



(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) 

1-0023152

(51)⁷ **C07K 16/28, A61K 39/395**

(13) **B**

(21) 1-2011-02740

(22) 24.03.2010

(86) PCT/US2010/028470 24.03.2010

(87) WO2010/111367 30.09.2010

(30) 61/163,222 25.03.2009 US

(45) 25.02.2020 383

(43) 25.05.2012 290

(73) Genentech, Inc. (US)

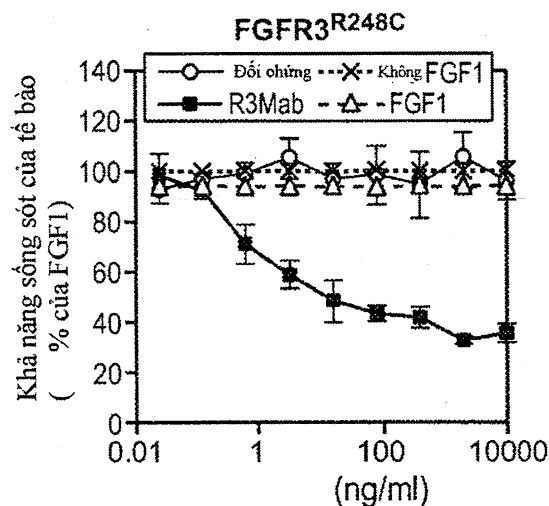
1 DNA Way, South San Francisco, California 94080, United States of America

(72) ASHKENAZI, Avi (US), QING, Jing (US), WIESMANN, Christian (DE), WU, Yan (US)

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

(54) **KHÁNG THỂ ĐỐI KHÁNG KHÁNG THỤ THỂ YẾU TỔ TĂNG TRƯỞNG NGUYÊN BÀO SỢI 3 (FGFR3) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Sáng chế đề xuất các kháng thể đối kháng kháng FGFR3, polynucleotit mã hóa kháng thể này, tế bào chủ chứa vector chứa polynucleotit này. Ngoài ra sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể đối kháng kháng FGFR3 và dược phẩm chứa kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sinh học phân tử. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các kháng thể đối kháng kháng FGFR3, và sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF) và các thụ thể của chúng (FGFR) đóng vai trò thiết yếu trong sự phát triển phôi, sự cân bằng nội mô và cơ chế chuyển hóa (1-3). Ở người, có 22 FGF (FGF1-14, FGF16-23) và bốn thụ thể FGF có miền tyrosin kinaza (FGFR1-4). FGFR gồm vùng liên kết phối tử ngoại bào, với hai hoặc ba miền giống globulin miễn dịch (IgD1-3), vùng xuyên màng một lần, và miền tyrosin kinaza tế bào chất, được phân tách. Mỗi thụ thể trong số FGFR1, 2 và 3 có hai đồng dạng ghép nối xen kẽ chính, được ký hiệu là IIIb và IIIc. Các isoform này khác biệt ở khoảng 50 axit amin ở nửa thứ hai của IgD3, và có sự phân bố mô đặc trưng và tính đặc hiệu phối tử. Nhìn chung, đồng dạng IIIb được tìm thấy ở các tế bào biểu mô, trong khi đó IIIc được biểu hiện ở tế bào trung mô. Nhờ vào việc liên kết FGF phối hợp với heparan sulfat proteoglycan, FGFR dimer hóa và trở nên bị phosphoryl hóa ở các gốc tyrosin đặc hiệu. Điều này tạo thuận lợi cho việc huy động protein thích ứng quang trọng, như cơ chất FGFR 2 α (FRS2 α), dẫn đến việc hoạt hóa nhiều thác dẫn truyền tín hiệu, gồm protein kinaza được hoạt hóa bởi mitogen (MAPK) và con đường PI3K-AKT (1, 3, 4). Do đó, FGF và thụ thể cùng họ của chúng điều hòa phạm vi rộng các quá trình tế bào, gồm quá trình tăng sinh, quá trình biệt hóa, di trú và sống sót, theo cách phụ thuộc vào hoàn cảnh.

FGFR bị hoạt hóa bất thường có liên quan đến các bệnh ác tính ở người cụ thể (1, 5). Cụ thể là, sự hoán vị nhiễm sắc thể t(4;14) (p16.3;q32) xuất hiện ở khoảng từ 15 đến 20% bệnh nhân đa u tủy, dẫn đến sự biểu hiện quá mức của FGFR3 và tương quan với tổng thời gian sống sót ngắn hơn (6-9). FGFR3 còn liên quan đến việc gây ra tính kháng hóa chất cho các dòng tế bào u tủy trong môi trường nuôi cấy (10), phù hợp với đáp ứng lâm sàng kém của bệnh nhân t(4;14)+ với hóa trị liệu thông thường (8). Sự biểu hiện quá mức của FGFR3 được hoạt hóa do đột biến là đủ để kích thích sự biến nạp gây ung thư trong tế bào tạo máu và nguyên bào sợi (11-14, 15), mô hình chuột chuyển gen (16), và mô hình cấy ghép tủy xương chuột (16, 17). Do đó, FGFR3 được đề xuất là đích điều trị

tiềm năng trong bệnh đa u tuỷ. Quả thực, một số chất ức chế phân tử nhỏ gắn đích FGFR, mặc dù không chọn lọc đối với FGFR3 và có hoạt tính ức chế chéo đối với các kinaza khác, đã thể hiện tác dụng gây độc tế bào kháng tế bào u tuỷ dương tính với FGFR3 trong môi trường nuôi cấy và trong mẫu chuột (18-22).

Sự biểu hiện quá mức FGFR3 còn được dẫn chứng bằng tài liệu ở tỷ lệ cao bệnh ung thư bàng quang (23, 24). Ngoài ra, các đột biến hoạt hóa soma ở FGFR3 đã được xác định ở 60-70% của caxinom dạng nhú và 16-20% caxinom bàng quang xâm nhập cơ (24, 25). Trong thử nghiệm nuôi cấy tế bào, sự can thiệp ARN (11, 26) hoặc đoạn kháng thể Fv chuỗi đơn FGFR3 ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư bàng quang (27). Nghiên cứu gần đây chứng minh rằng thể liên hợp kháng thể FGFR3-độc tố làm yếu sự phát triển mô ghép của dòng tế bào ung thư bàng quang do sự phân bố độc tố bởi FGFR3 vào khối u (28). Tuy nhiên, vẫn chưa rõ là sự dẫn truyền tín hiệu FGFR3 có thực sự là yếu tố gây ung thư điều khiển sự phát triển *in vivo* của khối u bàng quang hay không. Hơn nữa, khả năng điều trị để gắn đích FGFR3 trong ung thư bàng quang chưa được xác định trên cơ sở các mô hình *in vivo*. Các công bố liên quan đến FGFR3 và các kháng thể kháng FGFR3 gồm công bố Patent Mỹ số 2005/0147612; Rauchenberger et al, J Biol Chem 278 (40):38194-38205 (2003); WO2006/048877; Martinez-Torrecuadrada et al, (2008) Mol Cancer Ther 7(4): 862-873; WO2007/144893; Trudel et al. (2006) 107(10): 4039-4046; Martinez-Torrecuadrada et al (2005) Clin Cancer Res 11 (17): 6280-6290; Gomez-Roman et al (2005) Clin Cancer Res 11:459-465; Drenth, R et al (2007) Proceedings of AACR Annual Meeting, Abstract No. 2080; WO2010/002862, Trudel et al (2004), Blood, vol. 204. No. 11, part 1, page 680A.

Rõ ràng là vẫn cần các chất có các tính chất lâm sàng tối ưu để phát triển thành dược chất. Sáng chế nêu trong bản mô tả này đáp ứng được các yêu cầu này và tạo ra cả các lợi ích khác nữa.

Tất cả các tài liệu tham khảo được nêu trong bản mô tả, bao gồm các ứng dụng sáng chế và các công bố, được kết hợp đầy đủ bằng cách tham khảo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được dựa một phần vào việc xác định nhiều chất liên kết FGFR3 (như các kháng thể, và các đoạn của chúng). FGFR3 là đích trị liệu quan trọng và có lợi, và sáng chế đề xuất chế phẩm và phương pháp dựa trên sự liên kết của các chất này với FGFR3. Chất liên kết FGFR3 theo sáng chế, như được nêu trong bản mô tả này, tạo ra

được chất và chất chẩn đoán quan trọng để sử dụng cho các trình trạng bệnh lý có liên quan đến sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của con đường dẫn truyền tín hiệu FGFR3. Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp, chế phẩm, bộ kit, và sản phẩm của quá trình sản xuất có liên quan đến liên kết FGFR3.

Sáng chế đề xuất các kháng thể mà liên kết với FGFR3. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập mà liên kết FGFR3. Theo một số phương án, kháng thể liên kết với đồng dạng FGFR3 IIIb và/hoặc đồng dạng FGFR3 IIIc. Theo một số phương án, kháng thể liên kết với FGFR3 được gây đột biến (ví dụ, một hoặc nhiều FGFR3 IIIb R248C, S249C, G372C, Y375C, K652E, và/hoặc một hoặc nhiều FGFR3 IIIc R248C, S249C, G370C, Y373C, K650E). Theo một số phương án, kháng thể liên kết với FGFR3 dạng monome (ví dụ, đồng dạng FGFR3 IIIb và/hoặc đồng dạng IIIc monome). Theo một số phương án, kháng thể này thúc đẩy sự tạo thành FGFR3 dạng monome, như bằng cách làm ổn định dạng FGFR3 monome so với dạng FGFR3 dimer.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR3 được phân lập, trong đó dạng IgG có độ dài đầy đủ của kháng thể liên kết với FGFR3 của người có K_d là 1×10^{-7} hoặc lớn hơn. Như đã được biết trong lĩnh vực, ái lực liên kết của phối tử đối với thụ thể của nó có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm, và được biểu diễn theo nhiều giá trị định lượng khác nhau. Do đó, theo một phương án, ái lực liên kết được biểu diễn dưới dạng giá trị K_d và phản ánh ái lực liên kết nội tại (ví dụ, có tác dụng khả lực được giảm tối đa). Thông thường và tốt hơn nữa, ái lực liên kết được xác định *in vitro*, cho dù trong môi trường không chứa tế bào hay kết hợp tế bào. Thử nghiệm bất kỳ trong số các thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực, gồm các thử nghiệm được nêu trong bản mô tả này, có thể được sử dụng để thu các số đo ái lực liên kết, gồm, ví dụ, Biacore, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), và ELISA. Theo một số phương án, dạng IgG có chiều dài đầy đủ của kháng thể liên kết FGFR3 của người có K_d là 1×10^{-8} hoặc lớn hơn, có K_d là 1×10^{-9} hoặc lớn hơn, hoặc có K_d là 1×10^{-10} hoặc lớn hơn.

Thông thường, các kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế là các kháng thể đối vận. Do vậy, theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế hoạt tính FGFR3 (ví dụ, hoạt tính FGFR3-IIIb và/hoặc FGFR3-IIIc). Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR3 (thường ở dạng hóa trị hai) không có chức năng chủ vận FGFR3 đáng kể. Theo một số phương án, kháng thể đối vận kháng FGFR3 (thường ở dạng hóa trị hai) có

ít hoặc không có chức năng chủ vận FGFR3. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế (thường ở dạng hóa trị hai) không thể hiện mức hoạt tính chủ vận FGFR3 cao hơn mức cơ bản có ý nghĩa thống kê.

Theo một khía cạnh, sự liên kết của kháng thể với FGFR3 có thể ức chế quá trình đime hóa thụ thể này với đơn vị khác của thụ thể này, nhờ sự hoạt hóa thụ thể này bị ức chế (do, ít nhất một phần, sự thiếu quá trình đime hóa thụ thể). Tác dụng ức chế có thể là trực tiếp hoặc gián tiếp.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng FGFR3 mà không có hoạt tính gây chết tế bào theo chương trình đáng kể (ví dụ, không gây ra sự chết tế bào theo chương trình, ví dụ, tế bào caxinoma tế bào chuyển tiếp hoặc tế bào đa u tủy, như tế bào đa u tủy có sự hoán vị FGFR3, như hoán vị t(4;14)). Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR3 có ít hoặc không có chức năng gây chết tế bào theo chương trình. Theo một số phương án, các kháng thể FGFR3 không có chức năng gây chết tế bào theo chương trình cao hơn mức cơ bản có ý nghĩa thống kê.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng FGFR3 mà không gây ra sự điều hòa giảm FGFR3 đáng kể. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR3 gây ra ít hoặc không gây ra sự điều hòa giảm thụ thể. Theo một số phương án, các kháng thể FGFR3 không gây ra sự điều hòa giảm thụ thể cao hơn mức cơ bản có ý nghĩa thống kê.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng FGFR3 mà có chức năng hiệu ứng. Theo một phương án, chức năng hiệu ứng bao gồm tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Theo một phương án, kháng thể kháng FGFR3 (theo một số phương án, kháng thể trần kháng FGFR3) có khả năng tiêu diệt tế bào, theo một số phương án, tế bào đa u tủy (ví dụ, tế bào đa u tủy có sự hoán vị, ví dụ, hoán vị t(4;14)). Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR3 có khả năng tiêu diệt tế bào mà biểu hiện khoảng 10 000 phân tử FGFR3 cho mỗi tế bào hoặc nhiều hơn (như khoảng 11 000, khoảng 12 000, khoảng 13 000, khoảng 14 000, khoảng 15 000, khoảng 16 000, khoảng 17 000, khoảng 18 000 hoặc nhiều phân tử FGFR3 hơn cho mỗi tế bào). Theo các phương án khác, tế bào biểu hiện khoảng 2000, khoảng 3000, khoảng 4000, khoảng 5000, khoảng 6000, khoảng 7000, khoảng 8000, hoặc nhiều phân tử FGFR3 hơn cho mỗi tế bào.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế ức chế hoạt tính FGFR3 cơ định. Theo một số phương án, hoạt tính FGFR3 cơ định là hoạt tính FGFR3 phụ thuộc phối tử. Theo một số phương án, hoạt tính cấu trúc của FGFR3 là hoạt tính FGFR3 cơ định độc lập với phối tử.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3 chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{R248C}. Trong bản mô tả này thuật ngữ “chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{R248C}” được hiểu là bao gồm FGFR3-IIIb^{R248C} và FGFR3-IIIc^{R248C}, cũng như các dạng FGFR3 khác chứa đột biến R thành C ở vị trí tương ứng với FGFR3-IIIb R248. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực biết cách để sắp xếp thẳng hàng trình tự FGFR3 theo thứ tự xác định các gốc tương ứng giữa các trình tự FGFR3 tương ứng, ví dụ, sắp xếp thẳng hàng trình tự FGFR3- IIIc với trình tự FGFR3- IIIb để xác định vị trí ở FGFR3 tương ứng với vị trí R248 ở FGFR3-IIIb. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3-IIIb^{R248C} và/hoặc FGFR3-IIIc^{R248C}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3 chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{K652E}. Để thuận tiện, thuật ngữ “chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{K652E}” được hiểu là bao gồm FGFR3-IIIb^{K652E} và FGFR3-IIIc^{K650E}, cũng như các dạng FGFR3 khác bao gồm chứa đột biến K thành E ở vị trí tương ứng với FGFR3-IIIb K652. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực biết cách sắp xếp thẳng hàng trình tự FGFR3 theo thứ tự xác định các gốc tương ứng giữa các trình tự FGFR3 tương ứng, ví dụ, sắp xếp thẳng hàng trình tự FGFR3- IIIc với trình tự FGFR3- IIIb để xác định vị trí ở FGFR3 tương ứng với vị trí K652 ở FGFR3- IIIb. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3-IIIb^{K652E} và/hoặc FGFR3-IIIc^{K650E}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3 chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{S249C}. Để thuận tiện, thuật ngữ “chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{S249C}” được hiểu là bao gồm FGFR3-IIIb^{S249C} và FGFR3-IIIc^{S249C}, cũng như các dạng FGFR3 khác chứa đột biến S thành C ở vị trí tương ứng với FGFR3-IIIb S249. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3-IIIb^{S249C} và/hoặc FGFR3-IIIc^{S249C}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3 chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{G372C}. Để thuận tiện, thuật ngữ “chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{G372C}” được hiểu là bao gồm FGFR3-IIIb^{G372C} và FGFR3-IIIc^{G370C}, cũng như các dạng FGFR3 khác chứa đột biến G thành C ở vị trí tương ứng với FGFR3-IIIb G372.

Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3-IIIb^{G372C} và/hoặc FGFR3-IIIc^{G370C}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3 chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{Y375C}. Để thuận tiện, thuật ngữ “chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{Y375C}” được hiểu là bao gồm FGFR3-IIIb^{Y375C} và FGFR3-IIIc^{Y373C}, cũng như các dạng FGFR3 khác chứa đột biến S thành C ở vị trí tương ứng với FGFR3-IIIb S249. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3-IIIb^{Y375C} và/hoặc FGFR3-IIIc^{Y373C}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế (a) FGFR3-IIIb^{K652E} và (b) một hoặc nhiều FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C}, và FGFR3-IIIb^{G372C}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế (a) FGFR3-IIIc^{K650E} và (b) một hoặc nhiều FGFR3-IIIc^{R248C}, FGFR3-IIIc^{Y373C}, FGFR3-IIIc^{S249C}, và FGFR3-IIIc^{G370C}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế (a) FGFR3-IIIb^{R248C} và (b) một hoặc nhiều FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C}, và FGFR3-IIIb^{G372C}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế (a) FGFR3-IIIc^{R248C} và (b) một hoặc nhiều FGFR3-IIIc^{K650E}, FGFR3-IIIc^{Y373C}, FGFR3-IIIc^{S249C}, và FGFR3-IIIc^{G370C}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế (a) FGFR3-IIIb^{G372C} và (b) một hoặc nhiều FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C}, và FGFR3-IIIb^{R248C}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế (a) FGFR3-IIIc^{G370C} và (b) một hoặc nhiều FGFR3-IIIc^{K650E}, FGFR3-IIIc^{Y373C}, FGFR3-IIIc^{S249C}, và FGFR3-IIIc^{R248C}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C}, và FGFR3-IIIb^{G372C}.

Theo một khía cạnh, các kháng thể kháng FGFR3 ức chế FGFR3-IIIc^{R248C}, FGFR3-IIIc^{K650E}, FGFR3-IIIc^{Y373C}, FGFR3-IIIc^{S249C}, và FGFR3-IIIc^{G370C}.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR3 được phân lập gồm:

các trình tự vùng siêu biến (HVR):

- (i) HVR-L1 chứa trình tự A1-A11, trong đó A1-A11 là RASQDVDTSLA (SEQ ID NO:87),
- (ii) HVR-L2 chứa trình tự B1-B7, trong đó B1-B7 là SASFLYS (SEQ ID NO:88),
- (iii) HVR-L3 chứa trình tự C1-C9, trong đó C1-C9 là QQSTGHPQT (SEQ ID NO:89),
- (iv) HVR-H1 chứa trình tự D1-D10, trong đó D1-D10 là GFTFTSTGIS (SEQ ID NO:84),
- (v) HVR-H2 chứa trình tự E1-E18, trong đó E1-E18 là GRIYPTSGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:85), và
- (vi) HVR-H3 chứa trình tự F1-F20, trong đó F1-F20 là ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY (SEQ ID NO:86).

Kháng thể kháng FGFR3 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, trong đó mỗi vùng, theo thứ tự, chứa SEQ ID NO: 84, 85, 86, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3, trong đó mỗi vùng, theo thứ tự, chứa SEQ ID NO:87, 88, 89.

Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1-18, 48-131 và 140-145 được đánh số đối với từng HVR (tức là, H1, H2 hoặc H3) như được thể hiện trong Fig.1, việc đánh số là phù hợp với hệ thống đánh số Kabat như được nêu dưới đây.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng FGFR3 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:132 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng FGFR3 chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 133, và vùng biến đổi chuỗi nặng.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng FGFR3 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:132 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:133.

Một số kháng thể được mô tả ở đây chứa (a) chuỗi nhẹ gồm (i) HVR-L1 chứa trình tự LASQTIGTWLA (SEQ ID NO:157); (ii) HVR-L2 gồm trình tự LLIYAATSLAD (SEQ ID NO:160); và (iii) HVR-L3 chứa trình tự QQLYSPPWT (SEQ ID NO:163) ; và/hoặc (b) chuỗi nặng gồm (i) HVR-H1 chứa trình tự GYAFTSYNMY (SEQ ID NO:166); (ii) HVR-H2 chứa trình tự WIGYIDPYIGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:169); và (iii) HVR-H3 chứa trình tự ARWGDYDVGAMDY (SEQ ID NO:172). Một

số kháng thể được mô tả ở đây chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 4D5 được làm tương thích với người (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (còn được đề cập trong bằng Mỹ số 6,407,213 và Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093) như được mô tả trong SEQ ID NO:173 dưới đây.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Asn** Thr Ala
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
Ser **Arg** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln **His** Tyr Thr Thr Pro Pro
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID
NO:173) (các gốc HVR được gạch chân)

Trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ của huMAb4D5-8 có thể được biến đổi tại một hoặc nhiều vị trí 30, 66, và 91 (Asn, Arg, và His như được thể hiện lần lượt bằng chữ in đậm/in nghiêng ở trên). Trong một ví dụ cụ thể, trình tự huMAb4D5-8 được biến đổi chứa Ser ở vị trí 30, Gly ở vị trí 66, và/hoặc Ser ở vị trí 91. Do đó, theo một phương án, kháng thể có thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:174 dưới đây:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val **Ser** Thr Ala
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
Ser **Gly** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln **Ser** Tyr Thr Thr Pro Pro
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID
NO:174) (các gốc HVR được gạch chân)

Các gốc được thể đổi với huMAb4D5-8 được thể hiện bằng chữ in đậm/in nghiêng.

Các kháng thể có thể chứa trình tự miền biến đổi vùng khung thích hợp bất kỳ, với điều kiện là hoạt tính liên kết với FGFR3 gần như được duy trì. Ví dụ, các kháng thể có thể chứa trình tự liên ứng khung chuỗi nặng phân nhóm III của người. Trong một ví dụ về các kháng thể này, trình tự liên ứng khung chứa đột biến thể ở vị trí 71, 73, và/hoặc

78. Trong một số ví dụ về các kháng thể này, vị trí 71 là A, 73 là T và/hoặc 78 là A. Theo một ví dụ, các kháng thể này chứa trình tự khung miền biến đổi chuỗi nặng của huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (còn được đề cập đến trong patent Mỹ số 6,407,213 & 5,821,337, và Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093). Trong một ví dụ, các kháng thể này còn chứa trình tự liên ứng khung chuỗi nhẹ κI của người. Trong một ví dụ cụ thể, các kháng thể này chứa trình tự HVR chuỗi nhẹ của huMAb4D5-8 như được mô tả trong patent Mỹ số 6,407,213 & 5,821,337.) Trong một ví dụ, các kháng thể chứa trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ của huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (còn được đề cập đến trong patent Mỹ số 6,407,213 & 5,821,337, và Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093).

Kháng thể có thể chứa miền biến đổi chuỗi nặng, trong đó trình tự khung chứa trình tự SEQ ID NO:19 và 203-205, 20 và 206-208, 21 và 209-211, 22 và 212-214, 23 và 215-217, 24 và 218-220, 25 và 221-223, 26 và 224-226, 27 và 227-229, 28 và 230-232, 29 và 233-235, 30 và 236-238, 31 và 239-241, 32 và 242-244, 33 và 245-247, 34 và 248-250, 35 và 251-253, 36 và 254-256, và/hoặc 37 và 257-259, và trình tự HVR H1, H2, và H3 lần lượt là SEQ ID NO:13, 14 và/hoặc 15. Trong một ví dụ khác, trình tự khung chứa trình tự của SEQ ID NO: 19 và 203-205, 20 và 206-208, 21 và 209-211, 22 và 212-214, 23 và 215-217, 24 và 218-220, 25 và 221-223, 26 và 224-226, 27 và 227-229, 28 và 230-232, 29 và 233-235, 30 và 236-238, 31 và 239-241, 32 và 242-244, 33 và 245-247, 34 và 248-250, 35 và 251-253, 36 và 254-256, và/hoặc 37 và 257-259, và trình tự HVR H1, H2, và H3 lần lượt là SEQ ID NO:48, 49 và/hoặc 50. Trong một ví dụ khác nữa, trình tự khung chứa trình tự của SEQ ID NOS: 19 và 203-205, 20 và 206-208, 21 và 209-211, 22 và 212-214, 23 và 215-217, 24 và 218-220, 25 và 221-223, 26 và 224-226, 27 và 227-229, 28 và 230-232, 29 và 233-235, 30 và 236-238, 31 và 239-241, 32 và 242-244, 33 và 245-247, 34 và 248-250, 35 và 251-253, 36 và 254-256, và/hoặc 37 và 257-259, và trình tự HVR H1, H2, và H3 lần lượt là SEQ ID NO:84, 85, và/hoặc 86. Trong một ví dụ khác, trình tự khung chứa trình tự của SEQ ID NO: 19 và 203-205, 20 và 206-208, 21 và 209-211, 22 và 212-214, 23 và 215-217, 24 và 218-220, 25 và 221-223, 26 và 224-226, 27 và 227-229, 28 và 230-232, 29 và 233-235, 30 và 236-238, 31 và 239-241, 32 và 242-244, 33 và 245-247, 34 và 248-250, 35 và 251-253, 36 và 254-256, và/hoặc 37

và 257-259, và trình tự HVR H1, H2, và H3 lần lượt là SEQ ID NO:108, 109, và/hoặc 110.

Trong một ví dụ cụ thể, kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự khung chứa trình tự SEQ ID NO: 38 và 260-262, 39 và 263-265, 40 và 266-268, và/hoặc 41 và 269-271, và trình tự HVR L1, L2, và L3 lần lượt là SEQ ID NO:16, 17, và/hoặc 18. Trong một ví dụ khác, kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự khung chứa trình tự của SEQ ID NO: 38 và 260-262, 39 và 263-265, 40 và 266-268, và/hoặc 41 và 269-271, và trình tự HVR L1, L2, và L3 lần lượt là SEQ ID NO:51, 52 và/hoặc 53. Trong một ví dụ khác, kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự khung chứa trình tự SEQ ID NO: 38 và 260-262, 39 và 263-265, 40 và 266-268, và/hoặc 41 và 269-271, và trình tự HVR L1, L2, và L3 lần lượt là SEQ ID NO: 87, 88 và/hoặc 89. Trong một ví dụ khác, kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự khung chứa trình tự SEQ ID NO: 38 và 260-262, 39 và 263-265, 40 và 266-268, và/hoặc 41 và 269-271, và trình tự HVR L1, L2, và L3 lần lượt là SEQ ID NO:111, 112, và/hoặc 113.

Theo khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự SEQ ID NO:132 và/hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự SEQ ID NO:133.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR3 mà liên kết với polypeptit chứa chủ yếu, bao gồm hoặc bao gồm trình tự axit amin dưới đây: LAVPAANTVRFRCPA (SEQ ID NO:179) và/hoặc SDVEFHCKVYSDAQP (SEQ ID NO:180).

Kháng thể này có thể liên kết với polypeptit chứa chủ yếu, bao gồm hoặc bao gồm số axit amin từ 164 đến 178 và/hoặc từ 269 đến 283 của trình tự axit amin FGFR3 người trưởng thành.

Theo một phương án, kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế liên kết đặc hiệu với trình tự axit amin có tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất trình tự ít nhất là 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% với trình tự LAVPAANTVRFRCPA (SEQ ID NO:179) và/hoặc SDVEFHCKVYSDAQP (SEQ ID NO:180).

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế liên kết với ít nhất một, hai, ba, bốn, hoặc số lượng bất kỳ lên đến tất cả các gốc 154, 155, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 202, 205, 207,

210, 212, 214, 216, 217, 241, 246, 247, 248, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 314, 315, 316, 317 và/hoặc 318 của polypeptit FGFR3 IIIb, hoặc các gốc tương đương của polypeptit FGFR3 IIIc. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực biết cách sắp xếp thẳng hàng trình tự FGFR3 theo thứ tự xác định các gốc tương ứng giữa các trình tự FGFR3 tương ứng. Tổ hợp của hai hoặc nhiều gốc có thể bao gồm bất kỳ trong số các gốc 154, 155, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 202, 205, 207, 210, 212, 214, 216, 217, 241, 246, 247, 248, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 314, 315, 316, 317 và/hoặc 318 của polypeptit FGFR3 IIIb, hoặc các gốc tương đương của polypeptit FGFR3 IIIc. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR3 liên kết với ít nhất một, hai, ba, bốn, hoặc số lượng bất kỳ lên đến tất cả các gốc 158, 159, 169, 170, 171, 173, 175, 205, 207, và/hoặc 315 của polypeptit FGFR3 IIIb, hoặc các gốc tương đương của polypeptit FGFR3 IIIc. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR3 liên kết với ít nhất một, hai, ba, bốn, hoặc số lượng bất kỳ lên đến tất cả các gốc 158, 170, 171, 173, 175, và/hoặc 315 của polypeptit FGFR3 IIIb, hoặc các gốc tương đương của polypeptit FGFR3 IIIc.

Như đã biết trong lĩnh vực, và như được nêu chi tiết hơn dưới đây, vị trí/ranh giới axit amin xác định vùng siêu biến của kháng thể có thể thay đổi, tùy thuộc vào ngữ cảnh và các định nghĩa khác nhau đã biết trong lĩnh vực (như được mô tả dưới đây). Một số vị trí nằm trong miền biến đổi có thể được xem là các vị trí lai siêu biến trong đó các vị trí này có thể được cho là nằm trong vùng siêu biến theo một tập hợp các tiêu chuẩn trong khi được cho là nằm ngoài vùng siêu biến theo tập hợp các tiêu chuẩn khác. Một hoặc nhiều vị trí này còn có thể được phát hiện trong vùng siêu biến kéo dài (như được xác định thêm dưới đây).

Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể đơn dòng. Theo các phương án khác, kháng thể là kháng thể đa dòng. Theo một số phương án, kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể khảm, kháng thể hoàn thiện ái lực, kháng thể được làm tương thích với người, và kháng thể người. Kháng thể này là mảnh kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể là Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, hoặc scFv.

Kháng thể FGFR3 có thể là kháng thể có một nhánh (tức là, miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ tạo thành một nhánh liên kết kháng nguyên duy nhất) bao gồm vùng Fc, trong đó vùng Fc chứa polypeptit Fc thứ nhất và thứ hai, trong đó polypeptit Fc thứ nhất và thứ hai có mặt trong phức hợp và tạo ra vùng Fc mà làm tăng

độ ổn định của mảnh kháng thể này so với phân tử Fab bao gồm nhánh liên kết kháng nguyên này. Xem, ví dụ, WO2006/015371.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể khảm, ví dụ, kháng thể chứa trình tự liên kết kháng nguyên từ thể cho không phải là người được ghép với các trình tự khác loại không phải người, người, hoặc được làm tương thích với người (ví dụ, trình tự vùng khung và/hoặc trình tự miền hằng định). Theo một phương án, thể cho không phải người là chuột. Theo phương án khác, trình tự liên kết kháng nguyên là trình tự tổng hợp, ví dụ, thu được bằng cách gây đột biến (ví dụ, sàng lọc biểu hiện thể thực khuẩn, v.v.). Theo phương án cụ thể, kháng thể khảm theo sáng chế có vùng V của chuột và vùng C của người. Theo một phương án, vùng V chuỗi nhẹ của chuột được dung hợp với chuỗi nhẹ kappa của người. Theo phương án khác, vùng V chuỗi nặng của chuột được dung hợp với vùng C IgG1 của người.

Các kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế gồm các kháng thể có đột biến thể axit amin trong vùng khung (FR) và các biến thể hoàn thiện ái lực có các thay đổi ở CDR ghép. Axit amin được thể ở CDR hoặc FR là không bị giới hạn bởi các axit amin có mặt trong kháng thể cho hoặc kháng thể nhận. Các kháng thể này còn có thể chứa các thay đổi ở các gốc axit amin trong vùng Fc mà dẫn đến làm tăng chức năng phản ứng hiệu ứng bao gồm sự tăng cường chức năng CDC và/hoặc ADCC và tác dụng diệt tế bào B. Các kháng thể khác theo sáng chế bao gồm các kháng thể có các thay đổi cụ thể làm tăng cường độ ổn định. Các kháng thể có thể chứa các thay đổi ở các gốc axit amin trong vùng Fc mà dẫn đến chức năng hiệu ứng bị giảm, ví dụ, chức năng CDC và/hoặc ADCC bị giảm và/hoặc sự tác dụng diệt tế bào B bị giảm. Các kháng thể này có thể được đặc trưng bởi khả năng liên kết giảm (như không có liên kết) với yếu tố bổ thể của người C1q và/hoặc thụ thể Fc của người trên tế bào giết tự nhiên (NK). Các kháng thể này có thể được đặc trưng bởi khả năng liên kết giảm (như không có liên kết) với FcγRI, FcγRIIA, và/hoặc FcγRIIIA của người. Các kháng thể này có thể thuộc lớp IgG (ví dụ, IgG1 hoặc IgG4) và chứa ít nhất một đột biến ở E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331, và/hoặc P329 (đánh số theo chỉ số EU). Các kháng thể này có thể chứa các đột biến L234A/L235A hoặc D265A/N297A.

