) và các kháng thể dẫn đầu được bổ sung trong sự pha loãng theo bậc (x2), bắt đầu tại 50 μ g/ml. Sau khi ủ, kháng thể không liên kết được loại bỏ bằng cách rửa và kháng thể đã liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG-HRP người kết hợp với cơ chất TMB để phát triển màu. pAb dê kháng SCF và mAb chuột kháng CSF1 có bán trên thị trường được sử dụng làm các đối chứng liên kết dương.

Không có kháng thể chọn lọc dẫn đầu nào phản ứng chéo với huSCF (Fig.11A) hoặc huCSF1 (Fig.11B). Quan trọng là, các kết quả này chứng tỏ rằng tính chọn lọc của CAT5D9 ở liên kết chỉ với FLT3L mà không liên kết với các phân tử phối tử TKR tương tự về mặt cấu trúc.

Ví dụ 11. Tối ưu hóa ái lực của CAT5D9

Như được thảo luận trên đây, CAT5D9 liên kết với FLT3L với ái lực thấp và do đó chứng tỏ rằng có tiềm lực để có hiệu quả được cải thiện với sự tối ưu hoá ái lực. KD mong muốn của 300 pM được thiết lập dựa vào việc lập mô hình PK. Đột tối ưu hoá được thiết kế để đạt được tối đa là sự cải thiện KD 10,000 lần.

Sau khi tạo dòng mầm các khung, hai chiến lược song song được sử dụng -gây đột biến dè dặt và gây đột biến khối. Gây đột biến dè dặt đột biến mọi vị trí ở cả 6 CDR đối với tất cả 20 axit amin, cùng một lúc. Các dòng vô tính được sàng lọc sử dụng phương pháp thông lượng cao và các đột biến có ích riêng rẽ được kết hợp với nhau. Gây đột biến khối đột biến các đoạn liên tiếp gồm 5 đến 6 vị trí trong các CDR ở mô hình chồng lấp, và các thư viện khoảng 1E6 đến 1E7 dòng vô tính thu được được làm giàu đầu tiên bằng cách sử dụng các kỹ thuật sàng lọc biểu hiện và sau đó được sàng lọc bằng các phương pháp thông lượng cao.

Sau vòng tối ưu hoá thứ nhất, 30 dòng vô tính từ đột biến dè dặt và 24 dòng vô tính từ gây đột biến khối được thử nghiệm ở định dạng IgG. Sử dụng các kỹ thuật lập mô hình phân tử, được xác định và kết hợp các đột biến tốt nhất thu được dòng vô tính 5D9-Dòng vô tính 6, mà đạt được KD là 1610 nM (được đo bằng Biacore), sự cải thiện ái lực

700x so với 5D9 gốc (xem Bảng 7). Ái lực của các dòng vô tính dẫn đầu SC4017 và AM40 vượt quá tiêu chí CDTP (< 300 pM). Cả hai dòng vô tính được tối ưu hoá thêm đều liên kết với và trung hoà FLTL bề mặt tế bào nội sinh, liên kết FLT3L nội sinh hoà tan ở huyết thanh người, và liên kết với và trung hoà FLT3L của khí cyno.

Bảng 7. Tổng hợp dữ liệu liên kết đối với các dòng vô tính dẫn đầu từ quá trình tối ưu hóa CAT5D9.

		<u>kon</u> (1E+5/Mili giây)	<u>koff</u> (1E-4/giây)	<u>K_D</u> (pM)
Thụ thể hFLT3/hFLT3L		3,6	81,2	22,340
5D9 gốc/hFLT3L	Gốc	0,6	707,2	1,157,000
5D9-C06/hFLT3L	Vòng 1	5,5	8,8	1,610
AM40/hFLT3L	Vòng 2	10,9	1,8	170
AM40/cFLT3L	Vòng 2	26,6	1,7	63
SC4017/hFLT3L	Vòng 2	14,5	0,5	37
SC4017/cFLT3L	Vòng 2	58,4	0,5	8,8

Sự tăng ái lực này giải thích sự cải thiện hoạt tính chức năng >1000 lần như được đo bởi sự điều hoà giảm FLT3 trên tế bào RS4;11 (Fig.12A) bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả cho sự chọn lọc dòng vô tính sớm hơn.

Để đạt được ái lực là 300 pM, vòng tối ưu hoá ái lực thứ hai được thực hiện. Dòng vô tính 6 (C06) được đột biến, và các thể đột biến tạo thành được sàng lọc theo cách tương tự như vòng tối ưu hoá thứ nhất. Là một phần của sàng lọc pha ở gây đột biến khối, Dòng 6 được sử dụng ở định dạng IgG làm yếu tố cạnh tranh để làm giàu các dòng vô tính với ái lực về cơ bản cao hơn. Dòng vô tính tốt nhất từ sự gây đột biến khối là dòng AM40 với $K_D=170$ pM. Một số dòng vô tính kết hợp của AM40 và các đột biến từ vòng gây đột biến đề dặt thứ hai được kết hợp và tạo ra một dòng vô tính siêu tốt, SC4017 có $K_D=37$ pM. Ái lực cao hơn này lại được phản ứng ở sự ức chế hoạt động được cải thiện FLT3L như được chứng tỏ bởi sự điều hoà giảm FLT3 trên các tế bào RS4;11 (Fig.12B). Tuy nhiên, phân tích thêm cho rằng hiệu quả siêu tốt của SC4017 là do tryptophan đơn bổ sung được kết hợp vào ngay liền kề với vùng liên kết. Điều này thể hiện nguy cơ phát triển thu được độ nhạy của các gốc tryptophan được tiếp xúc với quá trình oxy hoá. Đối với lý do này, AM40 được chọn lọc làm dòng vô tính IgG dẫn đầu. Mặc dù ái lực thấp hơn một chút (170 pM) so với SC4017 (37 pM), AM40 vẫn vượt quá đích ban đầu là 300 pM và được xác định là có nguy cơ thấp hơn đối với sự phát triển.

Cuối cùng, các tác giả sáng chế khẳng định cả hai dòng vô tính đều có thể trung hoà FLT3L nội sinh trên bề mặt tế bào bằng cách phát triển thử nghiệm sử dụng các tế bào T sơ cấp được kích thích bởi 20 ng/ml IL-7 trong 7 ngày (được phát hiện ra là quy trình có hiệu quả nhất để cảm ứng sự biểu hiện FLT3L bề mặt tế bào trên các tế bào T sơ cấp) ở sự đồng nuôi cấy với FLT3+ RS4;11. Ngắn gọn là, các tế bào CD4+T được kích thích bởi IL-7 được ủ với các tế bào RS4;11 qua đêm tại tỉ lệ là 15:1 (sự đáp ứng tỉ lệ liều thể hiện trên Fig.13A), một mình hoặc trong sự có mặt của dung dịch pha loãng theo bậc của các dòng vô tính ứng viên, SC4017 và AM40. Sự điều hoà giảm FLT3 được đo bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng như được mô tả trước đó. Cả hai dòng vô tính đều thể hiện sự ngăn chặn hoàn toàn sự điều hoà giảm FLT3 trên tế bào RS4;11 ở các nồng độ trên 1 nM (Fig.13B) với hiệu quả tương tự.

Ví dụ 12. Trung hòa FLT3L của động vật linh trưởng khỏe mạnh không phải là người

Để xác định độ an toàn và độ bền của AM40 trong việc trung hoà FLT3L, nghiên cứu tính độc được thực hiện trong khoảng thời gian một tháng bằng cách sử dụng liều lặp lại một lần mỗi tuần. Thời gian theo dõi điều trị tám tuần được bao gồm để theo dõi tiến triển của con vật. Phác thảo nghiên cứu này được mô tả trên Fig.14. Như được thể hiện trên Fig.15A, các mức FLT3L tự do hoà tan được giảm mạnh sau sử dụng lần thứ nhất AM40 tại tất cả các liều, nhưng tại 0,3 mg/kg là không đủ để duy trì sự gắn kết đích trong đủ một tuần. Các nhóm dùng liều cao hơn (1 mg/kg và 30 mg/kg) thể hiện sự gắn kết đích cạnh tranh (được phản ứng dưới dạng FLT3L tự do hoà tan dưới BLQ) thống nhất qua ngày 57, tại đó chỉ ra các mức FLT3L hoà tan trở lại đường cơ sở ở nhóm 1,0 mg/kg.

Tương tự, đo tần suất DC tuần hoàn (% tổng các tế bào CD45+ được phát hiện qua phép đếm tế bào theo dòng chảy và biểu hiện là phần trăm của các mức đường cơ sở trước nghiên cứu) thể hiện sự giảm ổn định tần suất CD1c+ (cổ điển) DC và DC dạng tương bào qua ngày 22 ở nhóm 1,0 và 30 mg/kg (Fig.15B). Tần suất CD1c+ DC tuần hoàn vẫn giữ sự ức chế qua ngày 50 và ngày 85 lần lượt trong nhóm 1 mg/kg và nhóm 30 mg/kg. Tần suất pDC tuần hoàn vẫn giữ sự giảm qua ngày 71 và ngày 85 lần lượt trong nhóm 1 mg/kg và nhóm 30 mg/kg. Sự phục hồi của các quần thể DC ở nhóm 1,0mg/kg tương quan với sự hồi phục của FLT3L huyết thanh tự do mà xảy ra tại thời điểm nào đó trong khoảng từ ngày 57 đến 85. Các kết quả này chỉ ra rằng các quần thể DC giảm khi

FLT3L được trung hoà bởi AM40 nhưng quay trở lại đường cơ sở nhanh chóng khi FLT3L tự do trở nên sẵn có.

Ví dụ 13. Biểu hiện FLT3L tương quan với mức độ nghiêm trọng của bệnh lupus ban đỏ hệ thống

SLE là bệnh tự miễn được đặc trưng bởi chứng viêm mạn tính và có thể ảnh hưởng đến hầu hết cơ quan bất kỳ trong cơ thể và ở tất cả các nhóm tuổi. SLE thường tác động đến khớp, da, thận, phổi, tim, và não. Với vai trò truyền tín hiệu tiền viêm của nó, sự biểu hiện của FLT3L ở đối tượng bị SLE được điều tra để tìm kiếm mối tương quan giữa các mức FLT3L và mức độ nghiêm trọng của bệnh. Các nghiên cứu đã công bố đến nay chủ yếu dựa vào các mức FLT3L huyết thanh khi thu được các mối tương quan với bệnh và trong khi đây là phép đo thực tiễn nhất trong các nghiên cứu lâm sàng, có nhược điểm cố hữu là sự phản ánh sản xuất trừ đi những gì được hấp thu bởi DC và các tế bào tiêu thụ FLT3L được hoạt hoá khác. Trong các nghiên cứu về viêm, số lượng các tế bào biểu hiện FLT3 và sự tiêu thụ FLT3L của chúng sẽ thay đổi mạnh và điều này có khả năng giải thích các biến đổi trong việc phát hiện giữa các nghiên cứu và tại sao không có khi được thể hiện mối tương quan trực tiếp giữa FLT3L huyết thanh và các kết quả lâm sàng của sự tiến triển bệnh. Được biết rằng các tế bào T là một trong những nguồn FLT3L chiếm ưu thế trong các nghiên cứu viêm, các tác giả sáng chế đã phát triển thử nghiệm để đo sự biểu hiện FLT3L trực tiếp trên bề mặt tế bào T sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại biên (PBMC) được phân lập mới.

Huyết thanh và PBMC được phân lập từ các đối tượng bị SLE (n=24) và các đối tượng cho khoẻ mạnh (HD; n=15). FLT3L huyết thanh được đo bằng ELISA (R&D Systems) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và tần suất của các tế bào CD4+ T biểu hiện FLT3L được xác định sử dụng phân tích đếm tế bào theo dòng chảy được phát triển nội bộ, với FLT3L được phát hiện bằng dòng vô tính kháng FLT3L được đánh dấu huỳnh quang, MAB608 (R&D Systems). Chỉ số hoạt tính bệnh SLE (SLEDAI) được sử dụng để xác định hoạt tính lupus ở cùng các đối tượng. Mức ý nghĩa được xác định bằng cách sử dụng mối tương quan Mann Whitney và Spearman đối với phép so sánh quần thể khoẻ mạnh so với quần thể bị bệnh với SLEDAI tương ứng.

Phù hợp với bộc lộ trước đó, các mức FLT3L huyết thanh được tăng cao ở các đối tượng cho SLE so với HD ($p < 0,05$; Fig.16A) nhưng không có mối tương quan có ý nghĩa

nào được phát hiện với hoạt tính bệnh (SLEDAI) ($p < 0,07$; Fig.16B). Ngược lại, khi sự sản sinh FLT3L được đo bởi tần suất các tế bào CD4+ T biểu hiện FLT3L, có sự tăng cao đáng kể các đối tượng cho SLE so với HD ($p < 0,0001$; Fig.16C) và mối tương quan mạnh với các kết quả SLEDAI ($r = 0,7045$; $p < 0,0001$; Fig.16D). Dữ liệu này gợi ý rằng việc đo sự biểu hiện FLT3L trên tế bào T có thể đặc biệt thích hợp ở nghiên cứu bệnh.

Dựa vào việc phát hiện mối tương quan giữa các kết quả SLEDAI và các tế bào CD4+ T biểu hiện FLT3L, tập hợp con của các tế bào CD4+ được kiểm tra để xác định nếu (1) sự biểu hiện FLT3L qua tập hợp con các tế bào CD4+ T từ đối tượng bị bệnh SLE là phù hợp với sinh học đã biết và (2) nếu sự biểu hiện tập hợp con tương quan với các kết quả SLEDAI. Tập hợp con CD4+ được nghiên cứu là các tế bào T bầm sinh ($T_{bầm\ sinh}$), các tế bào ghi nhớ yếu tố tác động (T_{EM}), và các tế bào ghi nhớ trung tâm (T_{CM}). Cùng các quy trình và các mức ý nghĩa, như được mô tả trên đây, được sử dụng cho nghiên cứu sự biểu hiện và các mối tương quan.

Sự biểu hiện FLT3L qua các tập con của tế bào CD4+ T là phù hợp với sinh học đã biết về sự biểu hiện FLT3L. Cụ thể là, sự biểu hiện FLT3L thường không được quan sát thấy trên các tế bào $T_{bầm\ sinh}$ ở HD, dù cho có sự đánh giá nhỏ, nhưng có ý nghĩa ở các đối tượng cho SLE (Fig.17A, Phía trên). Sự biểu hiện FLT3L trên các tế bào $T_{bầm\ sinh}$ từ các đối tượng cho SLE có mối tương quan có ý nghĩa với các kết quả SLEDAI (Fig.17A, Phía dưới; $r = 0,6629$; $p = 0,0004$). Quan trọng là, sự biểu hiện FLT3L được quan sát thấy trên cả CD4+ T_{EM} bị HD và SLE, như được mong đợi ở quần thể này mà chụp các tế bào T hoạt hoá hiện tại mà đã được tiếp xúc với xytokin chuỗi γ đã biết là cảm ứng sự biểu hiện FLT3L. Mặc dù sự đáp ứng này được quan sát thấy ở cả đối tượng cho HD và SLE, sự tăng cao đáng kể ở đối tượng cho SLE và lại nữa, sự biểu hiện ở đối tượng cho SLE có tương quan với SLEDAI (Fig.17B, Phía dưới; $r = 0,6201$; $p = 0,0012$). Cuối cùng, sự biểu hiện FLT3L giảm ở các tế bào CD4+ T khoẻ mạnh vì chúng biệt hoá từ T_{EM} thành T_{CM} , nhưng vẫn được duy trì ở PBMC của các đối tượng cho SLE (Fig.17C, Phía trên; $p < 0,0001$). Lại nữa, mối tương quan có ý nghĩa hiện có giữa tần suất của các tế bào FLT3L+ T và SLEDAI, gợi ý rằng sự biểu hiện ở nhóm này là sự phản ánh của trạng thái viêm mạn tính.