Khi kháng thể chứa vùng Fc, hydrat cacbon được gắn vào đó có thể thay đổi được. Ví dụ, các kháng thể có cấu trúc hydrat cacbon hoàn thiện mà thiếu fucoza gắn vào vùng Fc của kháng thể được mô tả trong đơn sáng chế Mỹ số 2003/0157108 (Presta, L.). Xem

thêm US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Các kháng thể có N-acetylglucosamin chia đôi (GlcNAc) trong hydrat cacbon gắn vào vùng Fc của kháng thể được tham khảo trong WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* và Patent Mỹ số 6,602,684, Umana *et al.* Các kháng thể có ít nhất một gốc galactosa trong oligosacarit gắn vào vùng Fc của kháng thể được báo cáo trong WO 1997/30087, Patel *et al.* Xem thêm, WO 1998/58964 (Raju, S.) và WO 1999/22764 (Raju, S.) đề cập đến các kháng thể có hydrat cacbon được biến đổi được gắn vào vùng Fc của chúng. Xem thêm US 2005/0123546 (Umana *et al.*) về các phân tử liên kết kháng nguyên có sự glycosyl hóa được biến đổi. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit liên kết FGFR3 bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự liên kết kháng nguyên được nêu trong bản mô tả, trong đó polypeptit liên kết FGFR3 liên kết đặc hiệu với FGFR3, ví dụ, FGFR3 của người và/hoặc chó và/hoặc chuột.

Các kháng thể theo sáng chế liên kết (như liên kết đặc hiệu) với FGFR3 (ví dụ FGFR3-IIIb và/hoặc FGFR3-IIIc), và điều biến (ví dụ ức chế) một hoặc nhiều khía cạnh của sự truyền tín hiệu FGFR3 (như sự phosphoryl hóa FGFR3) và/hoặc phá vỡ FGFR3 có liên quan về mặt sinh học bất kỳ và/hoặc con đường sinh học phối từ FGFR3, và/hoặc phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa khối u, rối loạn tăng sinh tế bào hoặc ung thư; và/hoặc điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn có liên quan đến sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính FGFR3 (như sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính FGFR3 được gia tăng) như được xác định trong yêu cầu bảo hộ. Theo một số phương án, kháng thể FGFR3 liên kết đặc hiệu với polypeptit chứa hoặc chứa chủ yếu FGFR3 (ví dụ, FGFR3 của người hoặc chuột). Theo một số phương án, kháng thể này liên kết đặc hiệu với FGFR3 với Kd là 1×10^{-7} M hoặc lớn hơn.

Kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế không phải là kháng thể kháng FGFR3 được mô tả trong công bố Patent Mỹ số 2005/0147612 (ví dụ, kháng thể MSPRO2, MSPRO12, MSPRO59, MSPRO11, MSPRO21, MSPRO24, MSPRO26, MSPRO28, MSPRO29, MSPRO43, MSPRO55), kháng thể được mô tả trong tài liệu Rauchenberger *et al*, J Biol Chem 278 (40):38194-38205 (2003); kháng thể được mô tả trong công bố đơn PCT số WO2006/048877 (ví dụ, kháng thể PRO-001), kháng thể được mô tả trong tài liệu Martinez-Torrecuadrada *et al*, Mol Cancer Ther (2008) 7(4): 862-873 (ví dụ, scFvαFGFR3 3C), kháng thể được mô tả trong tài liệu Drenzo, R *et al* (2007)

Proceedings of AACR Annual Meeting, Abstract No. 2080 (ví dụ, D11), hoặc kháng thể được mô tả trong WO 2010/002862 (ví dụ, các kháng thể 15D8, 27H2, 4E7, 2G4, 20B4).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế và chất mang như được xác định trong yêu cầu bảo hộ. Theo một phương án, chất mang là dược dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa kháng thể FGFR3 theo sáng chế.

Vẫn theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vectơ chứa axit nucleic theo sáng chế như được xác định trong yêu cầu bảo hộ.

Cũng được bao gồm ở đây là các chế phẩm chứa một hoặc nhiều axit nucleic theo sáng chế và chất mang. Chất mang này có thể là dược dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic hoặc vectơ theo sáng chế như được xác định trong yêu cầu bảo hộ. Vectơ có thể là loại bất kỳ, ví dụ, vectơ tái tổ hợp như vectơ biểu hiện. Bất kỳ trong số nhiều tế bào chủ khác nhau có thể được sử dụng. Trong một ví dụ, tế bào chủ là tế bào tiền nhân, ví dụ, *E. coli*. Trong một ví dụ khác, tế bào chủ là tế bào có nhân điển hình, ví dụ tế bào động vật có vú như tế bào buồng trứng chuột hàng Trung Quốc (CHO).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế như được xác định trong yêu cầu bảo hộ. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể kháng FGFR3 (mà, như được xác định trong bản mô tả gồm kháng thể có chiều dài đầy đủ và các mảnh của chúng), phương pháp này bao gồm bước biểu hiện vectơ tái tổ hợp theo sáng chế mã hóa kháng thể này trong tế bào chủ thích hợp, và bước khôi phục kháng thể. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể sao cho axit nucleic này được biểu hiện. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước khôi phục kháng thể từ môi trường nuôi cấy tế bào chủ. Theo một số phương án, kháng thể được khôi phục từ môi trường nuôi cấy tế bào chủ. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước kết hợp kháng thể đã khôi phục với chất mang dược dụng, tá dược, hoặc chất mang để bào chế dược phẩm chứa kháng thể được làm tương thích với người.

Cũng được mô tả ở đây là sản phẩm bao gồm đồ bao gói; và chế phẩm nằm trong đồ bao gói này, trong đó chế phẩm này chứa một hoặc nhiều kháng thể FGFR3 theo sáng chế. Chế phẩm này có thể chứa axit nucleic theo sáng chế. Chế phẩm chứa kháng thể có

thể chứa thêm chất mang, mà trong một số trường hợp là dược dụng. Sản phẩm này còn bao gồm hướng dẫn sử dụng chế phẩm (ví dụ, kháng thể) cho cá thể (như hướng dẫn sử dụng cho phương pháp bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này).

Cũng được mô tả ở đây là bộ kit bao gồm đồ bao gói thứ nhất chứa chế phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế; và đồ bao gói thứ hai chứa chất đệm. Chất đệm này có thể là dược dụng. Chế phẩm chứa kháng thể còn bao gồm chất mang, mà trong một số phương án là dược dụng. Bộ kit có thể còn bao gồm hướng dẫn sử dụng chế phẩm này (ví dụ, kháng thể) cho cá thể.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế để sử dụng làm thuốc như được xác định trong yêu cầu bảo hộ.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn, như tình trạng bệnh lý do sự hoạt hóa và/hoặc sự biểu hiện (theo một số phương án, là sự biểu hiện quá mức) FGFR3 như được xác định trong yêu cầu bảo hộ. Theo một số phương án, rối loạn này là bệnh ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào như được xác định trong yêu cầu bảo hộ. Theo một số phương án, ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào là đa u tủy hoặc ung thư bàng quang (ví dụ, caxinom tế bào chuyển tiếp), bệnh ung thư vú hoặc ung thư gan.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn như rối loạn xương như được xác định theo yêu cầu bảo hộ. Theo một số phương án, rối loạn này là tình trạng thiếu phát triển sụn ở người, thiếu sản sụn, còi cọc, loạn sản ngăn chi gây tử vong (dạng lâm sàng của TD: TD1 và TDII), hoặc triệu chứng dính khớp sớm.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế để sử dụng trong việc làm giảm sự tăng sinh tế bào như được xác định theo yêu cầu bảo hộ.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế để sử dụng trong việc tiêu diệt tế bào. Theo một số phương án, tế bào này là tế bào đa u tủy. Theo một số phương án, tế bào này bị tiêu diệt bởi ADCC. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể trần. Theo một số phương án, tế bào biểu hiện quá mức FGFR3.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế để sử dụng trong việc làm suy yếu tế bào, như tế bào đa u tủy như được xác định theo yêu cầu bảo hộ. Theo một số phương án, tế bào bị tiêu diệt bởi ADCC. Theo một số phương

án, kháng thể là kháng thể trần. Theo một số phương án, tế bào này biểu hiện quá mức FGFR3.

Được mô tả ở đây là việc sử dụng kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế trong việc bào chế thuốc để điều trị chữa bệnh và/hoặc điều trị dự phòng rối loạn, như tình trạng bệnh lý có liên quan đến sự hoạt hóa và/hoặc sự biểu hiện (theo một số phương án là sự biểu hiện quá mức) FGFR3. Trong một số trường hợp, rối loạn này là ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Trong một số trường hợp, bệnh ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh đa u tủy hoặc ung thư bàng quang (ví dụ, caxinom tế bào chuyển tiếp), bệnh ung thư vú hoặc ung thư gan. Trong một số trường hợp, rối loạn là rối loạn xương, ví dụ, tình trạng thiếu phát triển sụn ở người, thiếu sản sụn, còi cọc, loạn sản ngăn chi gây tử vong (dạng lâm sàng của TD: TD1 và TDII), hoặc hội chứng dính khớp sọ sớm.

Được mô tả ở đây là việc sử dụng axit nucleic theo sáng chế để bào chế thuốc để điều trị chữa bệnh và/hoặc điều trị dự phòng rối loạn, như tình trạng bệnh lý có liên quan đến sự hoạt hóa và/hoặc sự biểu hiện (theo một số phương án, sự biểu hiện quá mức) FGFR3. Trong một số trường hợp, rối loạn này là bệnh ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Trong một số trường hợp, bệnh ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh đa u tủy hoặc ung thư bàng quang (ví dụ, caxinom tế bào chuyển tiếp), ung thư vú hoặc ung thư gan. Trong một số trường hợp, rối loạn này là rối loạn xương, ví dụ, tình trạng thiếu phát triển sụn ở người, thiếu sản sụn, còi cọc, loạn sản ngăn chi gây tử vong (dạng lâm sàng TD: TD1 và TDII), hoặc hội chứng dính khớp sọ sớm.

Được mô tả ở đây là việc sử dụng vectơ biểu hiện của sáng chế để bào chế thuốc để điều trị chữa bệnh và/hoặc điều trị dự phòng rối loạn, như tình trạng bệnh lý có liên quan đến sự hoạt hóa và/hoặc sự biểu hiện (theo một số phương án, sự biểu hiện quá mức) FGFR3. Trong một số trường hợp, rối loạn này là bệnh ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Trong một số trường hợp, bệnh ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh đa u tủy hoặc ung thư bàng quang (ví dụ, caxinom tế bào chuyển tiếp), bệnh ung thư vú hoặc ung thư gan. Trong một số trường hợp, rối loạn này là rối loạn xương, ví dụ, tình trạng thiếu phát triển sụn ở người, thiếu sản sụn, còi cọc, loạn sản ngăn chi gây tử vong (dạng lâm sàng TD: TD1 và TDII), hoặc hội chứng dính khớp sọ sớm.

Được mô tả ở đây là việc sử dụng sản phẩm theo sáng chế để bào chế thuốc để điều trị chữa bệnh và/hoặc điều trị dự phòng các rối loạn, như các tình trạng bệnh lý có liên quan đến sự hoạt hóa và/hoặc sự biểu hiện (theo một số phương án, sự biểu hiện quá mức) FGFR3. Theo một số phương án, rối loạn là ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Trong một số trường hợp, bệnh ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh đa u tủy hoặc ung thư bàng quang (ví dụ, caxinom tế bào chuyển tiếp), ung thư vú hoặc ung thư gan. Trong một số trường hợp, rối loạn là rối loạn xương, ví dụ, tình trạng thiếu phát triển sụn ở người, thiếu sản sụn, còi cọc, loạn sản ngăn chi gây tử vong (dạng lâm sàng TD: TD1 và TDII), hoặc hội chứng dính khớp sọ sớm.

Được mô tả ở đây là việc sử dụng sản phẩm theo sáng chế để bào chế thuốc để điều trị chữa bệnh và/hoặc điều trị dự phòng rối loạn, như tình trạng bệnh lý có liên quan đến sự hoạt hóa và/hoặc sự biểu hiện (theo một số phương án, sự biểu hiện quá mức) FGFR3. Trong một số trường hợp, rối loạn này là bệnh ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Trong một số trường hợp, bệnh ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh đa u tủy hoặc ung thư bàng quang (ví dụ, caxinom tế bào chuyển tiếp), ung thư vú hoặc ung thư gan. Trong một số trường hợp, rối loạn là rối loạn xương, ví dụ, tình trạng thiếu phát triển sụn ở người, thiếu sản sụn, còi cọc, loạn sản ngăn chi gây tử vong (dạng lâm sàng TD: TD1 và TDII), hoặc hội chứng dính khớp sọ sớm.

Được mô tả ở đây là việc sử dụng bộ kit theo sáng chế để bào chế thuốc để điều trị chữa bệnh và/hoặc điều trị dự phòng rối loạn, như tình trạng bệnh lý có liên quan đến sự hoạt hóa và/hoặc sự biểu hiện (theo một số phương án, sự biểu hiện quá mức) FGFR3. Trong một số trường hợp, rối loạn này là ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Theo một số phương án, bệnh ung thư, khối u, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh đa u tủy hoặc ung thư bàng quang (ví dụ, caxinom tế bào chuyển tiếp), ung thư vú hoặc ung thư gan. Trong một số trường hợp, rối loạn này là rối loạn xương, ví dụ, tình trạng thiếu phát triển sụn ở người, thiếu sản sụn, còi cọc, loạn sản ngăn chi gây tử vong (dạng lâm sàng TD: TD1 và TDII), hoặc hội chứng dính khớp sọ sớm.

Cũng được mô tả ở đây là việc sử dụng kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế để bào chế thuốc để ức chế sự tăng sinh tế bào, và việc sử dụng kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế để bào chế thuốc để tiêu diệt tế bào. Trong một số trường hợp, tế bào là tế bào đa u tủy. Trong một số trường hợp, tế bào này bị tiêu diệt bởi ADCC. Trong một số

trường hợp, kháng thể là kháng thể trần. Trong một số trường hợp, tế bào biểu hiện quá mức FGFR3.

Cũng được mô tả ở đây là việc sử dụng kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế để bào chế thuốc để làm suy yếu tế bào, như tế bào đa u tủy. Theo một số phương án, tế bào bị tiêu diệt bởi ADCC. Trong một số trường hợp, kháng thể là kháng thể trần. Theo một số phương án, tế bào này biểu hiện quá mức FGFR3.

Sáng chế đề xuất phương pháp và chế phẩm hữu ích để điều biến các rối loạn có liên quan đến sự biểu hiện và/hoặc dẫn truyền tín hiệu FGFR3, như sự biểu hiện và/hoặc truyền tín hiệu gia tăng hoặc sự biểu hiện và/hoặc truyền tín hiệu không mong muốn.

Các ứng dụng của sáng chế trong y tế có thể được sử dụng để tác động đến trạng thái bệnh lý thích hợp. Các rối loạn điển hình được mô tả trong bản mô tả này, và bao gồm bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến giáp, ung thư tinh hoàn, ung thư nội mạc tử cung, ung thư đầu và cổ, ung thư não (ví dụ, u nguyên bào thần kinh hoặc u màng não), ung thư da (ví dụ, u ác tính, caxinom tế bào cơ bản hoặc caxinom tế bào vảy), ung thư bàng quang (ví dụ, caxinom tế bào chuyển tiếp), caxinom vú, ung thư dạ dày, ung thư ruột kết (CRC), caxinom tế bào gan, ung thư cổ, ung thư phổi, ung thư tụy, ung thư tuyến tiền liệt, và bệnh máu ác tính (ví dụ, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính tế bào T (T-ALL), bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính tế bào B (B-ALL), bệnh bạch cầu sinh tủy cấp tính (AML), tế bào B ác tính, u bạch huyết dạng Hodgkin, và đa u tủy). Theo một số phương án, rối loạn là caxinom xâm nhập tế bào chuyển tiếp. Theo một số phương án, rối loạn là đa u tủy. Ví dụ khác về các rối loạn này gồm rối loạn xương, như tình trạng thiếu phát triển sụn ở người, thiếu sản sụn, còi cọc, loạn sản ngắn chi gây tử vong (dạng lâm sàng TD: TD1 và TDII), hoặc hội chứng dính khớp sọ sớm.

Theo phương án nhất định, bệnh ung thư biểu hiện FGFR3, FGFR3 được khuếch đại, FGFR3 hoán vị, và/hoặc FGFR3 đột biến. Theo phương án nhất định, ung thư biểu hiện FGFR3 hoạt hóa. Theo phương án nhất định, bệnh ung thư này biểu hiện FGFR3 hoán vị (ví dụ, hoán vị t(4;14)). Theo phương án nhất định, bệnh ung thư biểu hiện FGFR3 cấu trúc. Theo một số phương án, FGFR3 cấu trúc chứa đột biến ở miền tyrosin kinaza và/hoặc miền cận màng và/hoặc miền liên kết phối tử. Theo phương án nhất định, ung thư biểu hiện độc lập phối tử FGFR3. Theo một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện FGFR3 phụ thuộc phối tử.