Nói chung là, các nghiên cứu này chứng tỏ rằng sự biểu hiện FLT3L trên các tế bào CD4+ T của đối tượng bị bệnh SLE được tăng đáng kể so với sự biểu hiện của đối

tượng bị bệnh HD. Hơn nữa, sự biểu hiện FLT3L tăng có tương quan cao với các kết quả SLEDAI. Do đó, sử dụng các kháng thể kháng FLT3L cho đối tượng bị bệnh SLE là chiến thuật điều trị có ý nghĩa để giảm các quần thể tế bào T biểu hiện FLT3L để giảm chứng viêm ở đối tượng bị bệnh SLE.

Phương pháp được sử dụng trên đây được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện PrimeFlow *in situ* của IC FLT3L ARN và được khẳng định bằng cách sử dụng AM40 được liên hợp với APC.

Ví dụ 14. Biểu hiện FLT3L ở bệnh viêm cơ

Bệnh viêm cơ là bệnh viêm cơ mạn tính mà được đặc trưng bởi sự yếu, sưng, và đau cơ. Ở mức độ tế bào, bệnh viêm cơ được đặc trưng bởi các mức tăng cao của các protein interferon loại 1 và pDC. Bệnh viêm cơ có thể có liên quan với SLE và các trình trạng tiền viêm khác. Do đó, sự biểu hiện của FLT3L ở đối tượng bị viêm cơ được điều tra để tìm kiếm mối tương quan giữa các mức FLT3L và mức độ nghiêm trọng của bệnh.

PBMC từ các đối tượng bị bệnh viêm cơ và HD được nghiên cứu đối với các tế bào CD4⁺ T biểu hiện FLT3L bằng cách sử dụng FACS. Các tế bào CD4⁺ T được chia thành các tập con T_{bẩm sinh}, T_{EM}, và T_{CM}. Mục ý nghĩa giữa các mẫu bệnh viêm cơ và HD được xác định bằng cách sử dụng phân tích Mann Whitney.

Như được quan sát trong Fig.18A và 18B, sự biểu hiện của FLT3L ở các PBMC từ các đối tượng bị bệnh viêm cơ song song với các phát hiện từ các đối tượng bị bệnh SLE, vì chúng được đặc trưng bởi mức tăng có ý nghĩa ở phần trăm các tế bào CD4⁺ T dương tính đối với FLT3L (T_{bẩm sinh} ($p < 0,05$; Fig.18A), T_{EM} ($p < 0,0001$; Fig.18B), và T_{CM} ($p < 0,0001$; Fig.18C)). Từ các kết quả này, sử dụng các kháng thể kháng FLT3L cho đối tượng bị bệnh viêm cơ là chiến thuật điều trị có ý nghĩa để giảm các quần thể tế bào T biểu hiện FLT3L để giảm chứng viêm ở đối tượng bị bệnh viêm cơ.

Ví dụ 15. Biểu hiện FLT3L ở bệnh viêm thận

Bệnh viêm thận là rối loạn miễn dịch mà ảnh hưởng đến thận và các cấu trúc thận liên quan. Tình trạng này có thể bắt nguồn từ SLE, các chất độc nhất định, hoặc các nhiễm trùng nhất định. Bệnh viêm thận có thể dẫn đến mất vĩnh viễn chức năng thận, mà có thể nguy hiểm đến tính mạng. Các tế bào đuôi gai đã được thể hiện là thâm nhiễm thận ở bệnh viêm thận lupus (Fiore *et al.*, (2008) *Mol Immunology* v45: 259-265) và được cho

rằng đóng vai trò trong việc dẫn đến chứng viêm thận, do đó, giả thuyết rằng sự phong bế FLT3L có thể ức chế DC và ngăn mất chức năng thận tiến triển. Mô hình chuột nhắt viêm thận Murphy Roths Large/tăng sinh tế bào lympho (MRL.lpr) và kháng thể kháng FLT3L (LFC-1) thể thay thế chuột nhắt được sử dụng cho nghiên cứu tác dụng của sự phong bế FLT3L đối với các mức protein niệu và điểm số viêm thận. Đối chứng isotyp được bao gồm, cùng với nhóm điều trị kháng thể kháng IFNAR. Chuột nhắt được sử dụng kháng thể kháng FLT3L thể hiện sự giảm đáng kể protein niệu tại 17 tuần sau khi sử dụng (Fig.19A). Ngoài ra, các điểm số viêm thận tại 18 tuần được giảm ở chuột được sử dụng kháng thể kháng FLT3L so với các đối chứng isotyp (Fig.19B). Quan trọng là, protein niệu và các điểm số viêm thận ở chuột được sử dụng kháng thể kháng FLT3L được giảm so với chuột không được sử dụng. Các kết quả này củng cố cho vai trò của chứng viêm gây ra bởi FLT3L ở bệnh viêm thận. Từ các kết quả này, sử dụng các kháng thể kháng FLT3L cho đối tượng bị bệnh viêm thận là chiến thuật điều trị có ý nghĩa để giảm các quần thể tế bào T biểu hiện FLT3L để giảm chứng viêm ở đối tượng bị bệnh viêm thận.

Các quần thể DC lách cũng được kiểm tra để cung cấp cái nhìn về sự thay đổi liên quan đến FLT3L ở các quần thể tế bào máu trắng ở bệnh viêm thận. Lách được thu hoạch từ chuột MRL tại 18 tuần và các thay đổi ở các quần thể DC lách được kiểm tra. Điều trị kháng thể kháng FLT3L làm giảm đáng kể các DC tuần hoàn ở chuột nhắt MRL (Fig.20A-C). Cụ thể là, Siglec-H⁺-pDC được giảm đáng kể so với các đối chứng isotyp sau khi sử dụng kháng thể kháng FLT3L (Fig.20A). Tương tự, sự giảm đáng kể được quan sát thấy ở các CD11b⁺ cDC (tương đương với CD1c⁺ DC người) và các CD8⁺ cDC (tương đương với CD141⁺ DC người) (Fig.20B và 20C). Hơn nữa, không có tỉ lệ mắc bệnh viêm da nào ở chuột được điều trị bằng kháng thể kháng FLT3L được quan sát so với sự chiếm giữ thường xuyên là 30-40% ở chuột không được điều trị. Do đó, điều trị kháng thể kháng FLT3L làm giảm các quần thể DC tuần hoàn và cải thiện bệnh lý thứ phát (bệnh viêm da) ở mô hình viêm thận. Từ các kết quả này, sử dụng các kháng thể kháng FLT3L cho đối tượng bị bệnh viêm thận có thể làm giảm chứng viêm mà tổn hại mô bằng cách ức chế các quần thể DC.

Ví dụ 16. Biểu hiện FLT3L ở hội chứng Sjögren

Hội chứng Sjögren nguyên phát (pSS) là tình trạng bệnh tự miễn được đặc trưng bởi chứng khô mở rộng của mắt và các tuyến nước bọt. Ngoài ra, tình trạng bệnh này có

thể gây ra sự rối loạn chức năng đa cơ quan. Hội chứng này xảy ra một mình hoặc trong sự có mặt của các bệnh tự miễn khác như bệnh lupus hoặc bệnh viêm khớp dạng thấp. Các mức huyết thanh của FLT3L được tăng ở các đối tượng bị pSS và có sự rõ ràng về sự biểu hiện cục bộ của cả FLT3L và thụ thể của nó ở tuyến nước bọt bị viêm (Tobon *et al.*, (2010) *Arthritis and Rheumatism* v62: 344). Mô hình chuột bị Sjögren NOD.H2h4 được sử dụng cho nghiên cứu bệnh lý tuyến nước bọt sau khi điều trị kháng thể kháng FLT3L (LFC-1) kéo dài. Ở 16 tuần tuổi, các chuột này phát triển các cấu trúc lympho bậc ba (TLS) ở tuyến nước bọt (SG) mà bao gồm phần lớn các DC, tế bào B220+ B và tế bào CD3+ T, theo cách gần giống với các thay đổi bệnh lý được quan sát thấy ở người. Sự tổn hại mô này được đặt trước bởi sự phát triển của các tự kháng thể và sự hình thành các trung tâm mầm tự động ở lách (Mahmoud *et al.*, 2016 *Science Translational Medicine*, v8 361ra137). Chuột nhất được điều trị bằng cách sử dụng quy trình dự phòng (bắt đầu tại 5 tuần tuổi) hoặc điều trị (bắt đầu ở 17 tuần tuổi) với các đối chứng Globulin miễn dịch isotyp (5 mg/kg), kháng thể kháng FLT3L (5 mg/kg). Đối với cả hai quy trình, sự điều trị được liên tục với liều dùng hai lần một tuần tới khi kết thúc nghiên cứu (26 tuần). Kháng thể đơn dòng kháng FLT3L (LFC-1) trung hoà có hiệu quả FLT3L trong toàn bộ thời gian điều trị (Fig.25A) và dẫn đến tích tụ phức hợp được chất/phối tử tuần hoàn (Fig.25B).

Các cơ quan lympho được thu thập để đánh giá các thay đổi đối với quần thể tế bào miễn dịch ngoại biên và các tuyến nước bọt (SG) được thu hoạch và được đánh giá đối với bệnh học mô (tần suất TLS). Trong khi được báo cáo trước đó rằng các điều trị dự phòng có thể ngăn ngừa sự khởi phát bệnh, có các báo cáo trước đó bị giới hạn rằng sự tổn hại mô có thể được trì hoãn hoặc được ngăn ngừa bởi sự can thiệp trị liệu sau khi khởi phát bệnh. Kháng thể đơn dòng kháng FLT3L (LFC-1) làm giảm tần suất tế bào CD44^{HI} CD4+ và CD8+ T được trải nghiệm kháng nguyên ở lách và LN dẫn lưu tuyến nước bọt (tại cuối nghiên cứu tại 24-26 tuần tuổi) (Fig.26A - 26D), cùng với giảm một cách chọn lọc các tự kháng thể đặc hiệu đối với collagen IV và dịch chiết tiểu cầu (Fig.27). Như mong đợi, các chuột được điều trị bằng IgG đối chứng isotyp đã làm tăng sự hình thành TLS ở tuyến nước bọt (được đo là tần suất trên mỗi mm² mô) ở 26 tuần tuổi, dấu hiệu của sự tổn thương tuyến nước bọt. Chuột nhất được điều trị bằng kháng thể kháng FLT3L, thậm chí khi được dùng liều trị liệu, có sự giảm đáng kể sự tổn hại SG mô (Fig.21A) và bệnh được ngăn chặn hoàn toàn khi được điều trị dự phòng (Fig.21B). Các quần thể DC, khi được đo trong lách, bị ức chế đáng kể, được cho là được loại bỏ hoàn

toàn (Fig.22A-D). Tuy nhiên, điều này đủ để tạo ra tác động đáng kể đến sự khởi phát bệnh và sự tiến triển bằng cách giảm sự thâm nhiễm viêm vào trong tuyến nước bọt. Các kết quả này củng cố rằng chứng viêm ở pSS bắt nguồn bởi các cơ chế được gây ra bởi FLT3L. Từ các kết quả này, sử dụng các kháng thể kháng FLT3L là chiến lược trị liệu rõ ràng để điều trị pSS ở đối tượng người.

Từ mô tả trên đây, sẽ rõ ràng rằng các biến thiên và các cải biến có thể được tạo ra cho sự bộc lộ được mô tả ở đây để áp dụng cho các sử dụng và các điều kiện khác nhau. Các phương án như vậy cũng nằm trong phạm vi các điểm yêu cầu bảo hộ. Sự trích dẫn danh sách các yếu tố trong định nghĩa bất kỳ biến thiên ở đây bao gồm các định nghĩa mà biến thiên là yếu tố đơn bất kỳ hoặc sự kết hợp (hoặc sự kết hợp phụ) của các yếu tố được liệt kê. Sự trích dẫn phương án ở đây bao gồm phương án dưới dạng phương án đơn bất kỳ hoặc trong sự kết hợp với các phương án khác bất kỳ hoặc các phần của nó. Tất cả các bằng sáng chế và các công bố được đề cập trong bản mô tả được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết đặc hiệu với phối tử thụ thể tyrosin kinaza 3 tương tự ung thư tổ chức liên kết McDonough của mèo (Feline McDonough Sarcoma (FMS)-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) ligand-FLT3L)), chứa tập hợp các vùng xác định bổ sung (CDR): HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.33, và SEQ ID NO.34.
2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó vùng VH và vùng VL chứa trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2.
3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó VH và VL tương ứng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và SEQ ID NO.2.
4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể của người, kháng thể nhân tạo, hoặc kháng thể khảm.
5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa miền hằng định globulin miễn dịch chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm: (a) miền hằng định IgA; (b) miền hằng định IgD; (c) miền hằng định IgE; (d) miền hằng định IgG1; (e) miền hằng định IgG2; (f) miền hằng định IgG3; (g) miền hằng định IgG4; và (h) miền hằng định IgM.
6. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa miền hằng định globulin miễn dịch chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: (a) miền hằng định Ig kappa; và (b) miền hằng định Ig lambda.
7. Axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.
8. Tế bào vật chủ được biến nạp với axit nucleic theo điểm 7.
9. Tế bào lai sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.

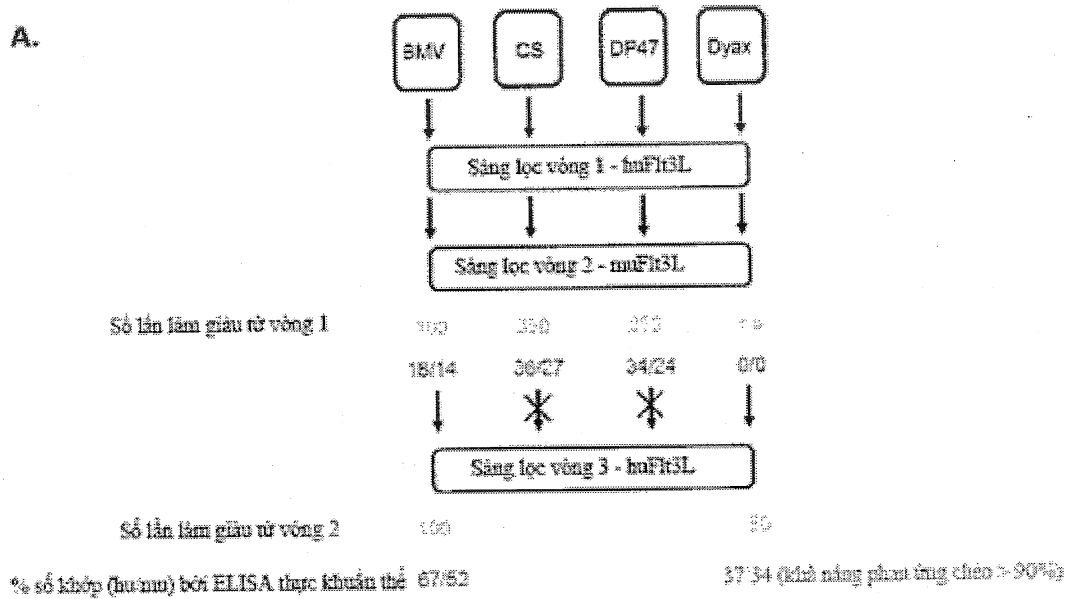
10. Phương pháp sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm bước (a) nuôi cấy tế bào vật chủ biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên; và (b) phân lập kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó nêu trên từ tế bào vật chủ được nuôi cấy.

11. Kháng thể đơn dòng của người gắn kết đặc hiệu với FLT3L, trong đó kháng thể này chứa: i. các vùng xác định bổ sung (CDR) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin tương ứng như nêu trong SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.33, và SEQ ID NO.34; ii. miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người; và iii. miền hằng định chuỗi nhẹ Ig lambda của người.

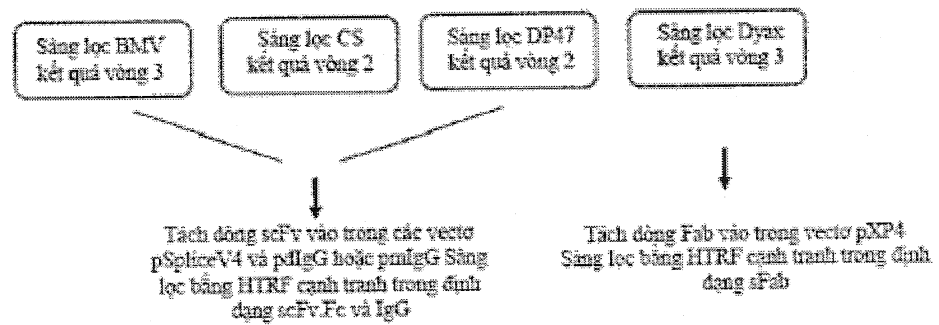
12. Kháng thể đơn dòng của người theo điểm 11, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.61 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.62.

13. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 12.

A.



B.



C.

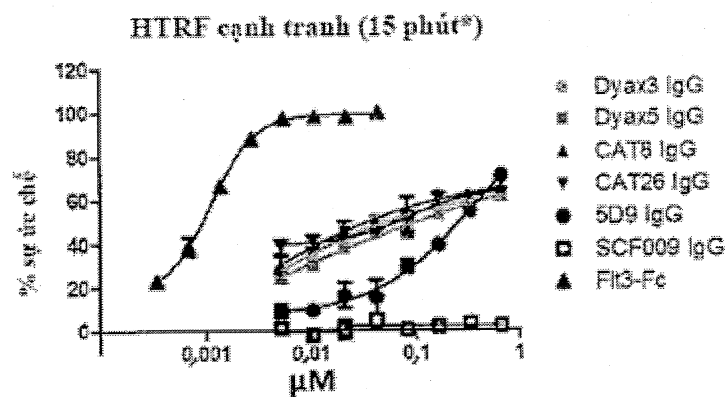
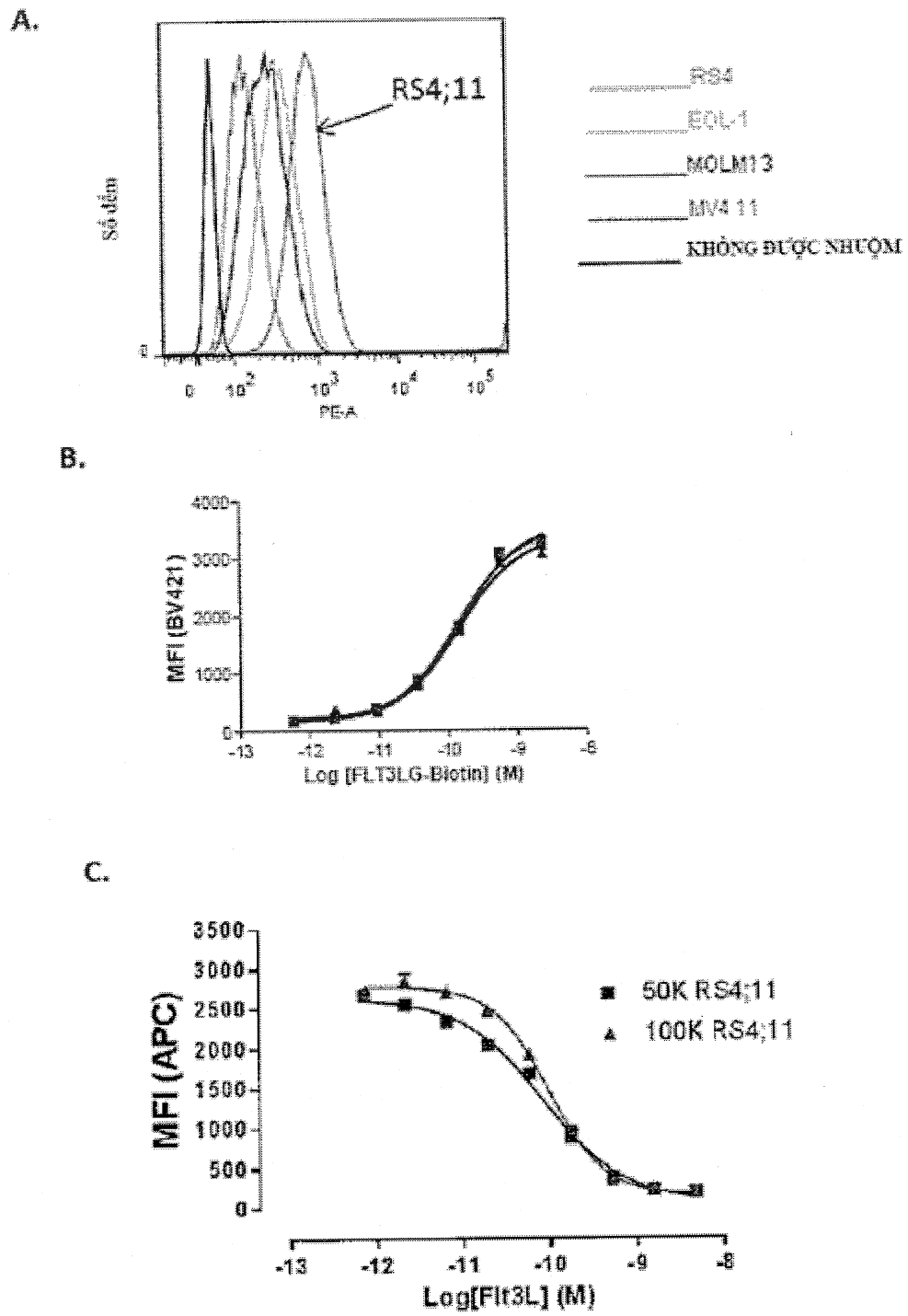
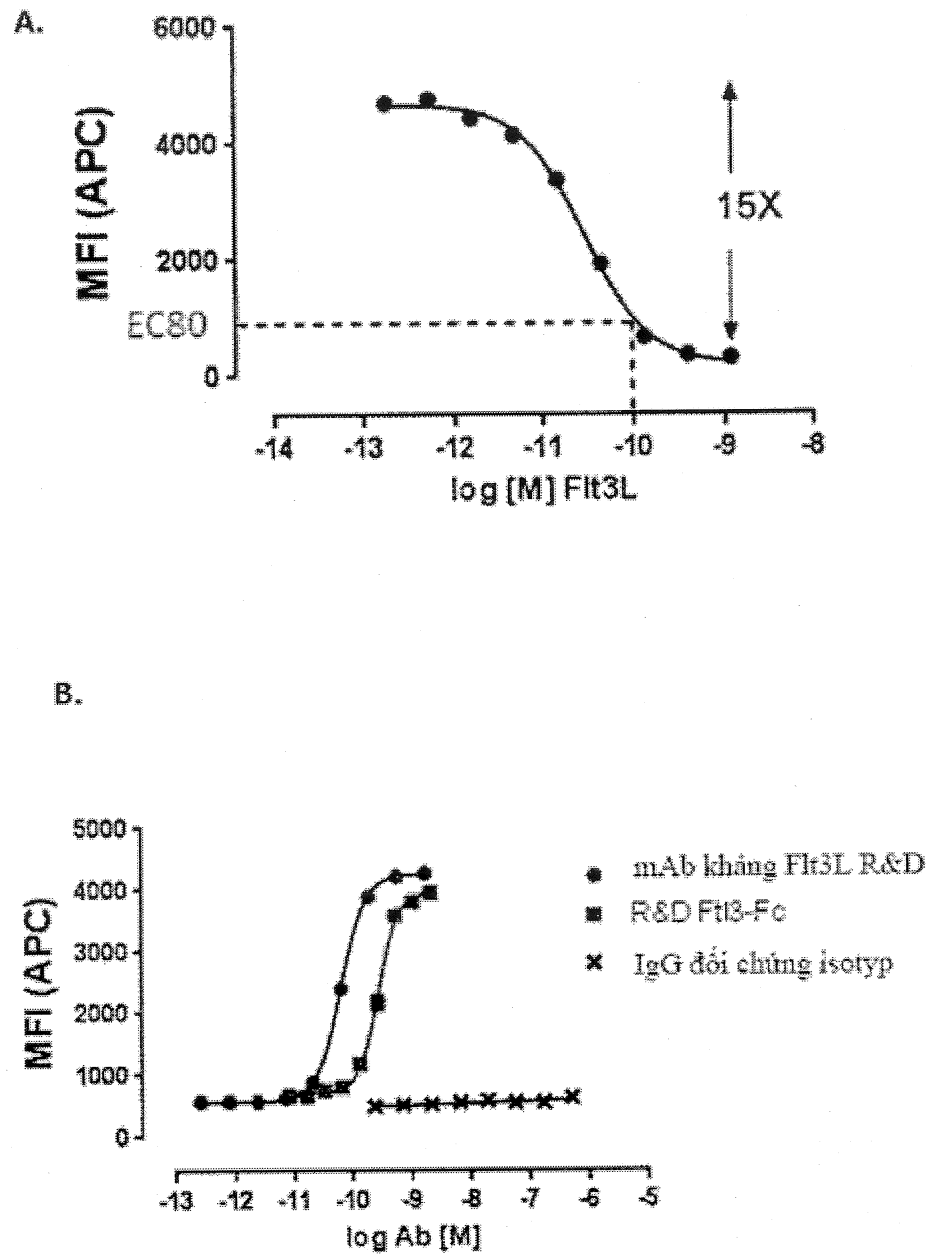
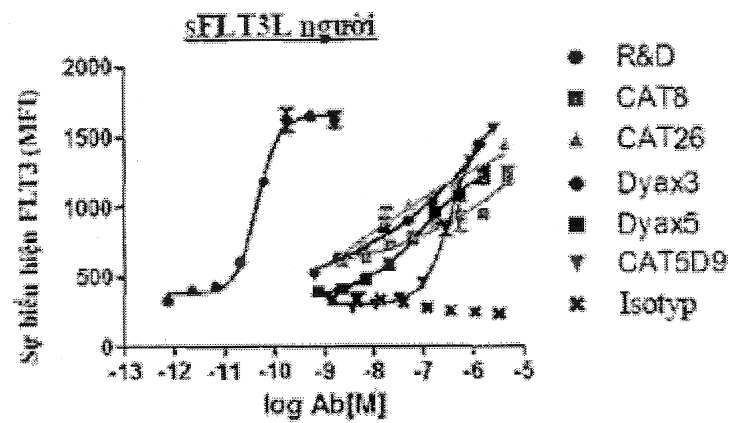


Fig.1

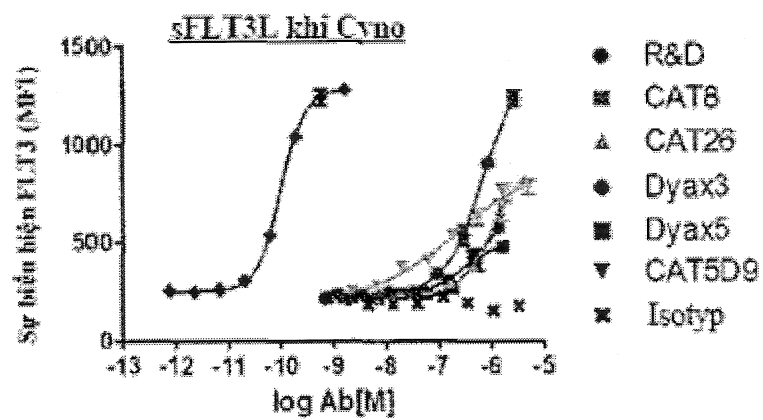
**Fig.2**

**Fig.3**

A.



B.



C.

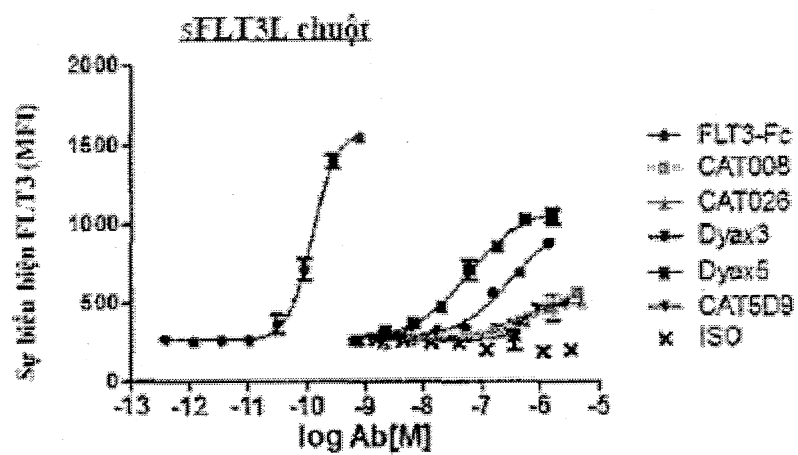
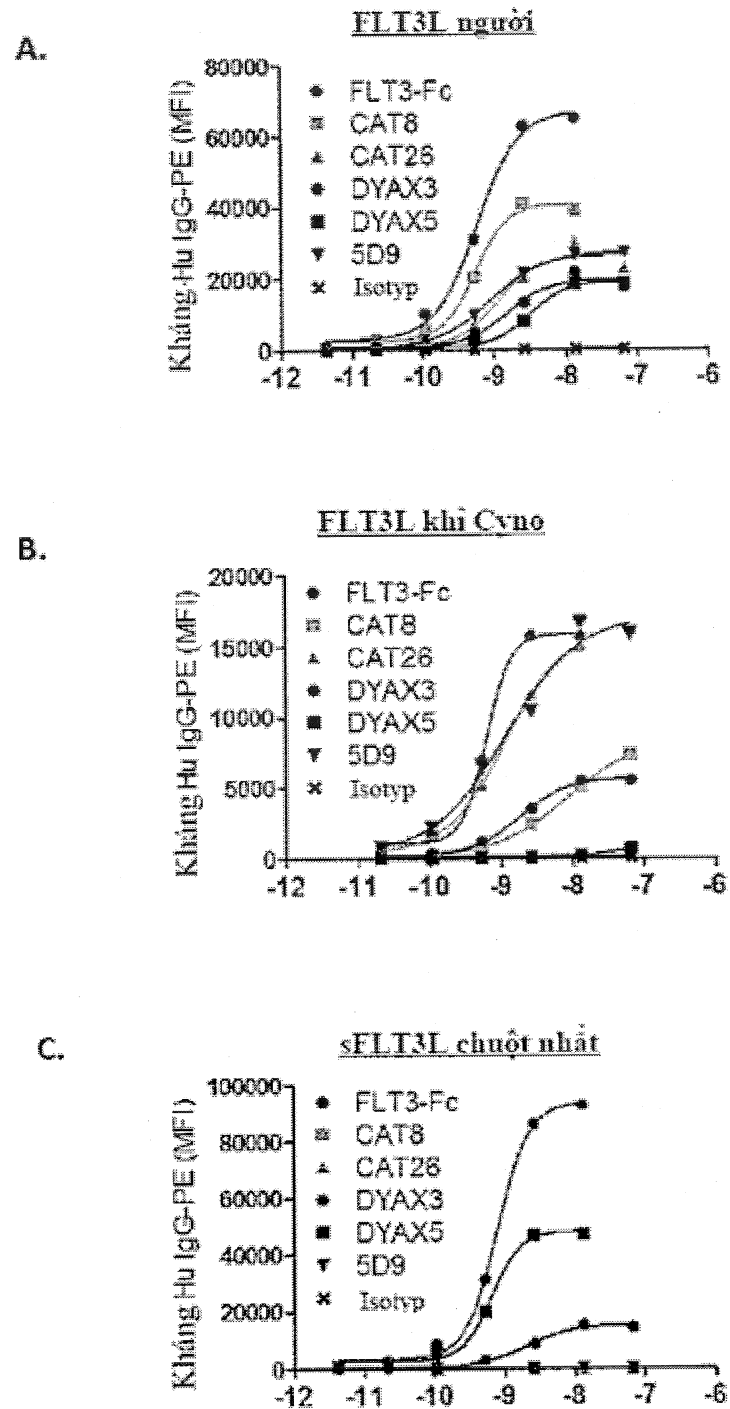
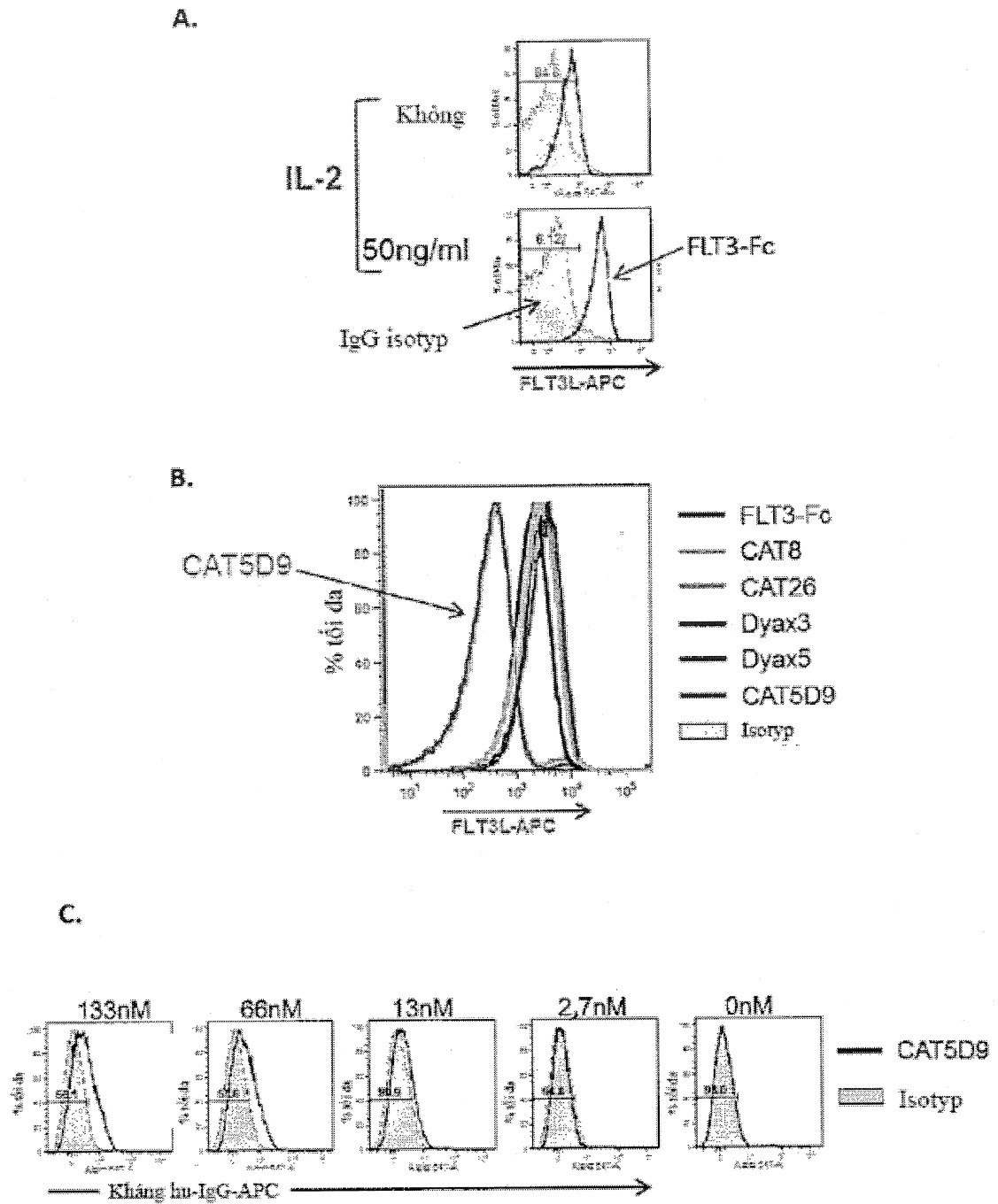
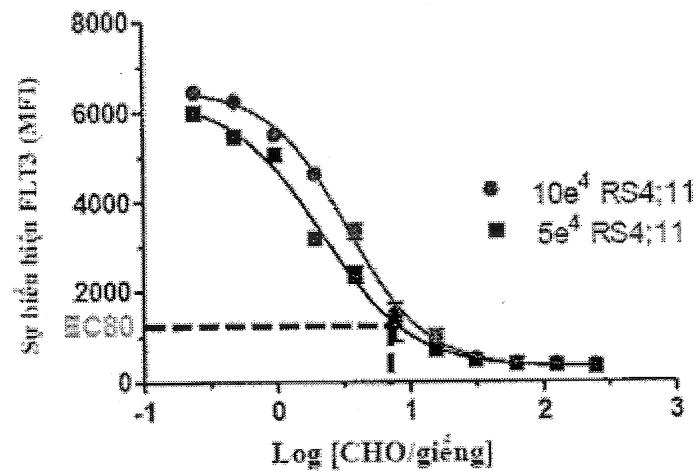