Theo một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện FGFR3 chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{S248C}. Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện FGFR3-IIIb^{S248C} và/hoặc FGFR3-IIIc^{S248C}.

Theo một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện FGFR3 gồm đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{K652E}. Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện FGFR3-IIIb^{K652E} và/hoặc FGFR3-IIIc^{K650E}.

FGFR3 gồm đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{S249C}. Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện FGFR3-IIIb^{S249C} và/hoặc FGFR3-IIIc^{S249C}.

Theo một khía cạnh, bệnh ung thư này biểu hiện FGFR3 chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{G372C}. Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện FGFR3-IIIb^{G372C} và/hoặc FGFR3-IIIc^{G370C}.

Theo một khía cạnh, bệnh ung thư này biểu hiện FGFR3 chứa đột biến tương ứng với FGFR3-IIIb^{Y375C}. Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện FGFR3-IIIb^{Y375C} và/hoặc FGFR3-IIIc^{Y373C}.

Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện (a) FGFR3-IIIb^{K652E} và (b) một hoặc nhiều FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C}, và FGFR3-IIIb^{G372C}.

Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện (a) FGFR3-IIIb^{R248C} và (b) một hoặc nhiều FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C}, và FGFR3-IIIb^{G372C}.

Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện (a) FGFR3-IIIb^{G372C} và (b) một hoặc nhiều trong số FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C}, và FGFR3-IIIb^{R248C}.

Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện FGFR3-IIIb^{R248C}, FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C}, và FGFR3-IIIb^{G372C}.

Theo phương án nhất định, bệnh ung thư này biểu hiện mức phospho-FGFR3, phospho-FRS2 và/hoặc phospho-MAPK tăng so với mẫu đối chứng (ví dụ, mẫu mô bình thường) hoặc mức đối chứng.

Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện (ví dụ, trên bề mặt tế bào) khoảng 10000 phân tử FGFR3 cho mỗi tế bào hoặc nhiều hơn (như 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000 thụ thể FGFR3 hoặc nhiều hơn). Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện khoảng 13000 phân tử FGFR3. Theo các phương

án khác, bệnh ung thư này biểu hiện khoảng 5000, 6000, 7000, 8000 phân tử FGFR3 hoặc hơn. Theo một số phương án, bệnh ung thư này biểu hiện ít hơn khoảng 4000, 3000, 2000, 1000 phân tử FGFR3 hoặc ít hơn. Theo một số phương án, bệnh ung thư biểu hiện ít hơn khoảng 1000 phân tử FGFR3.

Theo một phương án, tế bào mà được gắn đích trong ứng dụng y tế theo sáng chế là tế bào ung thư. Ví dụ, tế bào ung thư có thể được chọn từ nhóm bao gồm tế bào ung thư vú, tế bào ung thư đại trực tràng, tế bào ung thư phổi (ví dụ, tế bào ung thư phổi tế bào không nhỏ), tế bào ung thư tuyến giáp, tế bào đa u tủy, tế bào ung thư tinh hoàn, tế bào caxinom dạng nhũ, tế bào ung thư đại tràng, tế bào ung thư tụy, tế bào ung thư buồng trứng, tế bào cổ ung thư, tế bào ung thư hệ thần kinh trung ương, tế bào sacôm tạo xương, tế bào caxinom thận, tế bào caxinom tế bào gan, tế bào ung thư bàng quang (ví dụ, tế bào caxinom tế bào chuyển tiếp), tế bào caxinom dạ dày, tế bào caxinom vảy đầu và cổ, tế bào ung thư hắc tố, tế bào bệnh bạch cầu, tế bào đa u tủy (ví dụ tế bào đa u tủy gồm hoán vị t(4:14) FGFR3) và tế bào u tuyến đại tràng. Theo một phương án, tế bào mà được gắn đích trong phương pháp theo sáng chế là tế bào tăng sinh quá mức và/hoặc tăng sản. Theo phương án khác, tế bào mà được gắn đích trong phương pháp theo sáng chế là tế bào loạn sản. Theo một phương án khác nữa, tế bào mà được gắn đích trong phương pháp theo sáng chế là tế bào di căn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự tăng sinh tế bào ở đối tượng, phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FGFR3 để làm giảm sự tăng sinh tế bào.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để tiêu diệt tế bào ở đối tượng, phương pháp này bao gồm sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FGFR3 để tiêu diệt tế bào. Tế bào này có thể là tế bào đa u tủy. Tế bào này có thể bị tiêu diệt bởi ADCC. Kháng thể này có thể là kháng thể trần. Tế bào này có thể biểu hiện quá mức FGFR3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để làm giảm tế bào (như tế bào đa u tủy) ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FGFR3 để tiêu diệt tế bào. Tế bào này bị tiêu diệt bởi ADCC. Kháng thể này có thể là kháng thể trần. Tế bào này có thể biểu hiện quá mức FGFR3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn xương. Trong một số phương pháp, rối loạn này là chứng loạn sản sụn ở người, thiếu sản sụn, còi cọc, loạn sản ngăn chỉ gây chết (dạng lâm sàng TD: TD1 và TDII), hoặc hội chứng dính khớp sọ sớm.

Ứng dụng y học của sáng chế có thể còn bao gồm các bước điều trị bổ sung trong các phương pháp. Ví dụ, phương pháp còn có thể bao gồm bước trong đó tế bào và/hoặc mô được gắn đích (ví dụ, tế bào ung thư) được tiếp xúc với điều trị phóng xạ hoặc chất hóa trị liệu.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FGFR3 kết hợp với lượng hữu hiệu của chất trị liệu khác (như chất chống tạo mạch, kháng thể khác, chất hóa trị liệu, chất gây độc tế bào, chất ức chế miễn dịch, tiền dược chất, xytokin, liệu pháp phóng xạ gây độc tế bào, corticosteroid, thuốc chống nôn, vắc xin ung thư, thuốc giảm đau, hoặc chất ức chế sự sinh trưởng). Ví dụ, các kháng thể kháng FGFR3 được sử dụng kết hợp với chất chống ung thư hoặc chất chống tạo mạch để điều trị nhiều tình trạng liên quan đến khối u hoặc không liên quan đến khối u khác nhau. Trong các ví dụ cụ thể, các kháng thể kháng FGFR3 được sử dụng kết hợp với velcade, revlimid, tamoxifen, letrozole, exemestane, anastrozole, irinotecan, cetuximab, fulvestrant, vinorelbine, bevacizumab, vincristine, cisplatin, gemcitabine, methotrexate, vinblastine, carboplatin, paclitaxel, docetaxel, pemetrexed, 5-flouraxil, doxorubicin, bortezomib, lenalidomide, dexamethasone, melphalin, prednisone, vincristine, và/hoặc thalidomide.

Tùy thuộc vào bệnh ung thư cụ thể được điều trị, liệu pháp kết hợp theo sáng chế có thể được kết hợp với các chất trị liệu khác, như chất hóa trị liệu, hoặc các liệu pháp bổ sung như xạ trị hoặc phẫu thuật. Nhiều chất hóa trị liệu đã biết có thể được sử dụng trong liệu pháp kết hợp theo sáng chế. Tốt hơn nếu các chất hóa trị liệu mà là tiêu chuẩn điều trị cho các chỉ định cụ thể sẽ được sử dụng. Liều hoặc tần suất của mỗi chất trị liệu được sử dụng trong liệu pháp kết hợp tốt hơn nếu bằng, hoặc thấp hơn, liều hoặc tần suất của chất tương ứng khi được sử dụng mà không có (các) chất còn lại.

Cũng được mô tả ở đây là bất kỳ trong số các kháng thể kháng FGFR3 được mô tả ở đây, trong đó kháng thể kháng FGFR3 chứa nhãn phát hiện được.

Cũng được mô tả ở đây là phức hợp của bất kỳ trong số các kháng thể kháng FGFR3 được mô tả ở đây và FGFR3. Phức hợp này có thể là *in vivo* hoặc *in vitro*. Phức

hợp này có thể chứa tế bào ung thư. Kháng thể kháng FGFR3 này có thể được đánh dấu phát hiện được.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A, 1B và 1C: trình tự vòng HVR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng FGFR3. Các hình vẽ này thể hiện trình tự HVR chuỗi nặng, H1, H2, và H3, và trình tự HVR chuỗi nhẹ, L1, L2, và L3. Đánh số trình tự là như sau:

Dòng 184.6 (HVR-H1 là SEQ ID NO:1; HVR-H2 là SEQ ID NO:2; HVR-H3 là SEQ ID NO:3; HVR-L1 là SEQ ID NO:4; HVR-L2 là SEQ ID NO:5; HVR-L3 là SEQ ID NO:6);

Dòng 184.6.1 (HVR-H1 là SEQ ID NO:7; HVR-H2 là SEQ ID NO:8; HVR-H3 là SEQ ID NO:9; HVR-L1 là SEQ ID NO:10; HVR-L2 là SEQ ID NO:11; HVR-L3 là SEQ ID NO:12)

Dòng 184.6.58 (HVR-H1 là SEQ ID NO:13; HVR-H2 là SEQ ID NO:14; HVR-H3 là SEQ ID NO:15; HVR-L1 là SEQ ID NO:16; HVR-L2 là SEQ ID NO:17; HVR-L3 là SEQ ID NO:18)

Dòng 184.6.62 (HVR-H1 là SEQ ID NO:48; HVR-H2 là SEQ ID NO:49; HVR-H3 là SEQ ID NO:50; HVR-L1 là SEQ ID NO:51; HVR-L2 là SEQ ID NO:52; HVR-L3 là SEQ ID NO:53)

Dòng 184.6.21 (HVR-H1 là SEQ ID NO:54; HVR-H2 là SEQ ID NO:55; HVR-H3 là SEQ ID NO:56; HVR-L1 là SEQ ID NO:57; HVR-L2 là SEQ ID NO:58; HVR-L3 là SEQ ID NO:59)

Dòng 184.6.49 (HVR-H1 là SEQ ID NO:60; HVR-H2 là SEQ ID NO:61; HVR-H3 là SEQ ID NO:62; HVR-L1 là SEQ ID NO:63; HVR-L2 là SEQ ID NO:64; HVR-L3 là SEQ ID NO:65)

Dòng 184.6.51 (HVR-H1 là SEQ ID NO:66; HVR-H2 là SEQ ID NO:67; HVR-H3 là SEQ ID NO:68; HVR-L1 là SEQ ID NO:69; HVR-L2 là SEQ ID NO:70; HVR-L3 là SEQ ID NO:71)

Dòng 184.6.52 (HVR-H1 là SEQ ID NO:72; HVR-H2 là SEQ ID NO:73; HVR-H3 là SEQ ID NO:74; HVR-L1 là SEQ ID NO:75; HVR-L2 là SEQ ID NO:76; HVR-L3 là SEQ ID NO:77)

Dòng 184.6.92 (HVR-H1 là SEQ ID NO:78; HVR-H2 là SEQ ID NO:79; HVR-H3 là SEQ ID NO:80; HVR-L1 là SEQ ID NO:81; HVR-L2 là SEQ ID NO:82; HVR-L3 là SEQ ID NO:83)

Dòng 184.6.1.N54S (HVR-H1 là SEQ ID NO:84; HVR-H2 là SEQ ID NO:85; HVR-H3 là SEQ ID NO:86; HVR-L1 là SEQ ID NO:87; HVR-L2 là SEQ ID NO:88; HVR-L3 là SEQ ID NO:89)

Dòng 184.6.1.N54G (HVR-H1 là SEQ ID NO:90; HVR-H2 là SEQ ID NO:91; HVR-H3 là SEQ ID NO:92; HVR-L1 là SEQ ID NO:93; HVR-L2 là SEQ ID NO:94; HVR-L3 là SEQ ID NO:95)

Dòng 184.6.1.N54A (HVR-H1 là SEQ ID NO:96; HVR-H2 là SEQ ID NO:97; HVR-H3 là SEQ ID NO:98; HVR-L1 là SEQ ID NO:99; HVR-L2 là SEQ ID NO:100; HVR-L3 là SEQ ID NO:101)

Dòng 184.6.1.N54Q (HVR-H1 là SEQ ID NO:102; HVR-H2 là SEQ ID NO:103; HVR-H3 là SEQ ID NO:104; HVR-L1 là SEQ ID NO:105; HVR-L2 là SEQ ID NO:106; HVR-L3 là SEQ ID NO:107)

Dòng 184.6.58.N54S (HVR-H1 là SEQ ID NO:108; HVR-H2 là SEQ ID NO:109; HVR-H3 là SEQ ID NO:110; HVR-L1 là SEQ ID NO:111; HVR-L2 là SEQ ID NO:112; HVR-L3 là SEQ ID NO:113)

Dòng 184.6.58.N54G (HVR-H1 là SEQ ID NO:114; HVR-H2 là SEQ ID NO:115; HVR-H3 là SEQ ID NO:116; HVR-L1 là SEQ ID NO:117; HVR-L2 là SEQ ID NO:118; HVR-L3 là SEQ ID NO:119)

Dòng 184.6.58.N54A (HVR-H1 là SEQ ID NO:120; HVR-H2 là SEQ ID NO:121; HVR-H3 là SEQ ID NO:122; HVR-L1 là SEQ ID NO:123; HVR-L2 là SEQ ID NO:124; HVR-L3 là SEQ ID NO:125)

Dòng 184.6.58.N54Q (HVR-H1 là SEQ ID NO:126; HVR-H2 là SEQ ID NO:127; HVR-H3 là SEQ ID NO:128; HVR-L1 là SEQ ID NO:129; HVR-L2 là SEQ ID NO:130; HVR-L3 là SEQ ID NO:131).

Dòng 184.6.1.NS D30E (HVR-H1 là SEQ ID NO:143; HVR-H2 là SEQ ID NO:144; HVR-H3 là SEQ ID NO:145; HVR-L1 là SEQ ID NO:140; HVR-L2 là SEQ ID NO:141; HVR-L3 là SEQ ID NO:142).

Các vị trí axit amin được đánh số theo hệ thống đánh số Kabat như được nêu dưới đây.

Fig. 2A và 2B: mô tả (A) trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng FGFR3 184.6.1.N54S, 184.6.58, và 184.6.62; và (B) vùng siêu biến của các kháng thể kháng FGFR3 1G6, 6G1, và 15B2 .

Fig. 3A, 3B và 4: mô tả trình tự khung liên ứng nhận của người điển hình để sử dụng trong việc thực hiện sáng chế với chất nhận diện trình tự như sau:

Khung liên ứng nặng biến đổi (Fig.3A, 3B)

khung liên ứng phân nhóm I VH của người trừ đi các CDR Kabat (SEQ ID NO:19 và 203-205)

khung liên ứng phân nhóm I VH của người trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NO:20 và 206-208, 21 và 209-211, 22 và 212-214)

khung liên ứng phân nhóm II VH của người trừ đi các CDR Kabat (SEQ ID NO:23 và 215-217)

khung liên ứng phân nhóm II VH của người trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NOS:24 và 218-220, 25 và 221-223, 26 và 224-226)

khung liên ứng phân nhóm II VH của người trừ đi được kéo dài

khung liên ứng phân nhóm III VH của người trừ đi các CDR Kabat (SEQ ID NO:27 và 227-229)

khung liên ứng phân nhóm III VH của người trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NO:28 và 230-232, 29 và 233-235, 30 và 236-238)

khung nhận VH của người trừ đi các CDR Kabat (SEQ ID NO:31 và 239-241)

khung nhận VH của người trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NO:32 và 242-244, 33 và 245-247)

khung nhận 2 VH của người trừ đi các CDR Kabat (SEQ ID NO:34 và 248-250)

khung nhận 2 VH của người trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NO:35 và 251-253, 36 và 254-256, 37 và 257-259)

Khung liên ứng nhẹ biến đổi (VL) (Fig.4)

khung liên ứng phân nhóm I VL kappa của người (SEQ ID NO:38 và 260-262)

khung liên ứng phân nhóm II VL kappa của người (SEQ ID NO:39 và 263-265)

khung liên ứng phân nhóm III VL kappa của người (SEQ ID NO:40 và 266-268)

khung liên ứng phân nhóm IV VL kappa của người (SEQ ID NO:41 và 269-271)

Fig. 5: mô tả trình tự khung của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:42-45) và chuỗi nặng (SEQ ID NO: 46, 47, 175, 176) của huMAb4D5-8. Các số ở dạng chỉ số trên/in đậm thể hiện các vị trí axit amin theo Kabat.

Fig. 6: mô tả trình tự khung biến đổi/được cải biến của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 42, 43, 177, 45) và chuỗi nặng (SEQ ID NO: 46, 47, 178, và 176) của huMAb4D5-8. Các số ở dạng chỉ số trên/in đậm thể hiện các vị trí axit amin theo Kabat.

Fig. 7: Sự giảm biểu hiện FGFR3 trong tế bào ung thư bàng quang RT112 ức chế sự tăng sinh và gây ra sự ngừng chu trình tế bào G1 *in vitro*, và ức chế sự phát triển khối u *in vivo*. Ba shARN FGFR3 khác được tách dòng vào vector biểu hiện được cảm ứng bởi Tet. Tế bào RT112 biểu hiện ổn định shARN FGFR3 hoặc shARN kiểm soát được thiết lập với sự chọn lọc puromyxin. (A) Các vết điển hình thể hiện sự biểu hiện FGFR3 trong các dòng chọn lọc được xử lý bằng hoặc không bằng doxyxycyclin (Dox, 0, 0,1 và 1 µg/ml, từ trái sang phải). (B) Sự kết hợp [³H]-thymidin bởi tế bào RT112 ổn định. Các dòng RT112 ổn định được nuôi cấy có hoặc không có 1 µg/ml doxyxycyclin trong 3 ngày trước khi ủ 16 giờ với [³H]-thymidin (1 µCi cho mỗi giếng). Số đếm [³H]-thymidin đã kết hợp được chuẩn hóa đến giá trị từ tế bào mà không được cảm ứng doxyxycyclin. Các thanh sai số là SEM. (C) biểu đồ đo tế bào dòng phát huỳnh quang ADN của tế bào RT112 ổn định. Các dòng RT112 biểu hiện shARN đối chứng hoặc FGFR3 shARN4 được nuôi cấy có hoặc không có 1 µg/ml doxyxycyclin trong 72 giờ, và nhân được nhuộm với propidi iodua (PI). Các kết quả tương tự thu được đối với FGFR3 shARN2 và 6 (Fig.16). (D) Sự phát triển của các tế bào RT112 biểu hiện shARN đối chứng (n=9 cho mỗi nhóm điều trị) hoặc FGFR3 shARN4 (n=11 cho mỗi nhóm điều trị) ở các con chuột. Chuột được sử dụng một mình 5% sucroza hoặc được bổ sung 1 mg/ml doxyxycyclin, và kích thước khối u được đo hai lần mỗi tuần. Các thanh sai số là SEM. Các kết quả tương tự thu được với FGFR3 shARN2 và 6 (Fig.16). Bảng dưới: Sự biểu hiện protein FGFR3 trong dịch dung giải khối u được chiết từ shARN kiểm soát hoặc các mô ghép ngoại lai tế bào ổn định FGFR3 shARN4.

Fig.8: R3Mab phong bế tương tác FGF/FGFR3. (A) Liên kết chọn lọc của FGFR3 người bởi R3Mab. Protein khả năng FGFR1-4 Fc ở người được cố định và được ủ với lượng R3Mab tăng dần. Liên kết đặc hiệu được phát hiện sử dụng kháng thể kháng Fab người. (B-C) Phong bế liên kết FGF1 với FGFR3-IIIb người (B) hoặc IIIc (C) bởi R3Mab. Liên kết đặc hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng đặc hiệu FGF1 được biotin hóa. (D-E) Phong bế liên kết FGF9 với FGFR3-IIIb (D) hoặc IIIc (E) người bởi R3Mab. Liên kết đặc hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng đặc hiệu

FGF9 được biotin hóa. Các thanh sai số là sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM) và đôi khi nhỏ hơn so với các ký hiệu.

Fig.9: R3Mab ức chế sự tăng sinh tế bào Ba/F3 được điều khiển bởi FGFR3 kiểu dại và đột biến. (A) Tác dụng ức chế của R3Mab đối với khả năng sống sót của tế bào Ba/F3 biểu hiện FGFR3-IIIb người kiểu dại. Tế bào được nuôi cấy trong môi trường không chứa FGF1 (không có FGF1), hoặc khi có mặt 10 ng/ml FGF1 cộng với 10 µg/ml một mình heparin (FGF1), hoặc kết hợp với kháng thể đối chứng (Đối chứng) hoặc R3Mab. Khả năng sống sót của tế bào được đánh giá với Cell Titer-Glo (Promega) sau 72 giờ ủ với các kháng thể. (B) Sự ức chế quá trình phosphoryl hóa FGFR3 và MAPK bởi R3Mab trong tế bào ổn định Ba/F3-FGFR3-IIIb^{WT}. Xử lý tế bào với 15 ng/ml FGF1 và 10 µg/ml heparin (+) hoặc một mình heparin (-) trong mười phút, sau khi ủ sơ bộ với Ab đối chứng (Ctrl), lượng R3Mab giảm (lần lượt là 1, 0,2, 0,04 µg/ml) trong PBS, hoặc một mình PBS (Mock) trong 3 giờ. Dịch dung giải được thẩm tách miễn dịch để đánh giá quá trình phosphoryl hóa FGFR3 và p44/42 MAPK với các kháng thể lần lượt thành pFGFR^{Y653/654} và pMAPK^{Thr202/Tyr204}. (C) Trình bày bằng sơ đồ điểm nóng đột biến FGFR3 và tần suất ở ung thư bàng quang (đánh số trình tự được mô tả dựa trên trình tự axit amin đồng dạng FGFR3 IIIb) dựa trên các số liệu đã công bố (32). TM, miền xuyên màng; TK1 và TK2, tyrosin kinaza miền 1 và 2. (D-H) Tác dụng ức chế của R3Mab đối với khả năng sống sót của tế bào Ba/F3 biểu hiện thể đột biến FGFR3 liên quan đến ung thư. G372C là thu được từ đồng dạng IIIc, và phần còn lại thu được từ đồng dạng IIIb. Đánh số trình tự cho tất cả các thể đột biến dựa trên trình tự axit amin đồng dạng FGFR3 IIIb (gồm thể đột biến G372C, mà sẽ được đánh số G370C dựa trên trình tự axit amin đồng dạng FGFR3 IIIc). Khả năng sống sót của tế bào được đánh giá sau 72 giờ ủ với các kháng thể như được mô tả ở (A). Các vạch sai số là SEM.

Fig.10: Lập bản đồ epitop cho R3Mab và cấu trúc tinh thể của phức hợp giữa mảnh Fab R3Mab và IgD2-D3 của FGFR3-IIIb người. (A) Epitop được xác định bằng sự liên kết của 13 peptit nối IgD2-D3 của FGFR3 người với R3Mab. Mỗi peptit được biotin hóa được bắt giữ trên giếng vi phiếm được phủ streptavidin và được ủ với R3Mab. R3Mab đã liên kết đặc hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG người ở dê. (B) Sắp xếp thẳng hàng trình tự FGFR3 peptit 3 người (LAVPAANTVRFRCPA (SEQ ID NO:179) và 11 (SDVEFHCKVYSDAQ (SEQ ID NO:180) với các đoạn ngoại bào của FGFR1 người (peptit 3: HAVPAAKTVKFKCPS

(SEQ ID NO:181); peptit 11: SNVEFMCKVYSDPQP (SEQ ID NO:182)). Các gốc FGFR1 tham gia vào tương tác FGF2-FGFR1 bậc một, liên kết heparin, và liên hợp thụ thể-thụ thể được thể hiện lần lượt bằng phong chữ in đậm, in nghiêng, và gạch chân. Việc chỉ định chức năng của các gốc FGFR1 là dựa trên tài liệu Plotnikov et al (34). (C) Cấu trúc của R3Mab Fab (được thể hiện trong dải xoắn, chuỗi nhẹ màu xám, chuỗi nặng màu đen) trong phức hợp với FGFR3 IgD2-D3 người (được thể hiện ở bề mặt phân tử, màu trắng). Các gốc thụ thể có liên quan đến sự liên kết phối tử và dime hóa được tô màu lần lượt là màu ghi/đánh chéo và màu ghi tối dựa trên tài liệu Plotnikov et al (34). (D) Cận cảnh cấu trúc tinh thể thể hiện rằng CDR-H3 và -H2 từ Fab tạo ra các vị trí tương tác chính với IgD2 và IgD3 của FGFR3. (E) Sự xếp chồng của phức hợp FGFR3-IIIc-FGF1 (PDB mã 1RY7) với phức hợp FGFR3-IIIb-Fab. FGFR3-IIIc và FGF1 lần lượt được tô màu ghi và ghi sẫm. FGFR3-IIIb được thể hiện bằng màu trắng và Fab được thể hiện bằng màu ghi nhạt cho chuỗi nhẹ, ghi sẫm cho chuỗi nặng. IgD2 được sử dụng làm neo để chồng lên. Chú ý IgD2 được chồng lên rõ ràng từ cả hai cấu trúc và hình dạng mới được tiếp nhận bởi IgD3 của FGFR3-IIIb khi được liên kết bởi R3Mab. (F) Trình bày khác về sự chồng phức hợp FGFR3-IIIc-FGF1 (PDB mã 1RY7) với phức hợp FGFR3-IIIb-Fab. FGFR3-IIIc và FGF1 được thể hiện dưới dạng bề mặt phân tử mà lần lượt là hoa văn màu ghi/dạng mắt lưới và hoa văn màu ghi sẫm/dạng chấm. FGFR3-IIIb được thể hiện bằng màu trắng và Fab được thể hiện bằng màu ghi với chuỗi nhẹ, màu đen với chuỗi nặng. IgD2 được sử dụng làm neo để xếp chồng. Chú ý IgD2 được xếp chồng rõ ràng từ cả hai cấu trúc và hình dạng mới được tiếp nhận bởi IgD3 của FGFR3-IIIb khi được liên kết bởi R3Mab.

Fig.11: R3Mab ức chế sự tăng sinh, sự phát triển dòng và quá trình dẫn truyền tín hiệu FGFR3 trong tế bào ung thư bàng quang biểu hiện FGFR3^{S249C} kiểu dại hoặc được gây đột biến. (A) Ức chế sự kết hợp [³H]-thymidin bởi R3Mab trong dòng tế bào ung thư bàng quang RT112. Các vạch sai số là SEM. (B) Chặn sự dẫn truyền tín hiệu FGFR3 được hoạt hóa bởi FGF1 bởi R3Mab (15 µg/ml) trong dòng tế bào ung thư bàng quang RT112 so với một mình môi trường điều trị (Mock) hoặc kháng thể đối chứng (Ctrl). Dịch dung giải tế bào được kết tủa miễn dịch với kháng thể kháng FGFR3 và được đánh giá về quá trình phosphoryl hóa FGFR3 với kháng thể kháng phospho-tyrosin (4G10). Dịch dung giải được thẩm tách miễn dịch để phát hiện sự phosphoryl hóa của AKT (pAKT^{S473}) và p44/42 MAPK (pMAPK^{Thr202/Tyr204}). (C) Ức chế sự phát triển dòng bởi

R3Mab (10 $\mu\text{g/ml}$) trong dòng tế bào ung thư bàng quang UMUC-14 (chứa FGFR3^{S249C}) so với một mình môi trường điều trị (Mock) hoặc kháng thể đối chứng (Ctrl). (D) Định lượng của nghiên cứu trong (C) báo cáo số lượng các khuẩn lạc có đường kính lớn hơn 120 μm cho mỗi giếng từ bản sao của 12 giếng. Các vạch sai số là SEM. $P < 3,4 \times 10^{-9}$ so với Mock hoặc Ctrl. (E) Ước chế quá trình phosphoryl hóa FGFR3 trong tế bào UMUC-14 bởi R3Mab (15 $\mu\text{g/ml}$). Sự phosphoryl hóa FGFR3 được phân tích như ở (B). Chú ý sự phosphoryl hóa cấu trúc của FGFR3 trong dòng tế bào này.

Fig.12: R3Mab làm giảm mức trạng thái ổn định của dimer FGFR3^{S249C} được liên kết disulfua bằng cách điều khiển trạng thái cân bằng dimer-monomer về phía trạng thái monomer. (A) Ảnh hưởng của R3Mab đối với dimer FGFR3^{S249C} trong tế bào UMUC-14. Tế bào được ủ với R3Mab (15 $\mu\text{g/ml}$) hoặc kháng thể đối chứng (Ctrl) trong 3 giờ, và dịch dung giải tế bào nguyên vẹn được phân tích bằng phương pháp thẩm tách miễn dịch trong điều kiện không khử và khử. (B) Ảnh hưởng của chất phong bế DTNB không chứa sulfhydryl đến trạng thái cân bằng dimer-monomer FGFR3^{S249C} trong tế bào UMUC-14. Các tế bào UMUC-14 được xử lý với nồng độ tăng dần của DTNB trong 3 giờ, và dịch dung giải tế bào được phân tích như ở (A). (C) Ảnh hưởng của R3Mab đến dimer FGFR3^{S249C} tái tổ hợp được tinh chế in vitro. Dimer FGFR3^{S249C} gồm IgD2-D3 được tinh chế qua cột loại cỡ, và được ủ với PBS (Mock), kháng thể đối chứng (Ctrl), hoặc R3Mab ở 37°C. Các mẫu được thu thập ở thời điểm chỉ định đối với phân tích thẩm tách miễn dịch trong điều kiện không khử. Dimer-monomer FGFR3 được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể lai 6G1 kháng FGFR3 (A-C).

Fig.13: R3Mab ức chế sự phát triển của tế bào ung thư bàng quang ghép ngoại lai và sự phát triển của Ba/F3-FGFR3^{S249C} ghép cùng loài. (A) Tác dụng của R3Mab đối với sự phát triển của mô ghép ngoại lai ung thư bàng quang RT112 đã được thiết lập trước so với đối chứng tá được lỏng. $n=10$ cho mỗi nhóm. (B) Ước chế quá trình dẫn truyền tín hiệu FGFR3 trong mô khối u RT112 bằng R3Mab. Trong thử nghiệm riêng, khối u ghép ngoại lai RT112 được điều trị bằng 15 mg/kg kháng thể đối chứng (Ctrl) hoặc R3Mab trong 48 giờ hoặc 72 giờ được thu thập ($n=3$ cho mỗi nhóm), được đồng nhất hóa và phân tích đối với FRS2 α và sự hoạt hóa MAPK bằng thẩm tách miễn dịch. (C) Tác dụng của R3Mab đến sự phát triển của mô ghép cùng loài Ba/F3-FGFR3^{S249C} được thiết lập trước. $n=10$ cho mỗi nhóm. (D) Tác dụng của R3Mab đến sự phát triển của mô ghép ngoại lai ung thư bàng quang UMUC-14 được thiết lập trước, $n=10$ cho mỗi nhóm. (E)

Tác dụng của R3Mab đến dimer FGFR3^{S249C} và sự dẫn truyền tín hiệu trong mô khối u UMUC-14. Khối u ghép ngoại lai UMUC-14 được điều trị bằng 30 mg/kg kháng thể đối chứng (Ctrl) hoặc R3Mab trong 24 giờ hoặc 72 giờ được thu thập (n = 3 cho mỗi nhóm), được đồng nhất hóa và phân tích đối với dimer-monomer FGFR3^{S249C} cũng như sự hoạt hóa MAPK bằng thẩm tách miễn dịch. Dimer-monomer FGFR3 được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng sc9007 ở thỏ kháng FGFR3 để tránh sự cản trở từ IgG chuột trong dịch dung giải khối u. Các vạch sai số là SEM.

Fig.14: ADCC góp phần vào hiệu quả chống khối u của R3Mab trong mẫu đa u tủy dương tính t(4;14). (A-B) Tác dụng của R3Mab đến sự phát triển của mô ghép ngoại lai u tủy OPM2 (A) và KMS11 (B) đã được thiết lập trước. n = 10 cho mỗi nhóm. (C-F) Sự dung giải tế bào của dòng tế bào u tủy OPM2 (C) và KMS11 (D), hoặc dòng tế bào ung thư bàng quang RT112 (E) và UMUC-14 (F) được cảm ứng bởi R3Mab trong môi trường nuôi cấy tế bào. Tế bào u tủy hoặc ung thư bàng quang được ủ với PBMC người mới được phân lập khi có mặt R3Mab hoặc kháng thể đối chứng. Tác dụng gây độc tế bào được xác định bằng cách đo LDH được giải phóng trong dịch nổi bề mặt. (G-H) Tác dụng của R3Mab hoặc thể đột biến DANA của nó đến sự phát triển của mô ghép ngoại lai u tủy OPM2 (G) và KMS11 (H) đã được thiết lập trước. n = 10 cho mỗi nhóm. Các vạch sai số là SEM và đôi khi nhỏ hơn so với các ký hiệu.