Fig.4

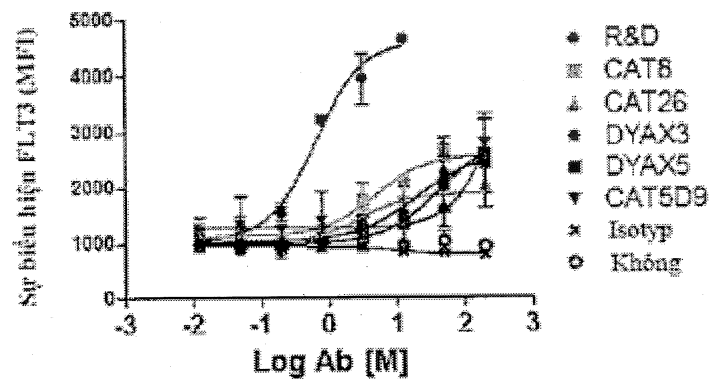
**Fig.5**

**Fig.6**

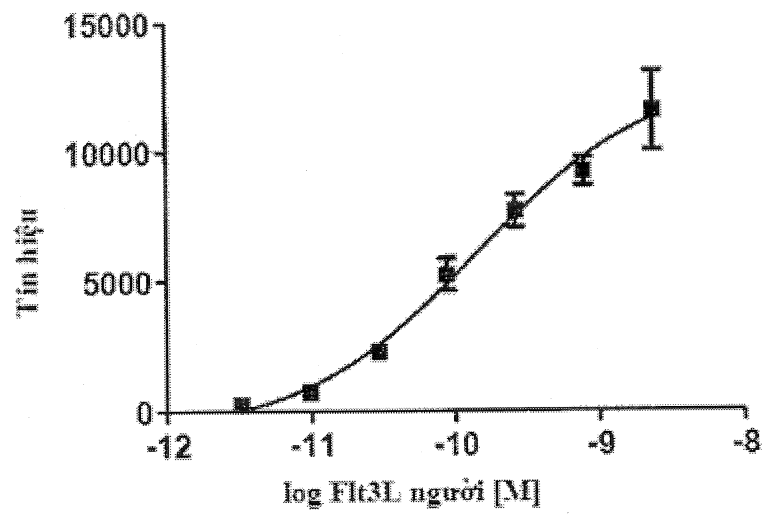
A.



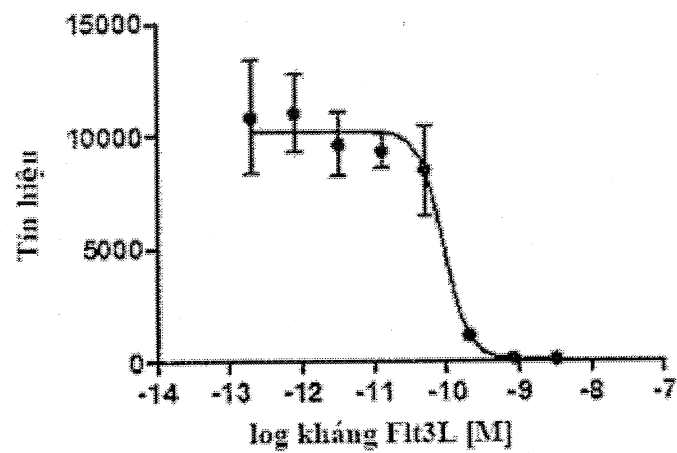
B.

**Fig.7**

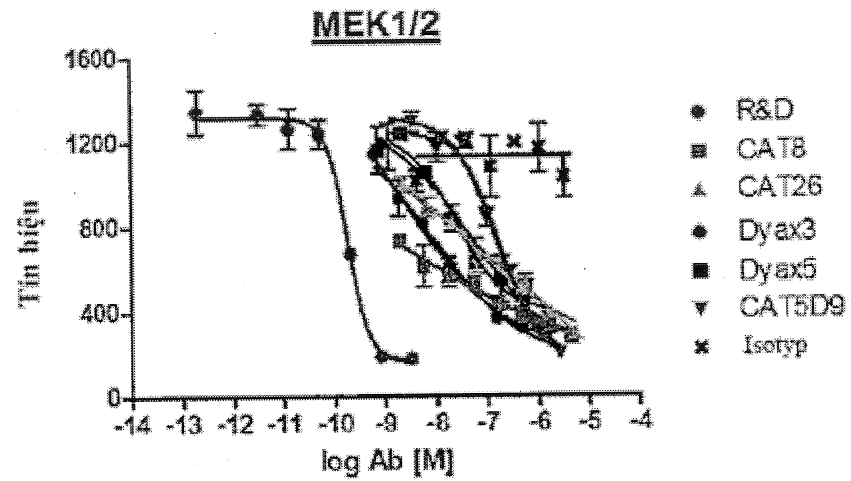
A.

Sự hoạt hoá ERK bởi
FLT3L

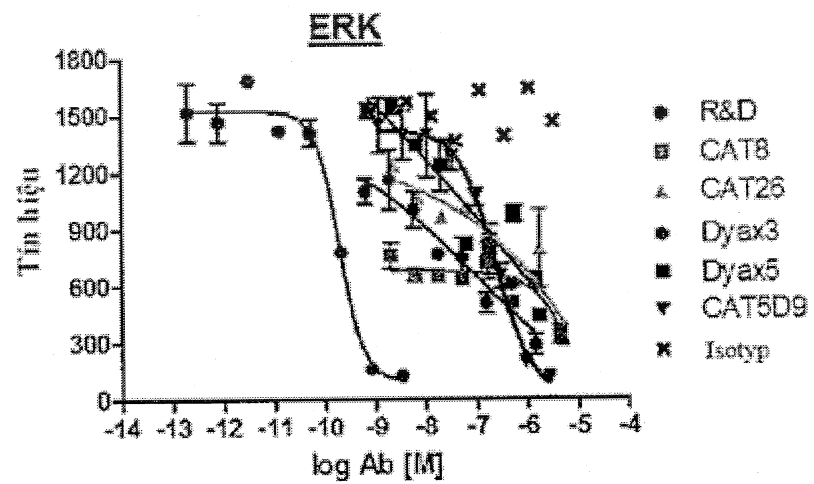
B.

Quá trình trung hoà hoá 476pM FLT3L bởi
kháng thể thương mại**Fig.8**

A.



B.

**Fig.9**

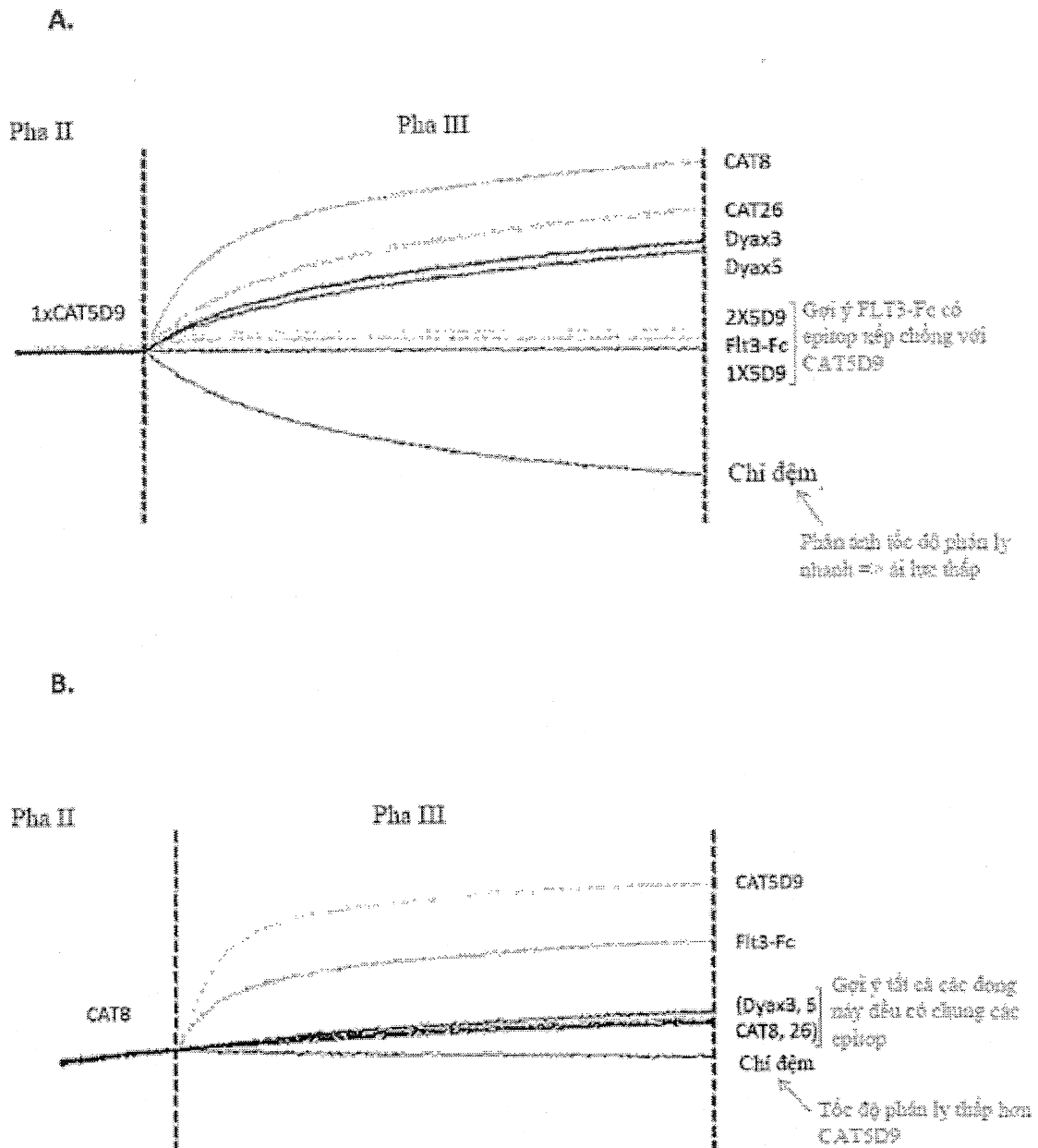
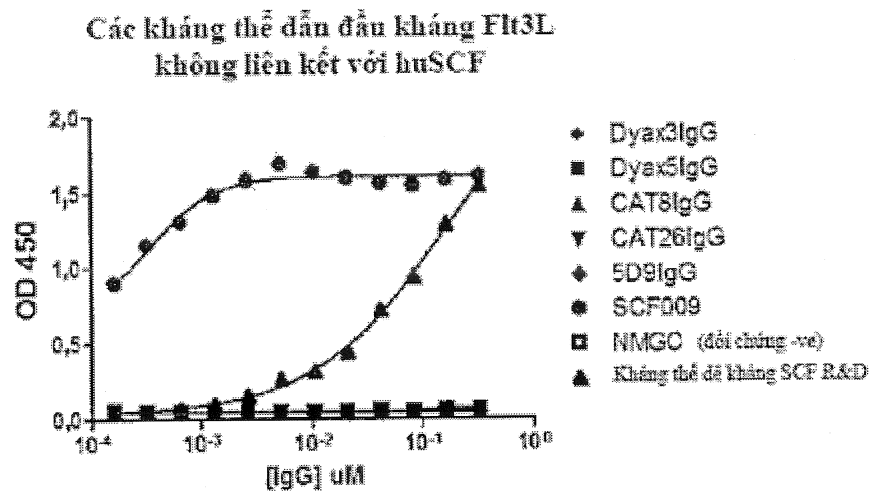


Fig.10

A.