Fig.15: Sự giảm biểu hiện (knockdown) FGFR3 với siARN ức chế sự tăng sinh tế bào của dòng tế bào ung thư bàng quang. Sáu đến bảy FGFR3 siARN khác nhau và ba siARN đối chứng không đặc hiệu được thiết kế và được tổng hợp ở Genentech. Dòng tế bào ung thư bàng quang RT112 (A), SW780 (B), RT4 (C) và UMUC-14 (D) được gieo vào đĩa 96 giếng (3000 tế bào cho mỗi giếng) và được để gắn qua đêm, và chuyển nhiễm tạm thời với 25 nM siARN trong phức hợp với RNAiMax (Invitrogen). 72 giờ sau chuyển nhiễm, [³H]-thymidin (1 μCi cho mỗi giếng) được thêm vào môi trường nuôi cấy (A, C, và D) để ủ thêm 16 giờ. [³H]-thymidin đã kết hợp được định lượng bằng TopCount. Các số liệu được chuẩn hóa từ tế bào được chuyển nhiễm với một mình ARNiMax (Mock). Các vạch sai số là SEM. Bảng dưới: Các vết điển hình thể hiện sự biểu hiện FGFR3 trong tế bào được chuyển nhiễm siARN. (B) Khả năng sống sót của tế bào được đo bằng CellTiter-Glo (Promega) 96 giờ sau khi chuyển nhiễm. Các vạch sai số là SEM.

Fig.16: Sự biểu hiện giảm FGFR3 trong dòng tế bào ung thư bàng quang RT112 kìm hãm chu trình tế bào G1 *in vitro*, và ức chế sự phát triển khối u *in vivo*. Ba FGFR3 ARN khác nhau được thiết kế và được tách dòng vào vector retrovirus biểu hiện shARN được cảm ứng bởi Tet. Dòng ổn định RT112 biểu hiện FGFR3 shARN hoặc shARN đối chứng được thiết lập với sự chọn lọc puromyxin. (A) biểu đồ tần suất của phương pháp đo tế bào dòng phát huỳnh quang ADN của nhân được nhuộm propidium iodua (PI) thu được từ tế bào ổn định RT112 biểu hiện FGFR3 shARN2 hoặc shARN6 sau khi điều trị bằng hoặc không bằng 1 μ g/ml doxyxycyclin trong 72 giờ. (B) Sự phát triển của tế bào ổn định RT112 biểu hiện FGFR3 shARN2-4 (n=11 cho mỗi nhóm điều trị) hoặc FGFR3shARN6-16 (n=10 cho mỗi nhóm điều trị) ở chuột nu/nu. Chuột mang khối u chỉ nhận 5% sucroza (hình tròn nét liền) hoặc 5% sucroza cộng với 1 mg/ml doxyxycyclin (hình vuông nét liền), và khối u được đo bằng thước kẹp hai lần mỗi tuần. Các vạch sai số là SEM.

Fig.17: Tác dụng của các kháng thể lai kháng FGFR3 16G, 6G1 và 15B2 đối với sự tăng sinh tế bào Ba/F3 được điều khiển bởi FGFR3 kiểu dại và được gây đột biến. Các kháng thể lai kháng FGFR3 được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột BALB/c với FGFR3-IIIb /Fc người hoặc thể khảm FGFR3-IIIc /Fc của người. Các tế bào lai đã dung hợp được chọn bằng cách sử dụng phương pháp chọn lọc hypoxanthin-aminopterin-thymidin trong Môi trường D từ bộ kit chọn lọc thể lai ClonaCell® (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada). Các kháng thể lai được sàng lọc lần lượt về khả năng liên kết với FGFR3-IIIb và FGFR3-IIIc bởi ELISA và khả năng nhận diện bề mặt tế bào FGFR3 bởi FACS của chúng. Các thể lai được chọn sau đó được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn. 16G, 6G1 và 15B2 là các dòng được sử dụng để đánh giá tác dụng đối với sự tăng sinh của tế bào Ba/F3 biểu hiện FGFR3 kiểu dại hoặc được gây đột biến tương tự như được mô tả trên Fig.9A. Các vạch sai số là SEM.

Fig.18: So sánh các epitop R3Mab được xác định bằng cách lập bản đồ peptit và phân tích cấu trúc tinh thể. (A) Epitop được bộc lộ bằng cấu trúc của mảnh R3Mab Fab trong phức hợp với mảnh IgD2-D3 ngoại bào của FGFR3 người. Các gốc FGFR3 tiếp xúc bởi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab lần lượt được tô bằng màu đen và ghi. (B) Vị trí của peptit 3 và 11 trên FGFR3.

Fig.19: R3Mab ức chế sự tăng sinh và dẫn truyền tín hiệu FGFR3 trong tế bào ung thư bàng quang chứa FGFR3^{S249C} kiểu dại hoặc được gây đột biến. (A) Tác dụng ức chế

khả năng sống sót của tế bào bởi R3Mab trong dòng tế bào ung thư bàng quang RT4. Khả năng sống sót của tế bào được đánh giá bằng CellTiter-Glo (Promega) sau khi ủ 96 giờ với kháng thể này. Các vạch sai số là SEM. (B) Tác dụng phong bế sự dẫn truyền tín hiệu FGFR3 được hoạt hóa bởi FGF1 bằng R3Mab (15 ug/ml) trong dòng tế bào ung thư bàng quang RT4. (C) Tác dụng ức chế sự kết hợp [^3H]-thymidin bởi R3Mab trong dòng tế bào ung thư bàng quang RCC-97-7 (chứa FGFR3^{S249C}). Các vạch sai số là SEM. (D) Tác dụng ức chế sự phosphoryl hóa FGFR3 trong tế bào TCC-97-7 bởi R3Mab (15 ug/ml). (E) Tác dụng làm giảm đime FGFR3^{S249C} trong tế bào TCC-97-7 sau 3 giờ ủ với R3Mab (15 ug/ml) so với kháng thể đối chứng (Ctrl).

Fig.20: Tác dụng của chất ức chế nhập bào đối với sự nội bào hóa R3Mab và đime FGFR3^{S249C} trong tế bào UMUC-14. (A) Tác dụng của chất ức chế nhập bào đối với sự nội bào hóa của R3Mab. Tế bào UMUC-14, được xử lý sơ bộ bằng nhiều chất ức chế nhập bào khác nhau hoặc DMSO trong 1 giờ ở 37°C, được ủ với R3Mab (15 ug/ml) trong 3 giờ ở 37°C để cho phép nội bào hóa. Phương pháp rửa ở độ pH thấp được sử dụng để loại bỏ R3Mab bề mặt tế bào để quan sát được kháng thể đã được nội bào hóa. Tế bào được cố định và được nhuộm với kháng thể kháng IgG người được đánh dấu Alexa 488. Hình ảnh được chụp bằng cách sử dụng kính hiển vi đồng tiêu. (B) Tác dụng của chất ức chế nhập bào đối với đime FGFR3^{S249C} trong tế bào UMUC-14 được xử lý bằng R3Mab. Các tế bào UMUC-14, được xử lý sơ bộ bằng nhiều chất ức chế nhập bào khác nhau hoặc DMSO trong 1 giờ ở 37°C, được ủ với mock (Hàng 1), kháng thể đối chứng (Hàng 2), hoặc R3Mab (15 ug/ml, Hàng 3) trong 3 giờ ở 37°C. Dịch dung giải tế bào được phân tích đối với protein FGFR3 trong điều kiện không khử hoặc khử bằng phương pháp thẩm tách miễn dịch. Lưu ý rằng clopromazine (chất ức chế nhập bào qua trung gian clathrin) và genistein (toàn bộ chất ức chế nhập bào) phong bế sự nội bào hóa R3Mab, nhưng không có tác dụng làm giảm đime FGFR3^{S249C} gây ra bởi R3Mab.

Fig.21: Phát hiện độ nhạy của các kháng thể kháng FGFR3 khác nhau đối với FGFR3^{S249C} dạng monome và đime trong điều kiện không khử. Các tế bào UMUC-14 được dung giải sau khi xử lý bằng R3Mab (Hàng 1), IgG1 đối chứng (Hàng 2), hoặc PBS (Hàng 3) trong 3 giờ, và dịch dung giải tế bào được đưa vào phân tích thẩm tách miễn dịch trong điều kiện khử hoặc không khử. Lưu ý rằng 6G1 (kháng thể lai ở chuột được tạo ra ở Genentech) đã phát hiện được cả đime và monome FGFR3^{S249C}, trong khi đó

sc9007 (kháng thể đa dòng ở thỏ, Santa Cruz Biotechnology) hoặc sc13121 (kháng thể lai ở chuột, Santa Cruz Biotechnology) ưu tiên phát hiện FGFR3^{S249C} dạng dimer.

Fig.22: Tác dụng của R3Mab đối với sự tăng sinh của tế bào đa u tủy t(4;14)+. (A) Tác dụng ức chế của R3Mab đối với sự kết hợp [³H]-thymidin bởi tế bào UTM2. Các tế bào UTM2 được nuôi trong môi trường chứa R3Mab hoặc kháng thể đối chứng khi có mặt 25 ng/ml FGF9 và 5 ug/ml heparin hoặc một mình heparin (Không FGF9). Sau khi ủ 6 ngày, [³H]-thymidin được bổ sung để ủ 16 giờ. Các số liệu được chuẩn hóa từ tế bào được nuôi khi vắng mặt FGF9 và kháng thể. (B-C) Tác dụng của R3Mab đối với sự kết hợp [³H]-thymidin bởi tế bào OPM2 (B) và KMS11 (C). Tế bào được nuôi trong môi trường 1,5% FBS được xử lý bằng R3Mab hoặc kháng thể đối chứng trong 6 ngày. Các số liệu được chuẩn hóa từ các tế bào chưa được xử lý. Các vạch sai số là SEM.

Fig.23: Mức biểu hiện bề mặt tế bào của FGFR3 trong tế bào u tủy và ung thư bàng quang. (A) Sự biểu hiện FGFR3 bề mặt tế bào trong tế bào u tủy và tế bào ung thư bàng quang được đánh giá bằng phân tích FACS. Tế bào được nhuộm bằng mAb chuột liên hợp phycoerythin kháng FGFR3 người (FAB766P, R&D Systems) hoặc IgG1 ở chuột đối chứng isotyp liên hợp phycoerythin (BD Pharmingen). (B) Phân tích Scatchard mật độ FGFR3 trong tế bào u tủy và tế bào ung thư bàng quang. R3Mab được đánh dấu iot phóng xạ, và được ủ với tế bào trong dịch huyền phù chứa lượng dư kháng thể chưa được đánh dấu. Sau khi ủ ở RT trong 2 giờ, tế bào được tạo viên tròn bằng cách ly tâm và được rửa hai lần. ¹²⁵I liên kết đặc hiệu được xác định. Mật độ thụ thể và ái lực liên kết (Kd) là giá trị trung bình từ hai thử nghiệm liên kết.

Fig.24: Tác dụng của R3Mab hoặc thể đột biến DANA của nó đối với sự phát triển mô ghép ngoại lai của tế bào caxinom bàng quang. (A) Tác dụng của R3Mab và thể đột biến DANA của nó (50 mg/kg mỗi loại) đối với sự phát triển của các khối u RT112 đã được thiết lập trước. (B) Tác dụng của R3Mab và thể đột biến DANA của nó (50 mg/kg mỗi loại) đối với sự phát triển của các khối u UMUC-14 đã được thiết lập trước. Các vạch sai số là SEM.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể kháng FGFR3 mà là hữu ích để, ví dụ, điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh có liên quan đến sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính của FGFR3, như sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính tăng hoặc sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính

không mong muốn. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị khối u, bệnh ung thư, và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào.

Các kháng thể kháng FGFR3 của sáng chế có tác dụng làm chất thử để phát hiện và/hoặc phân lập FGFR3, như phát hiện FGFR3 trong nhiều mô và typ tế bào khác nhau.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra và sử dụng các kháng thể kháng FGFR3, và polynucleotit mã hóa cho các kháng thể kháng FGFR3.

Kỹ thuật chung

Các kỹ thuật và quy trình được mô tả hoặc được nhắc đến ở đây thường đã được hiểu rõ và thường được sử dụng bằng cách sử dụng hệ phương pháp thông thường bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực, như, ví dụ, các hệ phương pháp được sử dụng rộng rãi như được mô tả trong Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); Seri METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames và G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, và ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Định nghĩa

Kháng thể “được phân lập” là kháng thể đã được xác định và phân tách và/hoặc được thu hồi từ thành phần môi trường tự nhiên của nó. Thành phần tạp chất của môi trường tự nhiên của nó là các chất mà sẽ cản trở ứng dụng chẩn đoán hoặc điều trị của kháng thể này, và có thể bao gồm enzym, hormon, và chất tan khác là protein hoặc không phải là protein. Theo các phương án ưu tiên, kháng thể sẽ được tinh chế (1) đến hơn 95% khối lượng kháng thể như được xác định bằng phương pháp Lowry, và tốt nhất là hơn 99% khối lượng, (2) đến mức đủ để thu được ít nhất 15 gốc của trình tự axit amin đầu cùng N hoặc bên trong bằng cách sử dụng máy giải trình tự tự động dạng cốc xoay, hoặc (3) đến khi đồng nhất bởi SDS-PAGE (điện di gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit) trong điều kiện khử hoặc không khử sử dụng xanh Coomassie hoặc, tốt hơn nếu, nhuộm bạc. Kháng thể phân lập bao gồm kháng thể *in situ* trong tế bào tái tổ hợp do ít nhất một thành phần của môi trường tự nhiên của kháng thể sẽ không có mặt. Tuy nhiên, thông thường, kháng thể phân lập sẽ được điều chế bằng ít nhất một bước tinh chế.

Phân tử axit nucleic “được phân lập” là phân tử axit nucleic mà được xác định và được tách từ ít nhất một phân tử axit nucleic tạp chất mà nó thường được kết hợp cùng trong nguồn tự nhiên của axit nucleic này. Phân tử axit nucleic đã phân lập không phải ở dạng hoặc môi trường mà trong đó nó được tìm thấy trong tự nhiên. Do đó, phân tử axit nucleic được phân lập khác biệt với phân tử axit nucleic này khi nó tồn tại trong tế bào tự nhiên. Tuy nhiên, phân tử axit nucleic đã phân lập bao gồm phân tử axit nucleic có trong tế bào mà thường biểu hiện axit nucleic này (ví dụ, axit nucleic mã hóa cho kháng thể) trong đó, ví dụ, phân tử axit nucleic này nằm ở vị trí nhiễm sắc thể khác với trong tế bào tự nhiên.

Thuật ngữ “đánh số gốc miền biến đổi theo Kabat” hoặc “đánh số vị trí axit amin theo Kabat,” và các dạng biến đổi của chúng, chỉ hệ thống đánh số được sử dụng cho miền biến đổi chuỗi nặng hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ của sự biên tập các kháng thể trong Kabat et al., *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Bằng cách sử dụng hệ thống đánh số này, trình tự axit amin thẳng thực tế có thể chứa ít axit amin hơn hoặc chứa axit amin bổ sung khác tương ứng với việc làm ngắn, hoặc gắn xen vào, FR hoặc CDR của miền biến đổi. Ví dụ, miền biến đổi chuỗi nặng có thể bao gồm một đột biến gắn xen axit amin (gốc 52a theo Kabat) sau gốc 52 của H2 và các gốc được gắn xen (ví dụ các gốc 82a, 82b, và 82c, v.v. theo Kabat) sau gốc 82 FR chuỗi nặng. Việc đánh số Kabat các gốc có thể được xác định cho các kháng thể được nêu bằng cách sắp xếp thẳng hàng ở vùng có sự tương đồng trình tự của kháng thể với trình tự được đánh số Kabat “chuẩn”.

Cụm từ “gần như tương tự” hoặc “gần như giống” như được sử dụng ở đây, thể hiện mức độ tương tự đủ cao giữa hai giá trị số (thường một giá trị có liên quan đến kháng thể theo sáng chế và giá trị kia có liên quan đến kháng thể tham chiếu/so sánh) sao cho người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực sẽ coi sự khác biệt giữa hai giá trị này là nhỏ hoặc không có ý nghĩa sinh học và/hoặc ý nghĩa thống kê trong trường hợp đặc tính sinh học này được đo bằng các giá trị này (ví dụ, giá trị Kd). Sự khác biệt giữa hai giá trị này tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 50%, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 40%, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 30%, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 20%, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 10% dưới dạng hàm của giá trị cho kháng thể tham chiếu/so sánh.

“Ái lực liên kết” thường chỉ cường độ của tổng các tương tác không đồng hóa trị giữa một vị trí liên kết của phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác liên kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi có chỉ dẫn khác, như được sử dụng ở đây, “ái lực liên kết” chỉ ái lực liên kết nội tại mà phản ánh tương tác 1:1 giữa các phân tử của cặp liên kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với đối tác Y của nó thường có thể được biểu diễn bởi hằng số phân ly (K_d). K_d mong muốn là 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} , hoặc thậm chí 1×10^{-10} hoặc mạnh hơn. Ái lực có thể được xác định bằng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực, gồm các phương pháp được mô tả ở đây. Các kháng thể ái lực thấp thường liên kết chậm với kháng nguyên và có xu hướng dễ dàng phân ly, trong khi đó các kháng thể ái lực cao thường liên kết kháng nguyên nhanh hơn và có xu hướng duy trì được liên kết lâu hơn. Nhiều phương pháp khác nhau để xác định ái lực liên kết là đã biết trong lĩnh vực, phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đó có thể được sử dụng cho mục đích của sáng chế. Các phương án minh họa cụ thể được nêu dưới đây.