B.

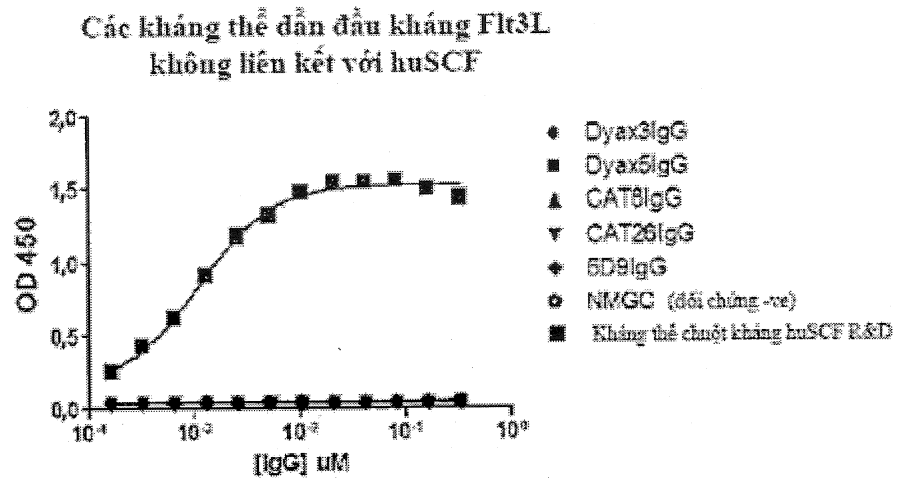
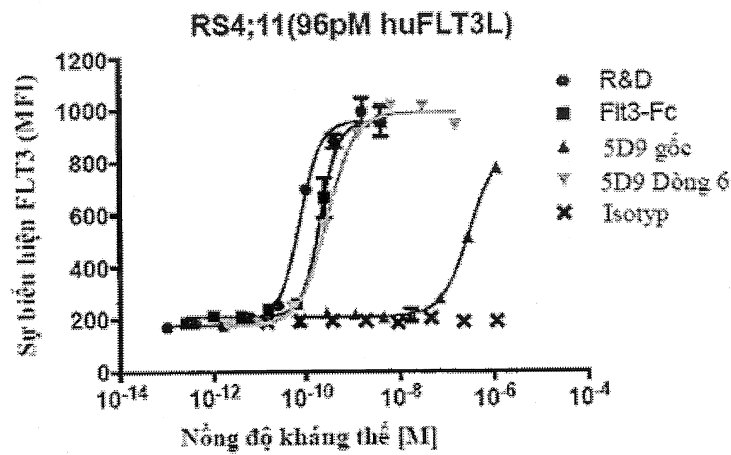


Fig.11

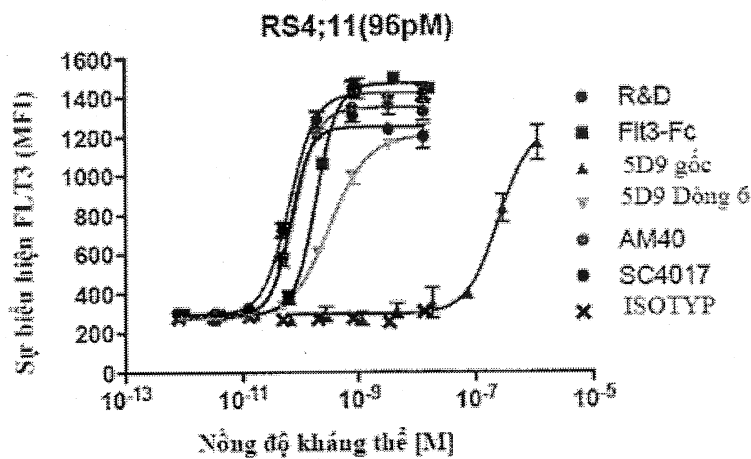
A. Các dòng vô tính ứng viên kháng Flt3L



	IC50 (pM)
FLT3-Fc	213
R&D mAb608	76,3
5D9 gốc	318,100
C06	293

B.

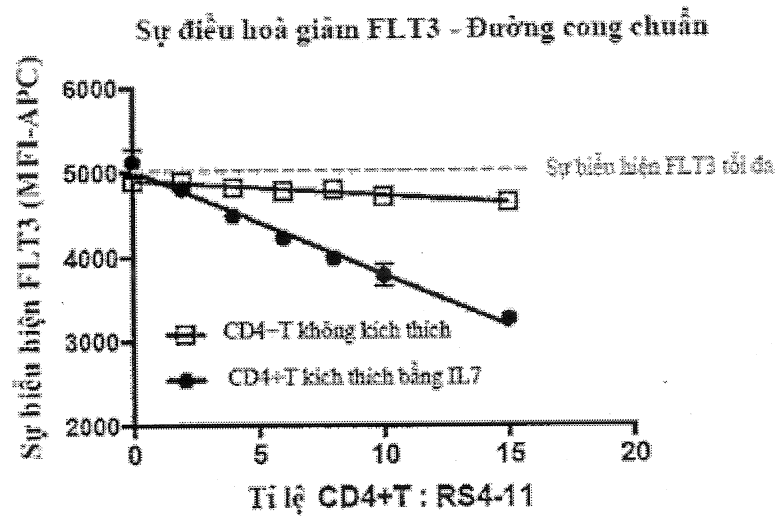
Các kháng thể kháng Flt3L



	IC50 (pM)
FLT3-Fc	198
R&D mAb608	68
5D9 gốc	248,300
C06	334
SC4017	72
AM40	83

Fig.12

A.



B.

Sự trung hoà FLT3L liên kết tế bào nội sinh

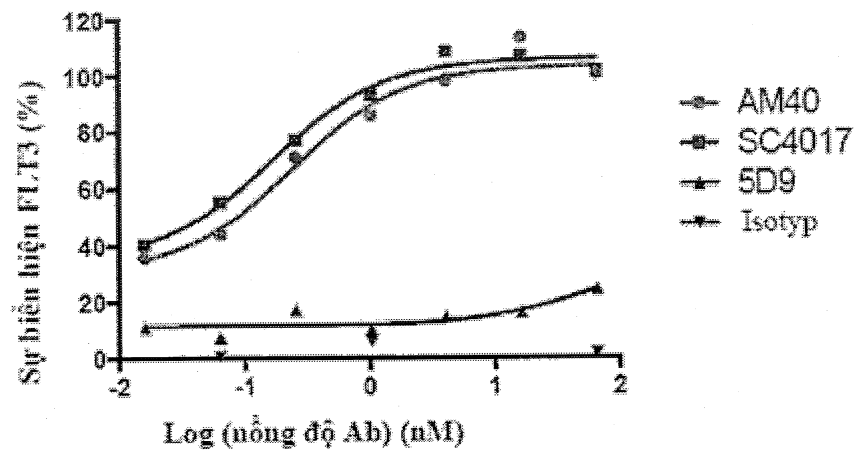


Fig.13

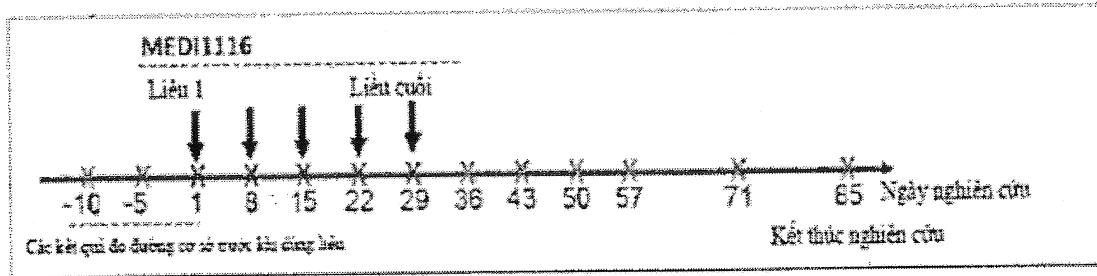
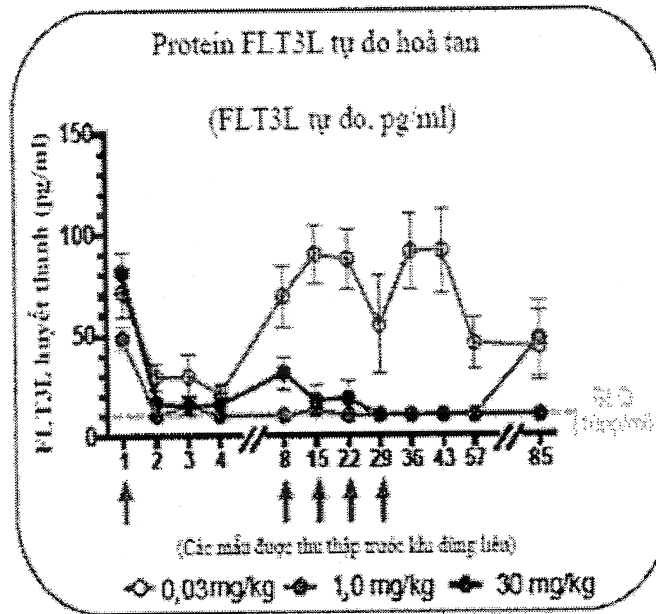


Fig.14

A.



B.

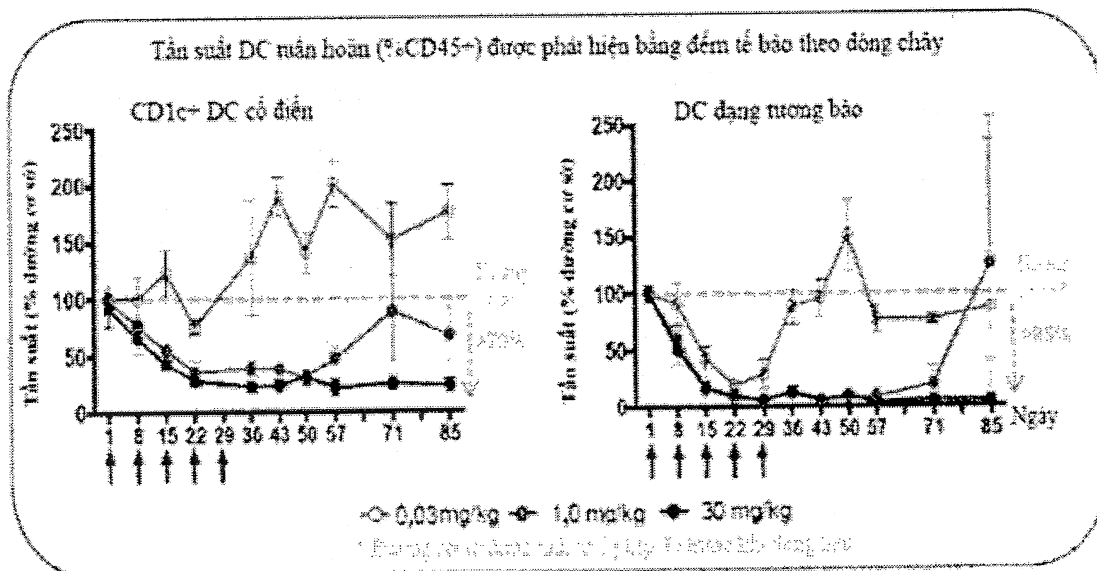


Fig.15

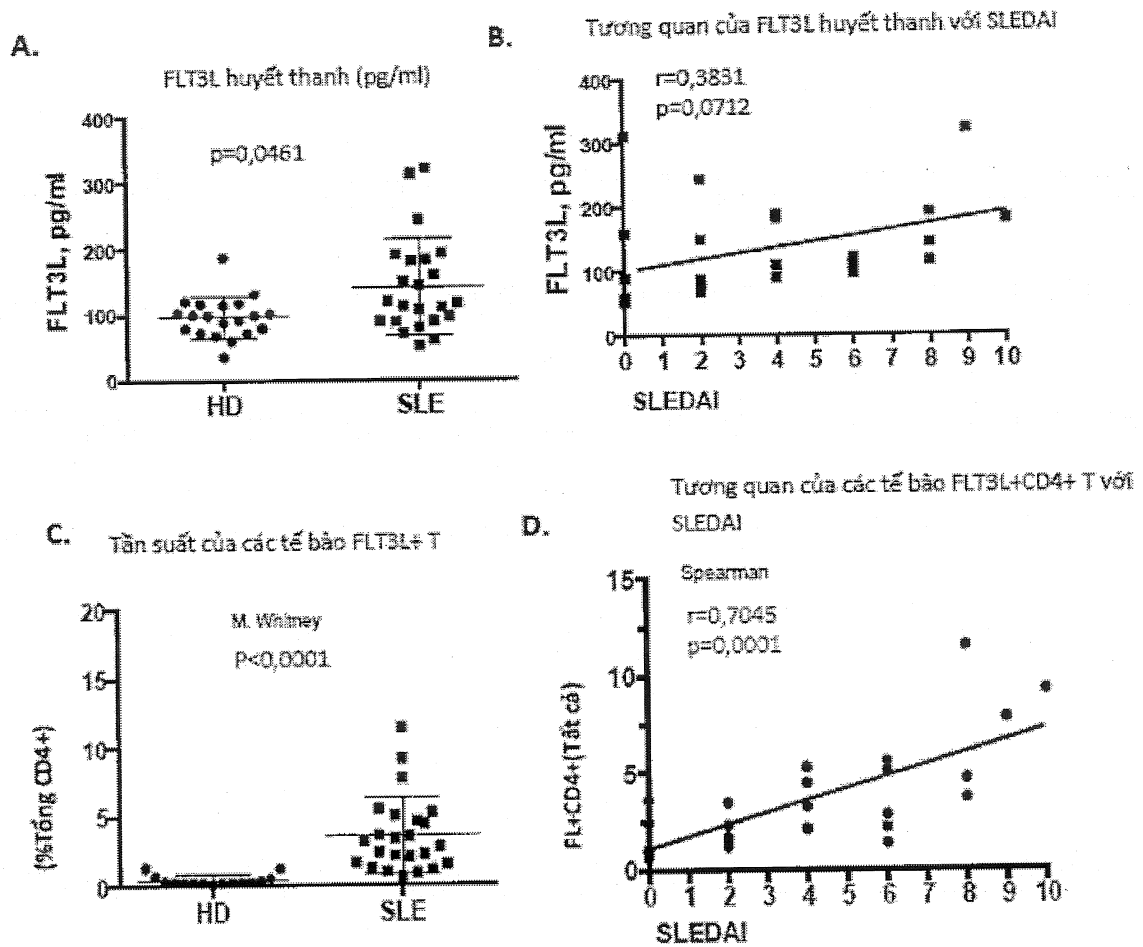
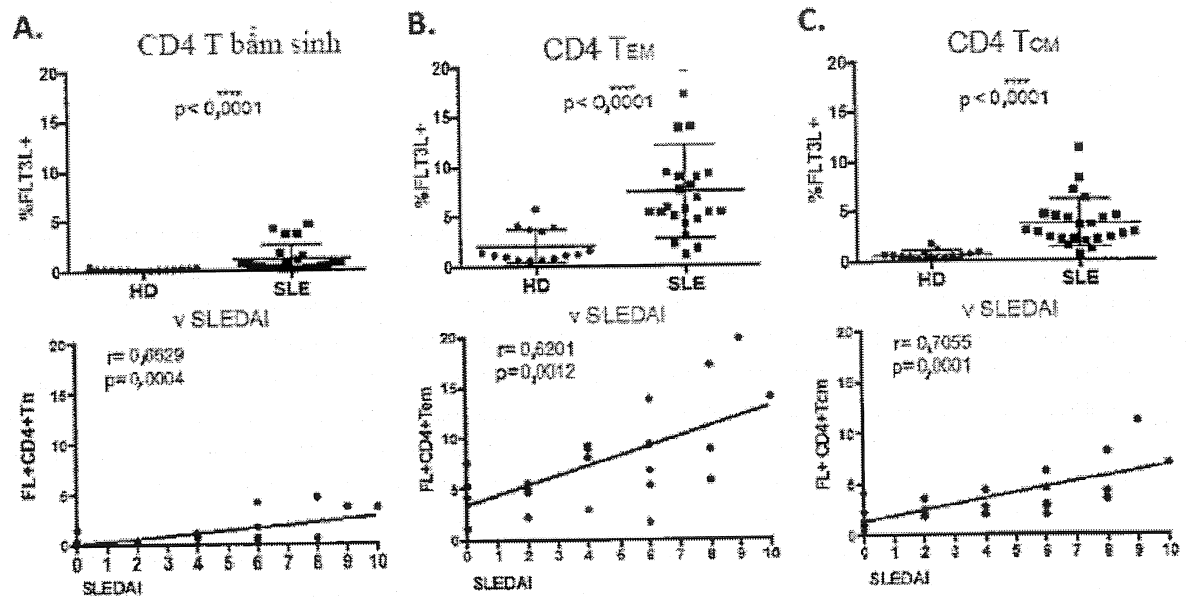
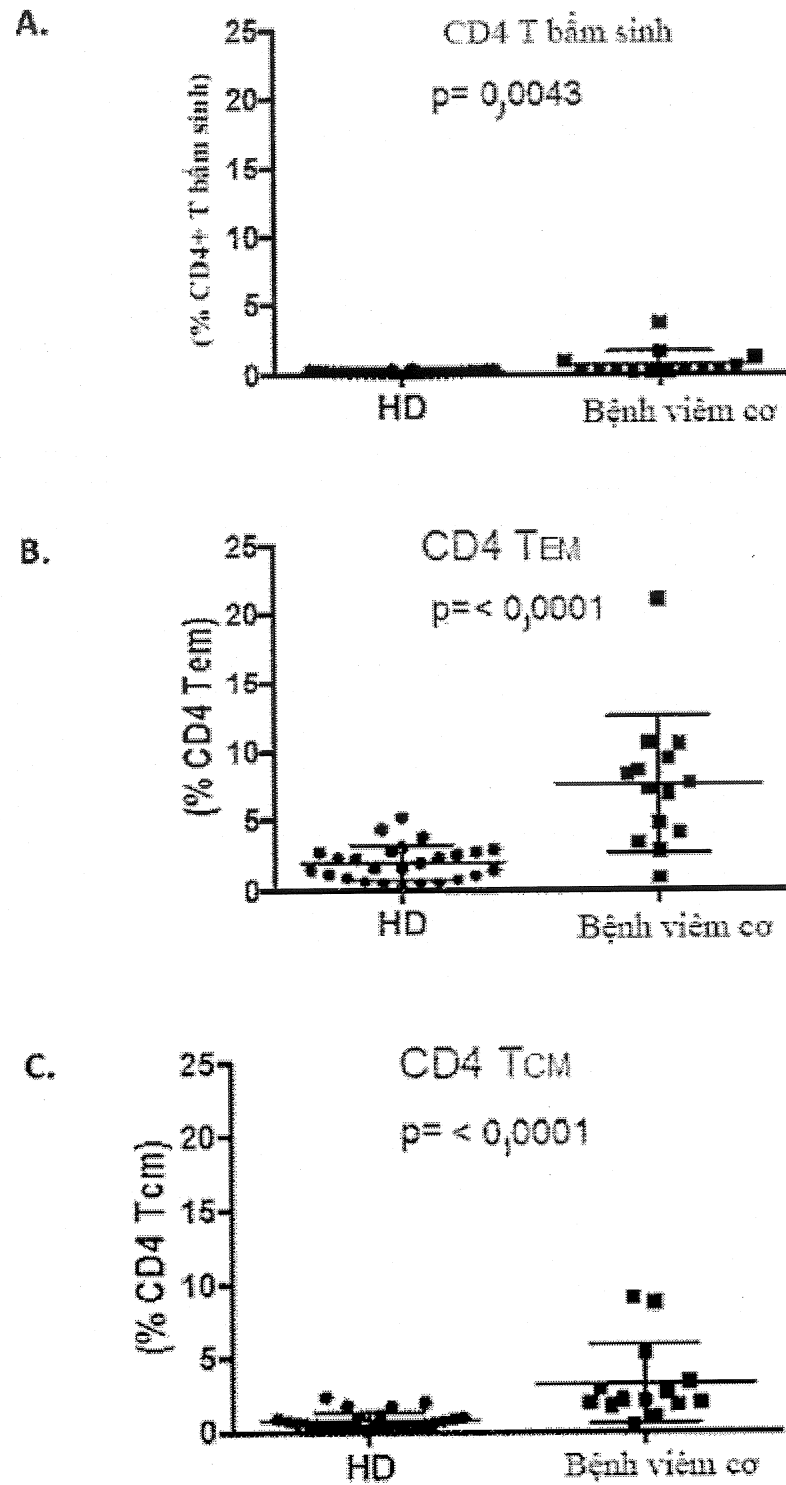
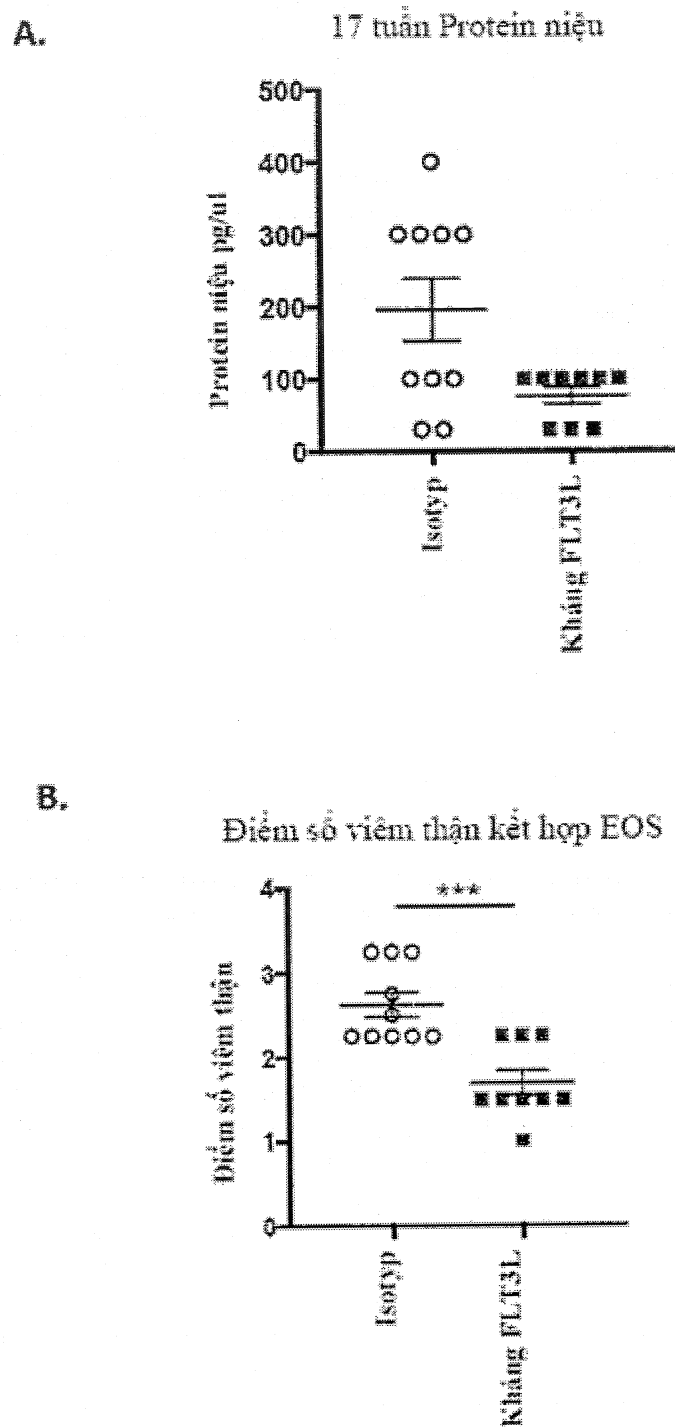


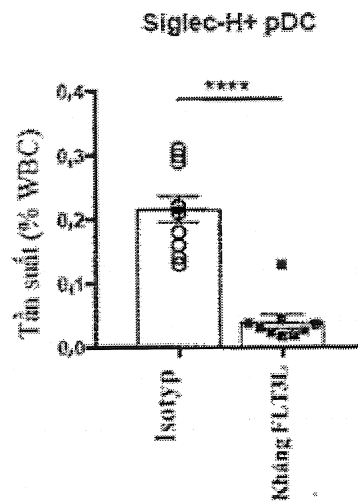
Fig.16

**Fig.17**

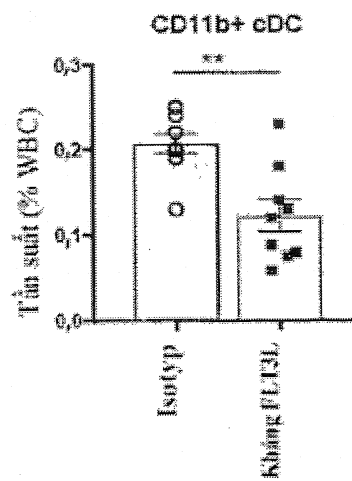
**Fig.18**

**Fig.19**

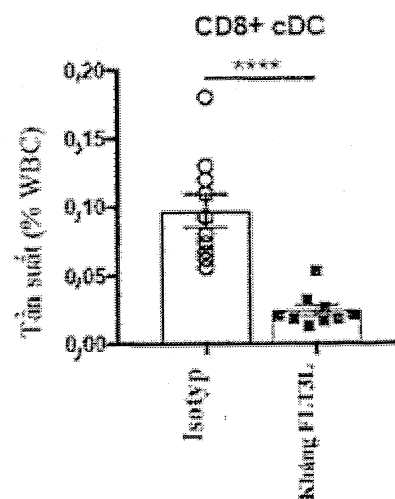
A.



B.

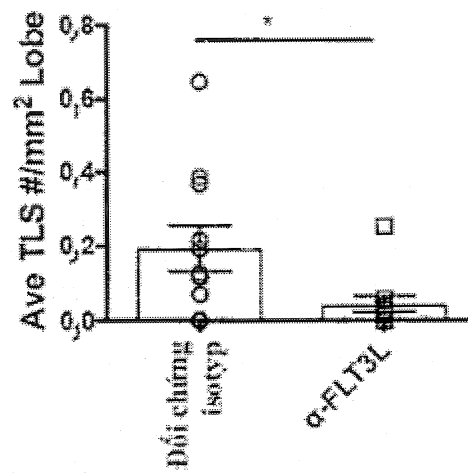


C.

**Fig.20**

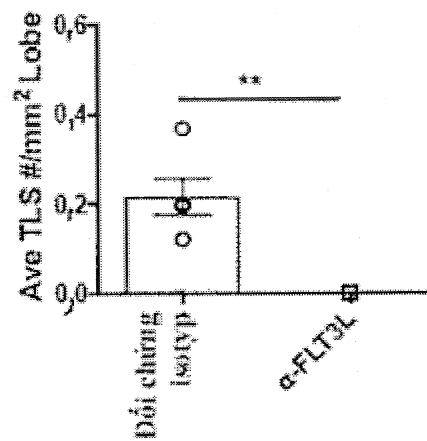
A.

Điểm số bệnh lý SG - Trị liệu

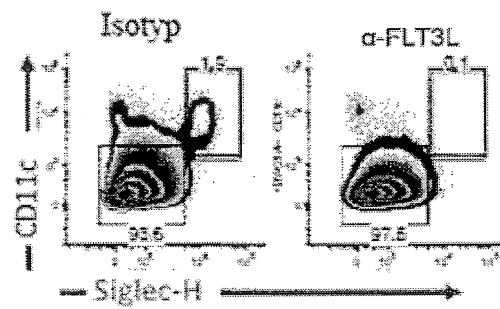


B.

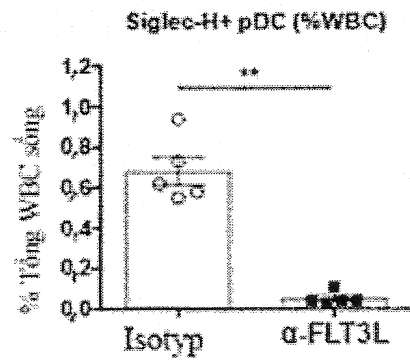
Điểm số bệnh lý SG - Dự phòng

**Fig.21**

A. DC dạng tương bào: B220+CD11c+Siglec-H+

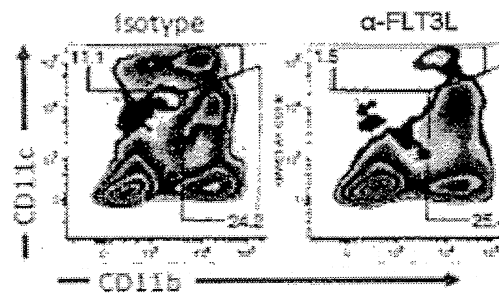


B.



DC cổ điển: B220-CD11c^{int}

C.



D.