Theo một phương án, “ K_d ” hoặc “giá trị K_d ” theo sáng chế được xác định bằng thử nghiệm liên kết kháng nguyên được đánh dấu phóng xạ (RIA) được thực hiện với dạng Fab của kháng thể cần quan tâm và kháng nguyên của nó như được mô tả bởi thử nghiệm sau đây mà đo ái lực liên kết dung dịch của các Fab đối với kháng nguyên bằng cách tạo cân bằng Fab với nồng độ tối thiểu của kháng nguyên được đánh dấu (^{125}I) khi có mặt dãy chuẩn độ của kháng nguyên chưa được đánh dấu, sau đó bắt giữ kháng nguyên đã liên kết bằng đĩa phủ kháng thể kháng Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881). Để thiết lập điều kiện của thử nghiệm, các đĩa vi phẩm (Dynex) được phủ qua đêm với 5 $\mu\text{g/ml}$ kháng thể kháng Fab bắt giữ (Cappel Labs) trong 50 mM natri cacbonat (pH = 9,6), và sau đó được phong bế bằng 2% (w/v) albumin huyết thanh bò trong PBS trong từ 2 đến 5 giờ ở nhiệt độ trong phòng (xấp xỉ 23°C). Trong các đĩa không hấp thụ (Nunc #269620), 100 pM hoặc 26 pM kháng nguyên [^{125}I] được trộn với các dung dịch pha loãng từng bậc của Fab cần quan tâm (ví dụ, phù hợp với việc đánh giá kháng thể kháng VEGF, Fab-12, trong Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). Sau đó Fab cần quan tâm được ủ qua đêm; tuy nhiên, việc ủ có thể tiếp tục trong khoảng thời gian dài hơn (ví dụ, 65 giờ) để đảm bảo đạt được trạng thái cân bằng. Sau đó, hỗn hợp được chuyển vào đĩa bắt giữ để ủ ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ, trong một giờ). Sau đó dung dịch được loại bỏ và đĩa được rửa tám lần bằng 0,1% Tween-20 trong PBS. Khi

đĩa đã khô, 150 μ l/giếng chất nhấp nháy (MicroScint-20; Packard) được bổ sung vào, và đĩa được đếm trên máy đếm Topcount gamma (Packard) trong mười phút. Các nồng độ của mỗi Fab mà tạo ra ít hơn hoặc bằng 20% liên kết tối đa được chọn để sử dụng trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh. Theo phương án khác, Kd hoặc giá trị Kd được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng BIAcoreTM-2000 hoặc BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ở 25°C với chip CM5 kháng nguyên được cố định ở khoảng 10 đơn vị đáp ứng (RU). Nói ngắn gọn, các chip cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hóa (CM5, BIAcore Inc.) được hoạt hóa bằng N-etyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochlorua (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Kháng nguyên được pha loãng với 10mM natri axetat, pH = 4,8, vào 5 μ g/ml (~0,2 μ M) trước khi tiêm ở tốc độ chảy là 5 μ l/phút để thu được xấp xỉ mười đơn vị đáp ứng (RU) của protein ghép cặp. Sau khi tiêm kháng nguyên, 1M etanolamin được tiêm để phong bế nhóm không phản ứng. Đối với các đại lượng động học, các dung dịch pha loãng từng bậc hai lần của Fab (từ 0,78 nM đến 500 nM) được tiêm trong PBS với 0,05% Tween 20 (PBST) ở 25°C ở tốc độ dòng xấp xỉ 25 μ l/phút. Theo một số phương án, các cải biến sau đây được sử dụng cho phương pháp thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt: kháng thể được cố định vào chip cảm biến sinh học CM5 để đạt được xấp xỉ 400 RU, và đối với các đại lượng động học, các dung dịch pha loãng từng bậc hai lần của protein đích (ví dụ, FGFR3-IIIb hoặc -IIIc) (bắt đầu từ 67 nM) được tiêm trong đệm PBST ở 25°C với tốc độ dòng khoảng 30 μ l/phút. Tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được tính toán bằng cách sử dụng mô hình liên kết Langmuir đơn giản một-với-một (BIAcore Evaluation Software phiên bản 3.2) bằng cách khớp đồng thời đồ thị cảm biến kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (Kd) được tính toán theo tỷ lệ k_{off}/k_{on} . Xem, ví dụ, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Tỷ lệ trên vượt quá $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ bởi thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt trên đây, thì tỷ lệ kết hợp này có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật dập tắt huỳnh quang mà đo sự tăng hoặc giảm cường độ phát huỳnh quang (bước sóng kích thích = 295 nm; bước sóng phát = 340 nm, bộ lọc thông dải 16 nm) ở 25°C của kháng thể kháng kháng nguyên 20nM (dạng Fab) trong PBS, pH = 7,2, khi có mặt các nồng độ tăng dần của kháng nguyên như được xác định trong quang phổ kế, như quang phổ kế được lắp chặn dòng (Aviv Instruments) hoặc quang phổ kế 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) có cuvet đo khuấy.

“Tốc độ on” hoặc “tốc độ của sự kết hợp” hoặc “tốc độ kết hợp” hoặc “ k_{on} ” theo sáng chế còn có thể được xác định bằng cùng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt như được nêu ở trên bằng cách sử dụng BIAcore™-2000 hoặc BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ở 25°C với chip CM5 kháng nguyên cố định ở khoảng 10 đơn vị đáp ứng (RU). Tóm lại, chip cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hóa (CM5, BIAcore Inc.) được hoạt hóa với N-etyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydroclorua (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS) theo hướng dẫn sử dụng của nhà cung cấp. Kháng nguyên được pha loãng với 10mM natri axetat, pH = 4,8, thành 5µg/ml (~0,2µM) trước khi tiêm ở tốc độ dòng 5µl/phút để thu được xấp xỉ mười đơn vị đáp ứng (RU) của protein tạo cặp. Sau khi tiêm kháng nguyên, 1M etanolamin được tiêm để chặn nhóm không phản ứng. Đối với các thông số động học, các dung dịch pha loãng từng bậc hai lần của Fab (từ 0,78 nM đến 500 nM) được tiêm trong PBS với 0,05% Tween 20 (PBST) ở 25°C ở tốc độ dòng xấp xỉ 25µl/phút. Theo một số phương án, các cải biến sau đây được sử dụng cho phương pháp thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt: kháng thể được cố định vào chip cảm biến sinh học CM5 để thu được xấp xỉ 400 RU, và đối với các thông số động học, các dung dịch pha loãng từng bậc hai lần của protein đích (ví dụ, FGFR3-IIIb hoặc -IIIc) (bắt đầu từ 67 nM) được tiêm trong đệm PBST ở 25°C với tốc độ dòng khoảng 30 µl/phút. Tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được tính toán bằng cách sử dụng mô hình liên kết Langmuir đơn giản một-một (BIAcore Evaluation Software phiên bản 3.2) bằng cách khớp đồng thời đồ thị đáp ứng theo thời gian pha kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_d) được tính bằng tỷ số k_{off}/k_{on} . Xem, ví dụ, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Tuy nhiên, nếu tốc độ kết hợp vượt quá $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ bởi thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở trên, thì tốc độ kết hợp tốt hơn nếu được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật dập tắt huỳnh quang mà xác định sự tăng hoặc giảm cường độ phát huỳnh quang (bước sóng kích thích = 295 nm; bước sóng phát = 340 nm, bộ lọc thông dải 16 nm) ở 25°C của 20nM kháng thể kháng kháng nguyên (dạng Fab) trong PBS, pH = 7,2, khi có mặt của các nồng độ tăng dần của kháng nguyên như được xác định trong quang phổ kế, như quang phổ kế lấp chặn dòng (Aviv Instruments) hoặc quang phổ kế 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) có cuvet đo khuấy.

Thuật ngữ “vector” trong bản mô tả này, chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó được liên kết cùng. Một loại vector là “plasmid” chỉ vòng

tròn ADN sợi kép mà các đoạn ADN khác có thể được nối vào đó. Một loại khác của vector là vector thể thực khuẩn. Một loại vector khác là vector virus, trong đó các đoạn ADN khác có thể được nối vào bộ gen virus. Một số vector có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào đó (ví dụ, vector vi khuẩn có gốc sao chép vi khuẩn và vector động vật có vú thuộc thể bổ sung). Các vector khác (ví dụ, vector động vật có vú không thuộc thể bổ sung) có thể được kết hợp vào bộ gen của tế bào chủ nhờ việc đưa vào tế bào chủ, và do đó được sao chép cùng với bộ gen chủ này. Ngoài ra, một số vector có khả năng điều khiển sự biểu hiện của gen mà liên kết chức năng với chúng. Các vector này được gọi trong bản mô tả là “vector biểu hiện tái tổ hợp” (hoặc đơn giản là, “vector tái tổ hợp”). Nhìn chung, vector biểu hiện có ứng dụng trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmit. Trong bản mô tả này, “plasmit” và “vector” có thể được sử dụng thay đổi cho nhau vì plasmit là dạng vector được sử dụng phổ biến nhất.

“Polynucleotit,” hoặc “axit nucleic,” như được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả, chỉ polyme gồm các nucleotit có chiều dài bất kỳ, và gồm ADN và ARN. Nucleotit có thể là deoxyribonucleotit, ribonucleotit, nucleotit được biến đổi hoặc các bazơ, và/hoặc các chất tương tự của chúng, hoặc cơ chất bất kỳ mà có thể được đưa vào polyme bởi ADN hoặc ARN polymeraza, hoặc bằng phản ứng tổng hợp. Polynucleotit có thể chứa nucleotit biến đổi, như nucleotit được metyl hóa và chất tương tự của chúng. Nếu có, sự biến đổi cấu trúc nucleotit có thể được tạo ra trước hoặc sau khi lắp ráp polyme. Trình tự của các nucleotit có thể bị gián đoạn bởi các thành phần không phải nucleotit. Polynucleotit có thể còn được biến đổi sau khi tổng hợp, như bằng sự liên hợp với nhãn. Các kiểu biến đổi khác bao gồm, ví dụ, “lắp mũ”, thế một hoặc nhiều nucleotit có trong tự nhiên bằng nucleotit tương tự, các biến đổi giữa các nucleotit như, ví dụ, các biến đổi với liên kết tích điện (ví dụ, metyl phosphonat, phosphotrieste, phosphoamidat, cacbamat, v.v.) và với liên kết tích điện (ví dụ, phosphorothioat, phosphorodithioat, v.v.), các biến đổi chứa các gốc treo, như, ví dụ, protein (ví dụ, nucleaza, độc tố, các kháng thể, peptit tín hiệu, ply-L-lysin, v.v.), các biến đổi với các chất xen kẽ (ví dụ, acridin, psoralen, v.v.), các biến đổi chứa chất tạo chelat (ví dụ, kim loại, kim loại có hoạt tính phóng xạ, bo, kim loại có tính oxy hóa, v.v.), các biến đổi chứa chất alkyl hóa, các biến đổi có các liên kết thay đổi (ví dụ, axit nucleic dạng alpha anome, v.v.), cũng như dạng chưa được biến đổi của (các) polynucleotit này. Ngoài ra, nhóm hydroxyl bất kỳ thường có mặt trong các đường có thể được thay thế, ví dụ, bởi nhóm phosphonat, nhóm

phosphat, được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ chuẩn, hoặc được hoạt hóa để tạo ra các liên kết bổ sung với nucleotit bổ sung, hoặc có thể được liên hợp với nền dạng rắn hoặc bán rắn. OH đầu 5' và 3' có thể được phosphoryl hóa hoặc được thế bằng amin hoặc các gốc nhóm gắn mũ hữu cơ có từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon. Các hydroxyl khác còn có thể được tạo dẫn xuất với nhóm bảo vệ chuẩn. Polynucleotit còn có thể chứa dạng tương tự của đường riboza hoặc deoxyriboza mà thường là đã biết trong lĩnh vực, bao gồm, ví dụ, 2'-O-metyl-, 2'-O-allyl, 2'-flo- hoặc 2'-azido-riboza, dạng tương tự đường carboxylic, đường dạng alpha-anome, đường epime như arabinoza, xyloza hoặc lyxoza, đường pyranoza, đường furanoza, sedoheptuloza, dạng tương tự không có vòng và dạng tương tự nucleosit bazơ như metyl ribosit. Một hoặc nhiều liên kết phosphodiester có thể được thay thế bằng nhóm liên kết thay thế. Các nhóm liên kết thay thế này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phương án trong đó phosphat được thế bằng P(O)S ("thioat"), P(S)S ("dithioat"), (O)NR₂ ("amidat"), P(O)R, P(O)OR', CO hoặc CH₂ ("formaxetal"), trong đó mỗi R hoặc R' độc lập là H hoặc alkyl (1-20 C) được thế hoặc không được thế tùy ý chứa liên kết ete (-O-), aryl, alkenyl, xycloalkyl, xycloalkenyl hoặc araldyl. Không phải tất cả các liên kết trong polynucleotit cần phải giống nhau. Phần mô tả trên đây áp dụng cho tất cả các polynucleotit được đề cập đến trong bản mô tả, gồm ARN và ADN.

"Oligonucleotit" trong bản mô tả này, thường chỉ các polynucleotit ngắn, thường là sợi đơn, thường là tổng hợp, mà thường là nhưng không nhất thiết phải có chiều dài ít hơn khoảng 200 nucleotit. Thuật ngữ "oligonucleotit" và "polynucleotit" là không loại trừ lẫn nhau. Mô tả ở trên về polynucleotit có thể áp dụng được tương đương và đầy đủ với oligonucleotit.

Tỷ lệ "phần trăm (%) đồng nhất trình tự axit amin" đối với trình tự peptit hoặc polypeptit được xác định là tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin trong trình tự ứng viên mà là giống với các gốc axit amin trong trình tự peptit hoặc polypeptit cụ thể, sau khi sắp xếp thẳng hàng các trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần thiết, để thu được tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự tối đa, và không xem đột biến thế bảo tồn bất kỳ là một phần của sự đồng nhất trình tự. Sự sắp xếp thẳng hàng nhằm mục đích xác định tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được theo nhiều cách khác nhau nằm trong kỹ năng thuộc lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính sẵn có công cộng như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực có thể xác định các tham số thích hợp để

xác định sự sắp xếp thẳng hàng, bao gồm thuật toán bất kỳ cần thiết để thu được sự sắp xếp thẳng hàng tối đa trên toàn bộ chiều dài của trình tự đang được so sánh. Tuy nhiên, với mục đích của sáng chế, giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2, trong đó mã nguồn đầy đủ đối với chương trình ALIGN-2 được đưa ra trong bảng A dưới đây. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genntech, Inc. và mã nguồn đã được nộp cùng với tài liệu người sử dụng ở Cơ quan Bản Quyền Mỹ, Washington D.C., 20559, tại đó nó được đăng ký với số đăng ký bản quyền Mỹ là TXU510087. Chương trình ALIGN-2 là sẵn có công cộng qua Genntech, Inc., South San Francisco, California hoặc có thể được biên soạn từ mã nguồn được đưa ra trong, ví dụ, WO2007/001851. Chương trình ALIGN-2 nên được biên soạn để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, tốt hơn là UNIX kỹ thuật số V4.0D. Tất cả các tham số so sánh trình tự được cài đặt bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

Trong các trường hợp mà trong đó ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, tỷ lệ % đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin A đã cho với, cùng với, hoặc dựa trên trình tự axit amin B đã cho (mà có thể được diễn đạt theo cách khác là trình tự axit amin A đã cho mà có hoặc chứa tỷ lệ % đồng nhất trình tự axit amin với, cùng với, hoặc dựa trên trình tự axit amin B đã cho) được tính toán như sau:

$$100 \times X/Y$$

trong đó X là số lượng các gốc axit amin được tính điểm là các bắt cặp giống nhau bởi chương trình sắp xếp thẳng hàng trình tự ALIGN-2 trong quá trình sắp xếp thẳng hàng A và B của chương trình này, và trong đó Y là tổng số các gốc axit amin trong B. Sẽ được hiểu rằng khi chiều dài của trình tự axit amin A không bằng chiều dài của trình tự axit amin B, tỷ lệ % đồng nhất trình tự axit amin của A với B sẽ không bằng tỷ lệ % đồng nhất trình tự axit amin của B với A.