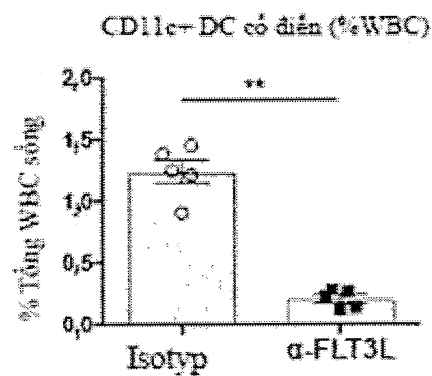


Fig.22

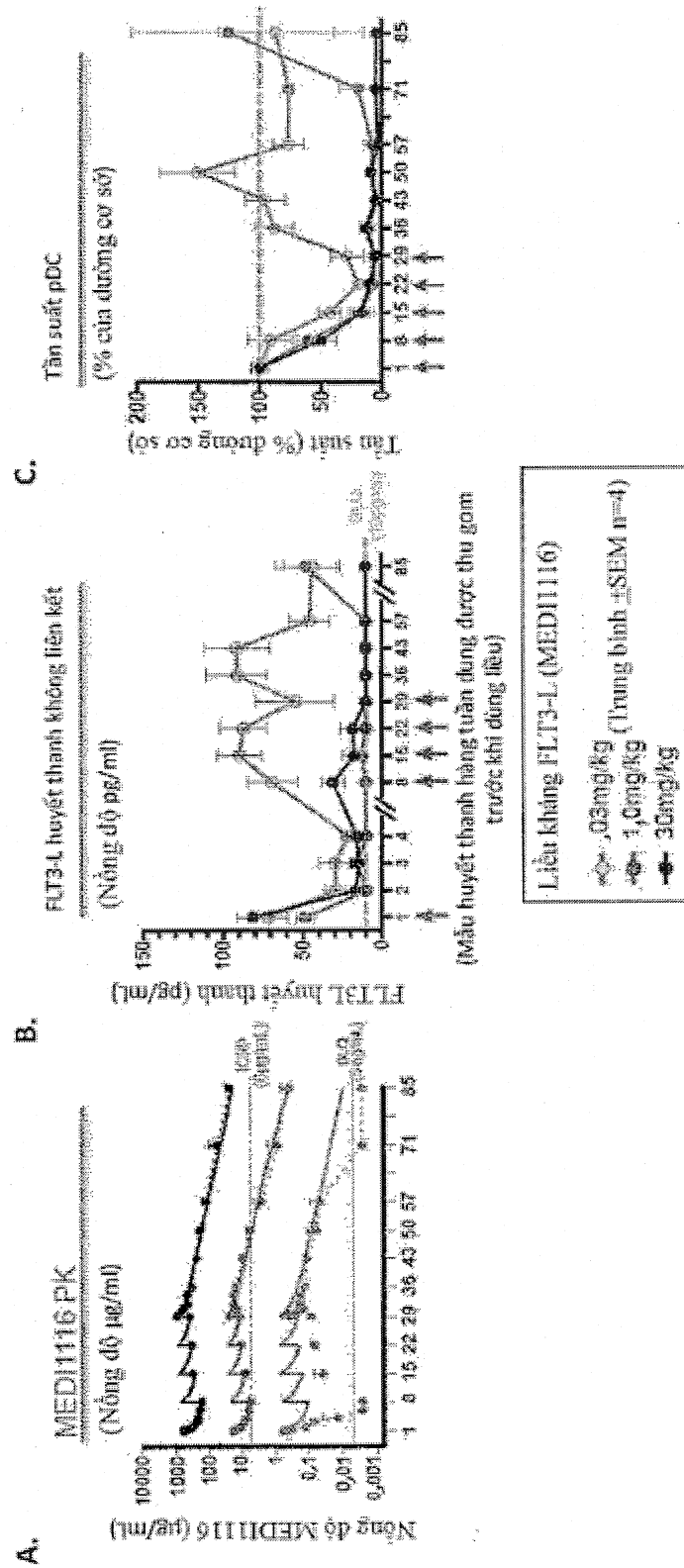


Fig.23

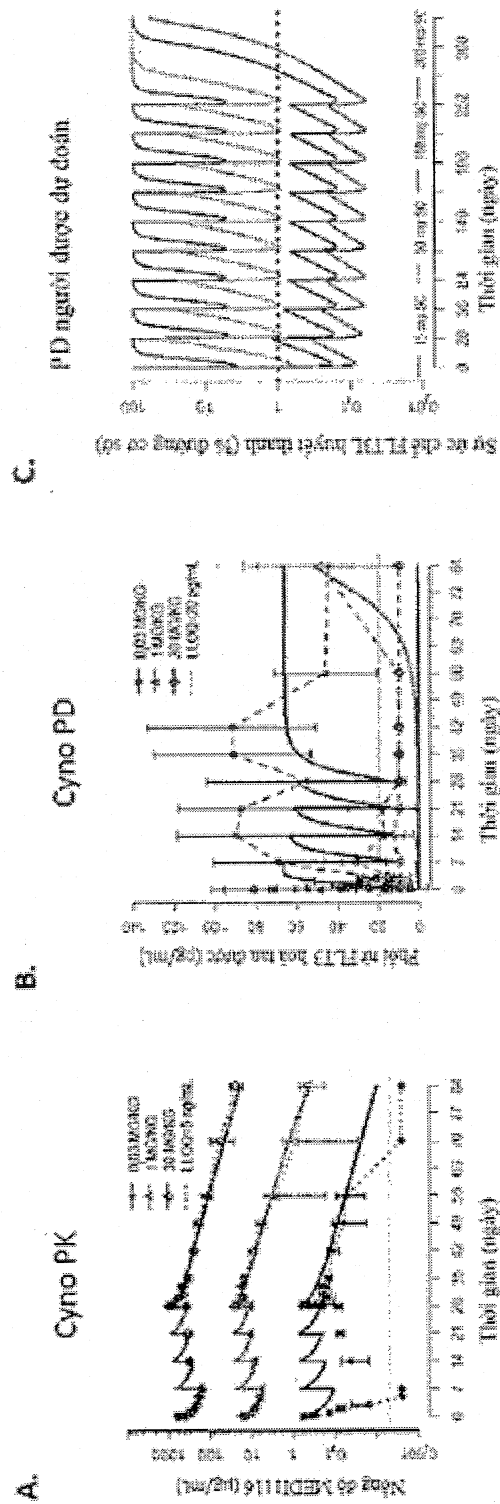


Fig.24

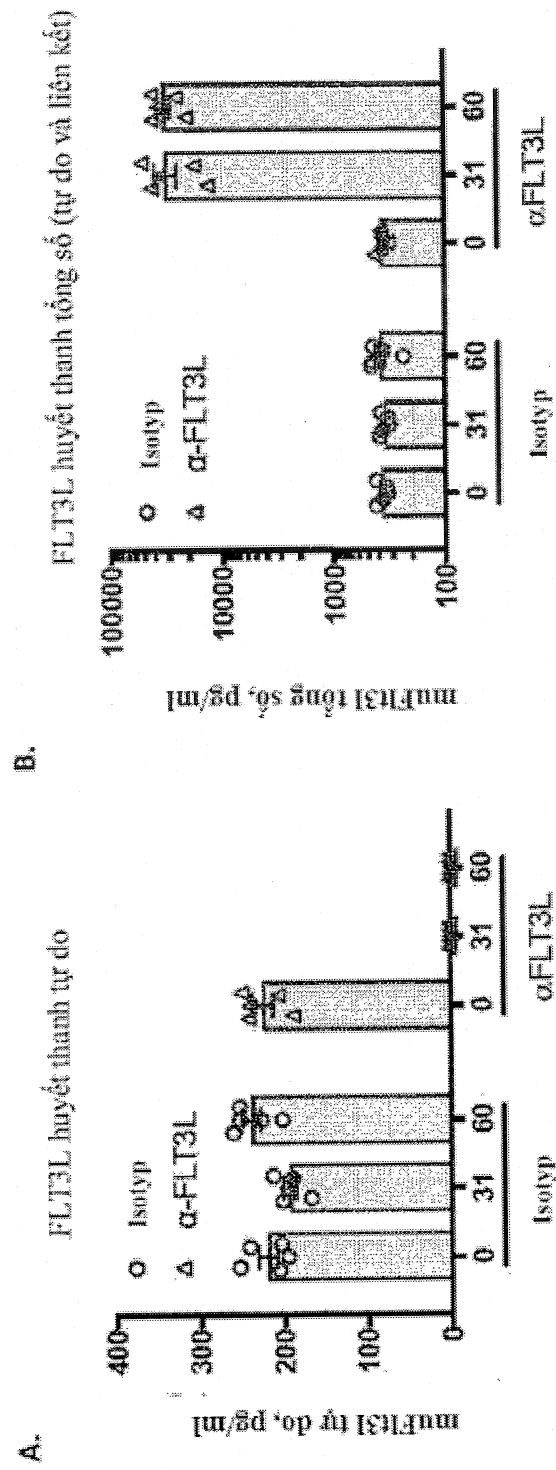
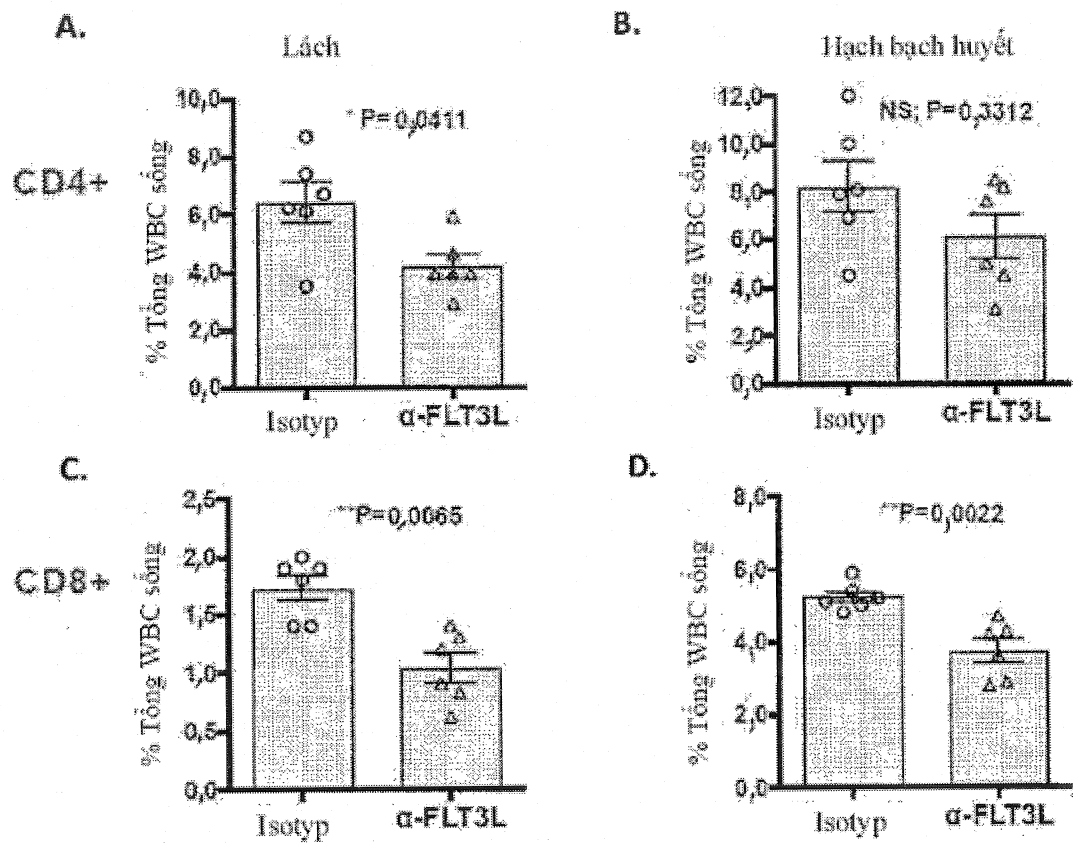
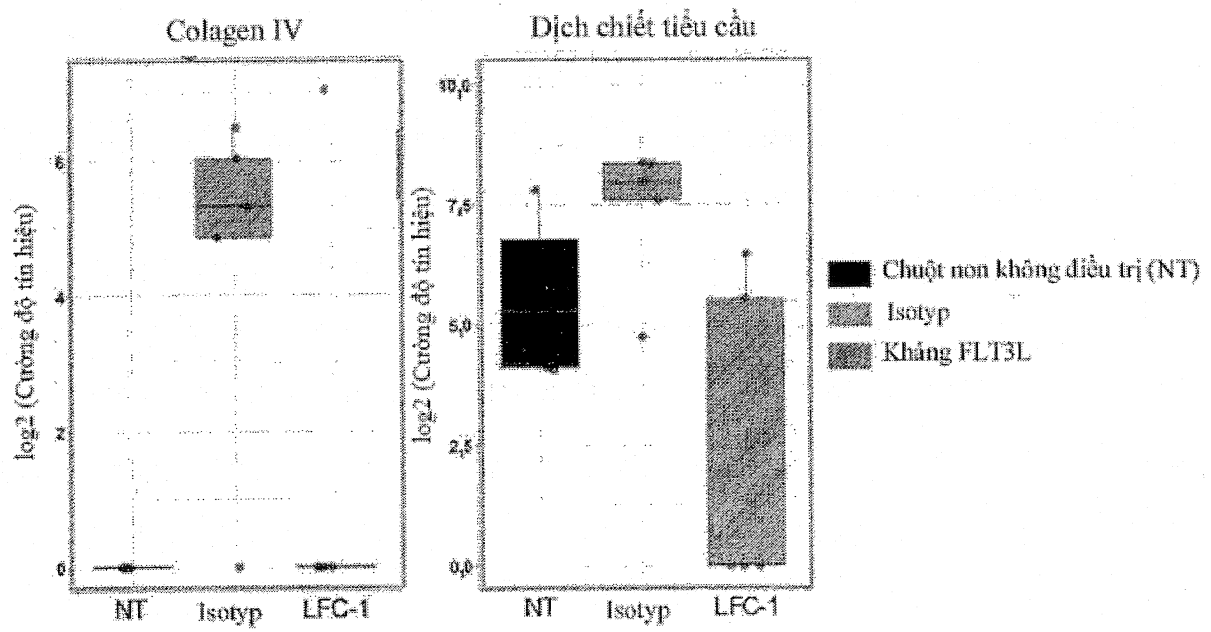


Fig.25

**Fig.26**

**Fig.27**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> VIELA BIO, INC.
 <120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI FLT3L, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY
 <130> 054493-502001WO
 <150> US 62/630,571
 <151> 2018-02-14
 <160> 72
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "AM40_VH"
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Thr Arg Pro Pro Thr Ser Arg Thr Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Gly Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Asn Asp Phe Val Tyr Gly Ser Tyr Arg Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120
 <210> 2
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "AM40_VL"
 <400> 2
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Thr Ser Gly Asn Ile Ala Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
 35 40 45
 Ile Tyr Glu Asp Tyr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Asp
 85 90 95
 Tyr Arg Arg Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "SC4017_VH"
 <400> 3
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Thr Arg Pro Pro Thr Ser Arg Thr Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Gly Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Asn Asp Phe Val Tyr Gly Ser Tyr Arg Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 4
 <211> 111

```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "SC4017_VL"
<400> 4
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Thr Ser Gly Trp Ile Ala Gly Tyr
20 25 30
Phe Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45
Ile Tyr Glu Asp Tyr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80
Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Asp
85 90 95
Tyr Arg Arg Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 5
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT5D9_VH"
<400> 5
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Arg Thr Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Glu Ser Ala Ser Thr Gly Tyr
65 70 75 80
Ile Glu Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Asn Asn Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Arg Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT5D9_VL"
<400> 6
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Thr Ser Gly Asn Ile Ala Gly Tyr
20 25 30
Phe Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45
Ile Tyr Glu Asp Tyr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80
Leu Lys Pro Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Asp
85 90 95
Thr Ser Gln Gly Val Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT8_VH"
<400> 7
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

```

```

65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Ser Ser Gly Tyr Tyr Gly Ala Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln
      100             105             110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115             120
<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT8_VL"
<400> 8
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1      5      10      15
Arg Val Ala Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Gly
      20      25      30
Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Thr Leu Leu
      35      40      45
Ile His Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
      50      55      60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65      70      75      80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
      85      90      95
Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val
      100     105
<210> 9
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT26_VH"
<400> 9
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20      25      30
Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Val Lys Asp Ala Tyr Gly Ser Ser Trp Tyr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
      100     105     110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115     120
<210> 10
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT26_VL"
<400> 10
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1      5      10      15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn
      20      25      30
Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu
      35      40      45
Ile Tyr Ser Asp Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Val Ala Asp Arg Phe Ser
      50      55      60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65      70      75      80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
      85      90      95
Asn Gly Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100     105     110
<210> 11
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX3_VH"
<400> 11

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr
 20 25 30
 Glu Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Pro Ser Gly Gly Lys Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Tyr Ser Arg Trp Phe Gly Gln Leu Gly Phe Tyr Ser His Tyr Ala
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Ser Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 12
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> "DYAX3_VL"

<400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Thr Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Lys Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Thr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Gly
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> "DYAX5_VH"

<400> 13
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ile Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Tyr Ser Arg Trp Phe Gly Gln Leu Gly Phe Tyr Ser His Tyr
 100 105 110
 Ala Met Asp Val Trp Ser Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 14
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> "DYAX5_VL"

<400> 14
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 85 90 95

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

```

<210> 15
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "AM40_VH"
<400> 15
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agttatgctc ttagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaacg cggccgccga cctcccggac agcaagctac 180
gcacagaaat ttcagggcag agtcacgatt accgtggacg aatccacgag cacaggctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gtcaaacgac 300
ttcgtgtacg ggagttatcg tttctggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctcagcg 360

<210> 16
<211> 333
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "AM40_VL"
<400> 16
aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
tcctgcaccc gcaccagtgg gaacattgcc ggctactttg tgcagtggta ccagcagcgc 120
ccgggcagtt ccccccaccac tgtgatctat gaggattacc aacgaccctc tggggtcctc 180
gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
ctgaagactg aggacgagcg tgactactat tgtcagtctt atgatgacta ccggcgggcg 300
gcgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 17
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "SC4017_VH"
<400> 17
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg cacttcagc agttatgctc ttagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaacg cggccgccga cctcccggac agcaagctac 180
gcacagaaat ttcagggcag agtcacgatt accgtggacg aatccacgag cacaggctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gtcaaacgac 300
ttcgtgtacg ggagttatcg tttctggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 18
<211> 333
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "SC4017_VL"
<400> 18
aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
tcctgcaccc gcaccagtgg gtggattgcc ggctactttg tgcagtggta ccagcagcgc 120
ccgggcagtt ccccccaccac tgtgatctat gaggattacc aacgaccctc tggggtcctc 180
gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
ctgaagactg aggacgagcg tgactactat tgtcagtctt atgatgacta ccggcgggcg 300
gcgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 19
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT5D9_VH"
<400> 19
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaaga tttctggagg caccttcagc agttatgctc ttagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatccctg tctttcggac agcaagctac 180
gcacagaaat ttcagggcag agtcacgatt accgtggacg aatccgcgag cacaggctac 240
atagaactga gcagcctgaa atctgaggac acggccacat attactgtgc gtcaaataat 300
tacgtttggg ggagttatcg tttctggggc caggggacca cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 20
<211> 333
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT5D9_VL"
<400> 20
aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtcaccatc 60
tcctgcaccc gcaccagtgg gaacattgcc ggctactttg tgcagtggta ccagcagcgc 120
ccgggcagtt ccccccaccac tgtgatctat gaggattacc aacgaccctc tggggtcctc 180
gatcggttct ctggctccat cgacaggtcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
ctgaagcctg acgacgagcg tgactactat tgtcagtctt atgatgacac ctctcaaggt 300

```

gtgttcggcg cagggacca ggtcacgc cta 333

<210> 21
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "CAT8_VH"
 <400> 21
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc ttagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaagcagc 300
 ggctactacg gggccaattt tgacttctgg gggcaggga ccacggtcac cgtctcagct 360

<210> 22
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "CAT8_VL"
 <400> 22
 cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagcg tccgggaccc ccgggcagag ggtcgccatc 60
 tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga agtggttatg tatactggta tcagcaggctc 120
 ccaggaaagg cccccacat cctcatccat aggaataatc agcgccctc aggggtccct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg 240
 tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcgtgggatg acagcctgag tggttatgtc 300
 ttcggaactg ggaccaaggt caccgctc 327

<210> 23
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "CAT26_VH"
 <400> 23
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc ttagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgt gaaagacgca 300
 tatggcagca gctggtactt ttactacttt gactactggg gccaaggagc aatggtcacc 360
 gtctcgagt 369

<210> 24
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "CAT26_VL"
 <400> 24
 cagtctgtgt tgacgcagcc gccttcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgttctg gaagcagctc caacatcgga atcaatcctg tgaactggta ccaacaactc 120
 cccggaacgg cccccaaagt cctcatttat agtgataaat accggccctc aggggtcgct 180
 gaccgcttct ctggctccaa gtctggaacc tcagcctccc tggccatcag tggcctccag 240
 tctgaggatg aggctgatta ctctgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggtcgcgtc 300
 ttcggaactg ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 25
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "DYAX3_VH"
 <400> 25
 gaagttcaat tgttagatc tgggtggcgt cttgttcagc ctgggtggtc tttacgtctt 60
 tcttgcgctg cttccggatt cactttctct atgtacgaga tgcgttgggt tcgccaaagct 120
 cctgttaaag gtttgagtg ggtttctgtt atcccttctg gtggcaagac tttttatgct 180
 gactccgtta aaggtcgctt cactatctct agagacaact ctaagaatac tctctacttg 240
 cagatgaaca gcttaaggcg tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag atacagcaga 300
 tggttcgggc agctagggtt ttactccac tacgtatgg acgtctggag ccaagggacc 360
 acggtcaccg tctcaagc 378

<210> 26
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "DYAX3_VL"
 <400> 26
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcgcc 60
 atcacttgcc gcgcaagtca gagcatcgac acctatttaa attggatatc gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcattccaagt tggaagacgg ggtcccatca 180
 agattcagtg gcagtgaac tgggacagat ttcactctca ccatcagaag tctgcaacct 240

```

gaagattttg caagttatct ctgtcaacag agctactcta gtccagggat cactttcggc 300
cctgggacca aggtggagat caaa 324
<210> 27
<211> 381
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX5_VH"

<400> 27
gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcgt cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt 60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tcttacatta tggtttgggt tcgccaagct 120
cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctattctt ctggtgggtc tacttcttat 180
gtgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acagccgtgt attactgtac gagatacagc 300
agatggttcg ggcagctagg gttttactcc cactacgcta tggacgtctg gagccaaggg 360
accacggcca ccgtctcaag c 381
<210> 28
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX5_VL"
<400> 28
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaaagtg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatacagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgtg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaa 324
<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "AM40 & SC4017 & CAT5D9_HCDR1"
<400> 29
Ser Tyr Ala Leu Ser
1 5
<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> AM40 & SC4017_HCDR2"
<400> 30
Thr Arg Pro Pro Thr Ser Arg Thr Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly
<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "AM40 & SC4017_HCDR3"
<400> 31
Asn Asp Phe Val Tyr Gly Ser Tyr Arg Phe
1 5 10
<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "AM40 & CAT5D9_LCDR1"
<400> 32
Thr Arg Thr Ser Gly Asn Ile Ala Gly Tyr Phe Val Gln
1 5 10
<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "AM40 & SC4017 & CAT5D9_LCDR2"
<400> 33
Glu Asp Tyr Gln Arg Pro Ser
1 5
<210> 34
<211> 10
<212> PRT

```

```

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "AM40 & SC4017_LCDR3"
<400> 34
Gln Ser Tyr Asp Asp Tyr Arg Arg Ala Ala
1          5          10
<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "SC4017_LCDR1"
<400> 35
Thr Arg Thr Ser Gly Trp Ile Ala Gly Tyr Phe Val Gln
1          5          10
<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT5D9_HCDR2"
<400> 36
Gly Ile Ile Pro Val Phe Arg Thr Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1          5          10          15
Gly
<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT5D9_HCDR3"
<400> 37
Asn Asn Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Arg Phe
1          5          10
<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT5D9_LCDR3"
<400> 38
Gln Ser Tyr Asp Asp Thr Ser Gln Gly Val
1          5          10
<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT8_HCDR1"
<400> 39
Ser Tyr Ala Met Ser
1          5
<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT8 & CAT26_HCDR2"
<400> 40
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1          5          10          15
Gly
<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT8_HCDR3"
<400> 41
Ser Ser Gly Tyr Tyr Gly Ala Asn Phe Asp Phe
1          5          10
<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT8_LCDR1"
<400> 42
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Gly Tyr Val Tyr

```

```

1           5           10
<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT8_LCDR2"
<400> 43
Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1           5
<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT8_LCDR3"
<400> 44
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Tyr Val
1           5           10
<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT26_HCDR1"
<400> 45
Ser Tyr Ala Val Ser
1           5
<210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT26_HCDR3"
<400> 46
Asp Ala Tyr Gly Ser Ser Trp Tyr Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1           5           10
<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT26_LCDR1"
<400> 47
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Pro Val Asn
1           5           10
<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT26_LCDR2"
<400> 48
Ser Asp Lys Tyr Arg Pro Ser
1           5
<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT26_LCDR3"
<400> 49
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Arg Val
1           5           10
<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX3_HCDR1"
<400> 50
Met Tyr Glu Met Arg
1           5
<210> 51
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX3_HCDR2"

```

```

<400> 51
Val Ile Pro Ser Gly Gly Lys Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1           5           10           15
<210> 52
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX3 & DYAX5_HCDR3"
<400> 52
Tyr Ser Arg Trp Phe Gly Gln Leu Gly Phe Tyr Ser His Tyr Ala Met
1           5           10           15
Asp Val
<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX3_LCDR1"
<400> 53
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Thr Tyr Leu Asn
1           5           10
<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX3_LCDR2"
<400> 54
Ala Ala Ser Lys Leu Glu Asp
1           5
<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX3_LCDR3"
<400> 55
Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Gly Ile Thr
1           5           10
<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX5_HCDR1"
<400> 56
Ser Tyr Ile Met Val
1           5
<210> 57
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX5_HCDR2"
<400> 57
Ser Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1           5           10           15
Gly
<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX5_LCDR1"
<400> 58
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1           5           10
<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "DYAX_LCDR2"
<400> 59
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1           5
<210> 60
<211> 10

```

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "DYAX_LCDR3"
 <400> 60
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Trp Thr
 1 5 10

<210> 61
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "AM40_HC"
 <400> 61

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Thr Arg Pro Pro Thr Ser Arg Thr Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Gly Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Asn Asp Phe Val Tyr Gly Ser Tyr Arg Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys
 <210> 62
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "AM40_LC"
 <400> 62

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Thr Ser Gly Asn Ile Ala Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
 35 40 45
 Ile Tyr Glu Asp Tyr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Asp
 85 90 95
 Tyr Arg Arg Ala Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 63

<211> 1347

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> "AM40_HC"

<400> 63

cagggtgcagc	tggtgacagtc	tggtggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggtc	60
tcctgcgaagg	cttctggagg	caccttcagc	agttatgctc	ttagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaacg	cggccgccga	cctcccgac	agcaagctac	180
gcacagaaat	ttcagggcag	agtcacgatt	accgtggacg	aatccacgag	cacaggctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gtcaaacgac	300
ttcgtgtacg	ggagttatcg	tttctggggc	caagggaacca	cggtcacctg	ctcctcagcg	360
tcgaccaagg	gcccattccgt	cttccccctg	gcacctcctc	ccaagagcac	ctctgggggc	420
acagcggccc	tggtgctcct	ggtcaaggac	tacttccccg	aaccggtgac	ggtgtcctgg	480
aactcaggcg	ctctgaccag	cggcgtgcac	accttccccg	ctgtcctaca	gtcctcagga	540
ctctactccc	tcagcagcgt	ggtgaccgtg	ccctccagca	gcttgggcac	ccagacctac	600
atctgcaacg	tgaatcacaa	gcccagcaac	accaaggtgg	acaagagagt	tgagcccaaa	660
tcctgtgaca	aaactcacac	atgccaccg	tgcccagcac	ctgaattcga	ggggggaccg	720
tcagtcttcc	tcttcccccc	aaaaccctaa	gacacctca	tgatctcccg	gacctctgag	780
gtcacatgcg	tggtggtgga	cgtagccac	gaagaccctg	aggtcaagtt	caactggtac	840
gtggacggcg	tggaagtgca	taatgccaa	acaaagccgc	gggaggagca	gtacaacagc	900
acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcaccgtc	ctgcaccagg	actggctgaa	tgccaaggag	960
tacaagtga	aggtctccaa	caaagccctc	ccagcctcca	tcgagaaaac	catctccaaa	1020
gcccgaaggc	agccccgaga	accacaggtc	tacaccctgc	ccccatcccg	ggaggagatg	1080
accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctatcccg	cgacatcgcc	1140
gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgcc	tcccgtgctg	1200
gactccgacg	gctccttctt	cctctatagc	aagctcaccg	tggaacaagag	cagggtggcag	1260
caggggaacg	tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggctc	tgcaacaacca	ctacacgcag	1320
aagagcttaa	gcctgtctcc	gggtaaa				1347

<210> 64

<211> 651

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> "AM40_LC"

<400> 64

aattttatgc	tgactcagcc	ccactctgtg	tcggagtctc	cggggaagac	ggtaaccatc	60
tcctgcaccc	gcaccagtgg	gaacattgcc	ggctactttg	tgcaagtggta	ccagcagcgc	120
ccgggcagtt	ccccaccac	tgtgatctat	gaggattacc	aacgaccctc	tggtgtccct	180
gatcggttct	ctggctccat	cgacagctcc	tcctaactctg	cctccctcac	catctctgga	240
ctgaagactg	aggagaggc	tgactactat	tgctagctct	atgatgacta	ccggcgggcg	300
gcgttcggcg	gagggaccaa	gctgaccgtc	ctaggtcagc	ccaaggcggc	gccctcggtc	360
actctgttcc	cgccctctc	tgaggagctt	caagccaaca	aggccacact	ggtgtgtctc	420
ataagtgaat	tctacccggg	agccgtgaca	gtggcctgga	aggcagatag	cagccccgtc	480
aaggcgggag	tgagagacc	cacaccctcc	aaacaaagca	acaacaagta	cgcgccagc	540
agctacctga	gcctgacgcc	tgagcagtg	aagtcccaca	gaagctacag	ctgccaggtc	600
acgcatgaag	ggagcaccgt	ggagaagaca	gtggccccta	cagaatgttc	a	651

<210> 65

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> "SC4017_HC"

<400> 65

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Thr Arg Pro Pro Thr Ser Arg Thr Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Gly Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Asn Asp Phe Val Tyr Gly Ser Tyr Arg Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 66

<211> 217

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> "SC4017_LC"

<400> 66

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Thr Ser Gly Trp Ile Ala Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
 35 40 45
 Ile Tyr Glu Asp Tyr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80

```

<210> 69
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> "CAT5D9_HC"
<400> 69
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ile Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

```

Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Val Phe Arg Thr Ala Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Glu Ser Ala Ser Thr Gly Tyr
 65 70 75 80
 Ile Glu Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Asn Asn Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Arg Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 70
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> "CAT5D9_LC"
 <400> 70

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Thr Ser Gly Asn Ile Ala Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
 35 40 45
 Ile Tyr Glu Asp Tyr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80
 Leu Lys Pro Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Asp
 85 90 95
 Thr Ser Gln Gly Val Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 71

<211> 1346

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> "CAT5D9_HC"

<400> 71

aggtgcagct	gggtgcagtct	ggggctgagg	tgaagaagcc	tgggtcctcg	gtgaaggtct	60
cctgcaaggc	ttctggaggc	accttcagca	gttatgtctct	tagctgggtg	cgacaggccc	120
ctggacaagg	gcttgagtgg	atgggaacgc	ggccgccgac	ctcccggaca	gcaagctacg	180
cacagaaatt	tcagggcaga	gtcacgatta	ccgtggacga	atccacgagc	acaggctaca	240
tggagctgag	cagcctgaga	tctgaggaca	cggccgtgta	ttactgtgcg	tcaaacgact	300
tctgtgtacg	gagttatcgt	ttctggggcc	aagggaccac	ggtcaccgtc	tcctcagcgt	360
cgaccaagg	cccattccgtc	ttccccctgg	cacctcctc	caagagcacc	tctgggggca	420
cagcgccct	gggtgcctg	gtcaaggact	acttccccga	accggtgacg	gtgtcctgga	480
actcaggcgc	tctgaccagc	ggcgtgcaca	ccttccccgc	tgctctacag	tcctcaggac	540
tctactccct	cagcagcgtg	gtgaccgtgc	cctccagcag	cttgggcacc	cagacctaca	600
tctgcaacgt	gaatcacaa	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagagagtt	gagcccaaat	660
cttgtgacaa	aactcacaca	tgcccaccgt	gcccagcacc	tgaattcgag	gggggaccgt	720
cagtcttct	cttcccccca	aaacccaagg	acacctcat	gatctcccgg	acccttgagg	780
tcacatcgct	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	aactgggtacg	840
tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	tacaacagca	900
cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgaccaggga	ctggctgaat	ggcaaggagt	960
acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc	cagcctccat	cgagaaaacc	atctccaaag	1020
ccaaaggcca	gccccgagaa	ccacaggtct	acaccctgcc	cccatcccgg	gaggagatga	1080
ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc	gacatcgccg	1140
tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	cccgtgctgg	1200
actccgacgg	ctccttcttc	ctctatagca	agctcaccgt	ggacaagagc	aggtggcagc	1260
aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	tacacgcaga	1320
agagcttaag	cctgtctccg	ggtaaa				1346

<210> 72

<211> 651

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> "CAT5D9_LC"

<400> 72

aattttatgc	tgactcagcc	ccactctgtg	tcggagtctc	cggggaagac	ggtcaccatc	60
tcctgcaccc	gcaccagtgg	gaacattgcc	ggctactttg	tgcaagtggta	ccagcagcgc	120
ccgggcagtt	ccccaccac	tgatgatctat	gaggattacc	aacgaccctc	tggggctcct	180
gatcggttct	ctggctccat	cgacaggtcc	tccaactctg	cctccctcac	catctctgga	240
ctgaagcctg	acgacgaggc	tgactactat	tgctcagtctt	atgatgacac	ctctcaaggt	300
gtgttcggcg	cagggaacca	ggtcaccgtc	ctaggtcagc	ccaaggcggc	gccctcggtc	360
actctgttcc	cgccctcctc	tgaggagctt	caagccaaca	aggccacact	ggtgtgtctc	420
ataagtgact	tctacccggg	agccgtgaca	gtggcctgga	aggcagatag	cagccccgtc	480
aaggcgggag	tggagaccac	cacaccctcc	aaacaaagca	acaacaagta	cgcgcccgag	540
agctacctga	gcctgacgct	tgagcagtgg	aagtcccaca	gaagctacag	ctgccaggtc	600
acgcatgaag	ggagcacctg	ggagaagaca	gtggccccta	cagaatgttc	a	651