Theo một số phương án, hai hoặc nhiều trình tự axit amin là đồng nhất ít nhất là 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90%. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều trình tự axit amin là đồng nhất ít nhất là 95%, 97%, 98%, 99%, hoặc thậm chí 100%. Trừ khi có quy định khác, tất cả các giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng ở đây thu được như được mô tả trong đoạn ngay trước đó bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ “FGFR3” trong bản mô tả này, chỉ, trừ khi được chỉ ra cụ thể hoặc trong ngữ cảnh theo cách khác, polypeptit FGFR3 tự nhiên hoặc biến đổi bất kỳ (dù là tự nhiên hoặc tổng hợp) (ví dụ, đồng dạng FGFR3-IIIb hoặc đồng dạng FGFR3-IIIc). Thuật ngữ “trình tự tự nhiên” bao gồm các dạng bị cắt có trong tự nhiên (ví dụ, trình tự miền ngoại bào hoặc trình tự tiểu đơn vị xuyên màng), dạng biến thể có trong tự nhiên (ví dụ, dạng được cắt nối luân phiên) và các biến thể alen có trong tự nhiên. Thuật ngữ “FGFR3 kiểu đại” thường chỉ polypeptit chứa trình tự axit amin của protein FGFR3 có trong tự nhiên. Thuật ngữ “trình tự FGFR3 kiểu đại” thường chỉ trình tự axit amin được tìm thấy trong FGFR3 có trong tự nhiên.

Thuật ngữ “phối tử FGFR3” (được gọi với tên khác là “FGF”) như được sử dụng ở đây, đề cập đến, trừ khi được chỉ ra cụ thể hoặc trong ngữ cảnh theo cách khác, polypeptit phối tử FGFR3 (ví dụ, FGF1, FGF2, FGF4, FGF8, FGF9, FGF17, FGF18, FGF23) tự nhiên hoặc biến đổi bất kỳ (dù tự nhiên hoặc tổng hợp). Thuật ngữ “trình tự tự nhiên” bao gồm cụ thể các dạng bị cắt có trong tự nhiên (ví dụ, trình tự miền ngoại bào hoặc trình tự tiểu đơn vị xuyên màng), dạng biến đổi có trong tự nhiên (ví dụ, dạng được cắt nối luân phiên) và biến thể alen có trong tự nhiên. Thuật ngữ “phối tử FGFR3 kiểu đại” thường chỉ polypeptit chứa trình tự axit amin của protein phối tử FGFR3 có trong tự nhiên. Thuật ngữ “trình tự phối tử FGFR3 kiểu đại” thường chỉ trình tự axit amin được tìm thấy trong phối tử FGFR3 có trong tự nhiên.

“Sự hoạt hóa FGFR3” chỉ sự hoạt hóa, hoặc phosphoryl hóa, thụ thể FGFR3. Thông thường, sự hoạt hóa FGFR3 gây ra sự dẫn truyền tín hiệu (ví dụ gây ra bởi miền kinaza nội bào của các gốc tyrosin phosphoryl hóa thụ thể FGFR3 trong FGFR3 hoặc polypeptit cơ chất). Sự hoạt hóa FGFR3 có thể được gây ra bởi phối tử FGFR liên kết với thụ thể FGFR3 cần quan tâm. Phối tử FGFR3 (ví dụ, như FGF1 hoặc FGF9) liên kết với FGFR3 có thể hoạt hóa miền kinaza của FGFR3 và do đó gây ra sự phosphoryl hóa các gốc tyrosin trong FGFR3 và/hoặc sự phosphoryl hóa các gốc tyrosin trong các polypeptit cơ chất bổ sung.

Thuật ngữ “cơ định” như được sử dụng ở đây, ví dụ như được áp dụng cho hoạt tính kinaza thụ thể, chỉ hoạt tính dẫn truyền tín hiệu liên tục của thụ thể mà không phụ thuộc vào sự có mặt của phối tử hoặc các phân tử hoạt hóa khác. Tùy thuộc vào bản chất của thụ thể, toàn bộ hoạt tính này có thể là cơ định hoặc hoạt tính của thụ thể có thể được hoạt hóa thêm bằng liên kết của các phân tử khác (ví dụ, phối tử). Các sự kiện tế bào dẫn

đến việc hoạt hóa thụ thể là đã biết bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, sự hoạt hóa có thể bao gồm sự oligome hóa, ví dụ, dime hóa, trime hóa, v.v., thành các phức hợp thụ thể bậc cao hơn. Các phức hợp có thể chứa một loại protein duy nhất, tức là, phức hợp dạng đồng hợp phân tử. Theo cách khác, các phức hợp có thể chứa ít nhất hai loại protein khác nhau, tức là, phức hợp dị hợp phân tử. Sự tạo phức có thể được gây ra bởi, ví dụ, sự biểu hiện quá mức của dạng bình thường hoặc dạng đột biến của thụ thể trên bề mặt của tế bào. Sự tạo phức còn có thể được gây ra bởi đột biến hoặc các đột biến cụ thể trong thụ thể.

Thuật ngữ "độc lập phối tử" trong bản mô tả này, ví dụ như được áp dụng với hoạt tính truyền tín hiệu thụ thể, chỉ hoạt tính truyền tín hiệu mà không phụ thuộc vào sự có mặt của phối tử. Thụ thể có hoạt tính kinaza độc lập phối tử sẽ không nhất thiết ngăn cản liên kết của phối tử với thụ thể đó để tạo ra sự hoạt hóa thêm hoạt tính kinaza.

Thuật ngữ "phụ thuộc vào phối tử" trong bản mô tả này, ví dụ như được áp dụng cho hoạt tính truyền tín hiệu thụ thể, chỉ hoạt tính truyền tín hiệu mà phụ thuộc vào sự có mặt của phối tử.

Cụm từ "khuếch đại gen" chỉ quá trình nhờ đó nhiều bản sao của gen hoặc đoạn gen được tạo thành trong tế bào hoặc dòng tế bào cụ thể. Vùng được nhân đôi (đoạn kéo dài của ADN được khuếch đại) thường được gọi là "đơn vị siêu sao chép". Thông thường, lượng ARN thông tin (mARN) được tạo ra, tức là, mức biểu hiện gen, cũng gia tăng về tỷ lệ số lượng các bản sao được tạo ra của gen cụ thể được biểu hiện.

"Chất ức chế tyrosin kinaza" là phân tử ức chế ở một mức nhất định hoạt tính tyrosin kinaza của tyrosin kinaza như thụ thể FGFR3.

Mẫu ung thư hoặc sinh học "thể hiện sự biểu hiện, sự khuếch đại hoặc sự hoạt hóa FGFR3" là mẫu mà, trong xét nghiệm chẩn đoán, biểu hiện (bao gồm việc biểu hiện quá mức) FGFR3, có gen FGFR3 được khuếch đại, và/hoặc theo cách khác thể hiện sự hoạt hóa hoặc phosphoryl hóa FGFR3.

Mẫu ung thư hoặc sinh học "thể hiện sự hoạt hóa FGFR3" là mẫu, mà trong xét nghiệm chẩn đoán, thể hiện sự hoạt hóa hoặc phosphoryl hóa FGFR3. Sự hoạt hóa này có thể được xác định trực tiếp (ví dụ, bằng cách đo sự phosphoryl hóa FGFR3 bởi ELISA) hoặc gián tiếp.

Mẫu ung thư hoặc sinh học "thể hiện sự hoạt hóa FGFR3 cơ định" là mẫu, mà trong xét nghiệm chẩn đoán, thể hiện sự hoạt hóa hoặc phosphoryl hóa cơ định của

FGFR3. Sự hoạt hóa này có thể được xác định trực tiếp (ví dụ, bằng cách đo sự phosphoryl hóa c-FGFR3 bởi ELISA) hoặc gián tiếp.

Mẫu ung thư hoặc sinh học mà “thể hiện sự khuếch đại FGFR3” là mẫu mà trong xét nghiệm chẩn đoán, có gen FGFR3 được khuếch đại.

Mẫu ung thư hoặc sinh học “thể hiện sự hoán vị FGFR3” là mẫu mà, trong xét nghiệm chẩn đoán, có gen FGFR3 được hoán vị. Ví dụ về sự hoán vị FGFR3 là hoán vị t(4;14) xuất hiện trong một số khối u đa u tủy.

“Thử nghiệm phospho-ELISA” trong bản mô tả là thử nghiệm trong đó sự phosphoryl hóa một hoặc nhiều FGFR3, cơ chất hoặc phân tử truyền tín hiệu xuôi dòng được đánh giá trong thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) bằng cách sử dụng chất phản ứng, thường là kháng thể, để phát hiện FGFR3, cơ chất, hoặc phân tử truyền tín hiệu xuôi dòng được phosphoryl hóa. Theo một số phương án, kháng thể mà phát hiện FGFR3 hoặc pMAPK được phosphoryl hóa được sử dụng. Thử nghiệm này có thể được tiến hành trên dịch dung giải tế bào, tốt hơn là từ mẫu sinh học mới hoặc đông lạnh.

Mẫu ung thư hoặc sinh học “thể hiện sự hoạt hóa FGFR3 độc lập phối tử” là mẫu, mà trong xét nghiệm chẩn đoán, thể hiện sự hoạt hóa hoặc phosphoryl hóa FGFR3 độc lập phối tử. Sự hoạt hóa này có thể được đo trực tiếp (ví dụ, bằng cách đo sự phosphoryl hóa FGFR3 bằng ELISA) hoặc gián tiếp.

Mẫu ung thư hoặc sinh học “thể hiện sự hoạt hóa FGFR3 phụ thuộc phối tử” là mẫu mà, trong xét nghiệm chẩn đoán, thể hiện sự hoạt hóa hoặc phosphoryl hóa FGFR3 phụ thuộc phối tử. Sự hoạt hóa này có thể được xác định trực tiếp (ví dụ, bằng cách đo sự phosphoryl hóa FGFR3 bằng ELISA) hoặc gián tiếp.

Mẫu ung thư hoặc sinh học “thể hiện sự hoạt hóa FGFR3 độc lập phối tử” là mẫu, mà trong xét nghiệm chẩn đoán, thể hiện sự hoạt hóa hoặc phosphoryl hóa FGFR3 độc lập phối tử. Sự hoạt hóa này có thể được xác định trực tiếp (ví dụ bằng cách đo sự phosphoryl hóa FGFR3 bằng ELISA) hoặc gián tiếp.

Tế bào ung thư có “sự biểu hiện quá mức hoặc khuếch đại FGFR3” là tế bào có hàm lượng protein hoặc gen FGFR3 cao hơn đáng kể so với các tế bào không ung thư thuộc cùng loại mô. Sự biểu hiện quá mức có thể bị gây ra bởi sự khuếch đại gen hoặc bởi sự phiên mã hoặc dịch mã được tăng lên. Sự biểu hiện quá mức hoặc sự khuếch đại FGFR3 có thể được xác định trong thử nghiệm chẩn đoán hoặc tiên lượng bằng cách

đánh giá mức protein FGFR3 được gia tăng có mặt trên bề mặt của tế bào (ví dụ, thông qua thử nghiệm hóa mô miễn dịch; IHC). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, người ta có thể đo mức axit nucleic mã hóa FGFR3 trong tế bào, ví dụ, nhờ kỹ thuật lai huỳnh quang tại chỗ (FISH; xem WO98/45479 được công bố vào tháng 10/1998), kỹ thuật tách southern, hoặc phản ứng chuỗi polymeaza (PCR), như PCR định lượng thời gian thực (qRT-PCR). Ngoài các thử nghiệm nói trên, các thử nghiệm *in vivo* khác nhau là có sẵn với người thực hành trong lĩnh vực. Ví dụ, một người có thể cho các tế bào bên trong cơ thể bệnh nhân tiếp xúc với kháng thể mà tùy ý được đánh dấu bằng nhãn phát hiện được, ví dụ chất đồng vị phóng xạ, và sự liên kết của kháng thể này với tế bào ở bệnh nhân có thể được đánh giá, ví dụ, bằng cách quét hoạt tính phóng xạ bên ngoài hoặc bằng cách phân tích mẫu sinh thiết lấy từ bệnh nhân đã được tiếp xúc với kháng thể trước đó.

Thuật ngữ “đột biến”, trong bản mô tả này, chỉ sự khác biệt về trình tự axit amin hoặc axit nucleic của protein hoặc axit nucleic cụ thể (gen, ARN) lần lượt so với protein hoặc axit nucleic kiểu dại. Protein hoặc axit nucleic đã được gây đột biến có thể được biểu hiện từ hoặc được tìm thấy trên một alen (dị hợp tử) hoặc cả hai alen (đồng hợp tử) của gen, và có thể là dòng tế bào sinh dưỡng hoặc dòng mầm. Theo sáng chế, các đột biến thường là sinh dưỡng. Các đột biến bao gồm sự sắp xếp lại trình tự như gắn xen, mất khuyết, và các đột biến điểm (bao gồm các hiện tượng đa hình đơn nucleotit/axit amin).

“Ức chế” là làm giảm hoặc khử hoạt tính, chức năng, và/hoặc lượng so với tham chiếu.

Chất có “hoạt tính hoặc chức năng chủ vận” khi chất này bắt chước ít nhất một trong số các hoạt tính chức năng của polypeptit cần quan tâm (ví dụ, phối tử FGFR, như FGF1 hoặc FGF9).

“Kháng thể chủ vận”, trong bản mô tả này, là kháng thể bắt chước ít nhất một trong số các hoạt tính chức năng của polypeptit cần quan tâm (ví dụ, phối tử FGFR, như FGF1 hoặc FGF9).

“Sự biểu hiện” protein chỉ sự chuyển thông tin được mã hóa trong gen thành ARN thông tin (mARN) và sau đó thành protein.

Trong bản mô tả, mẫu hoặc tế bào mà “biểu hiện” protein cần quan tâm (như phối tử thụ thể FGF hoặc thụ thể FGF) là mẫu hoặc tế bào trong đó mARN mã hóa protein

này, hoặc protein này, bao gồm các phân đoạn của chúng, được xác định là có mặt trong mẫu hoặc tế bào này.

“Thể liên hợp miễn dịch” (còn được gọi là “thể liên hợp kháng thể-thuốc” hoặc “ADC”) chỉ kháng thể đã được liên hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như chất hóa trị liệu, thuốc, chất ức chế sự phát triển, độc tố (ví dụ, độc tố protein, độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các phân đoạn của chúng), hoặc chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ (tức là, thể liên hợp phóng xạ).

Thuật ngữ “vùng Fc”, trong bản mô tả này, thường chỉ phức hợp đime gồm trình tự polypeptit đầu cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch, trong đó trình tự polypeptit đầu cùng C là trình tự thu được bằng cách cắt kháng thể nguyên vẹn bằng papain. Vùng Fc có thể chứa trình tự Fc tự nhiên hoặc biến đổi. Mặc dù các giới hạn của trình tự Fc của chuỗi nặng globulin miễn dịch có thể thay đổi, trình tự Fc chuỗi nặng IgG người thường được xác định là kéo dài từ gốc axit amin ở khoảng vị trí Cys226, hoặc từ khoảng vị trí Pro230, đến đầu cùng carboxyl của trình tự Fc. Trình tự Fc của globulin miễn dịch thường bao gồm hai miền hằng định, miền CH2 và miền CH3, và tùy ý chứa miền CH4. Lysin đầu cùng C (gốc 447 theo hệ đánh số EU) của vùng Fc có thể được loại bỏ, ví dụ, trong quá trình tinh chế kháng thể hoặc bằng cách thao tác di truyền tái tổ hợp axit nucleic mã hóa cho kháng thể này. Theo đó, chế phẩm chứa kháng thể có vùng Fc theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể có K447, có toàn bộ K447 được loại bỏ, hoặc hỗn hợp của các kháng thể có và không có gốc K447.

“Polypeptit Fc” trong bản mô tả là một trong số các polypeptit tạo nên vùng Fc. Polypeptit Fc có thể thu được từ globulin miễn dịch thích hợp bất kỳ, như typ phụ IgG₁, IgG₂, IgG₃, hoặc IgG₄, IgA, IgE, IgD hoặc IgM. Theo một số phương án, polypeptit Fc chứa một phần hoặc toàn bộ trình tự bản lề kiểu đại (thường ở đầu cùng N của nó). Theo một số phương án, polypeptit Fc không chứa trình tự bản lề chức năng hoặc kiểu đại.

Kháng thể “phong bế” hoặc kháng thể “đối vận” là kháng thể ức chế hoặc làm giảm hoạt tính sinh học của kháng nguyên liên kết với nó. Các kháng thể phong bế hoặc kháng thể đối vận được ưu tiên ức chế hoàn toàn hoạt tính sinh học của kháng nguyên này.

“Kháng thể trần” là kháng thể mà không được liên hợp với phân tử khác loại, như gốc gây độc tế bào hoặc nhãn phóng xạ.

Kháng thể có “đặc tính sinh học” của kháng thể được chỉ định là kháng thể có một hoặc nhiều đặc tính sinh học của kháng thể đó mà giúp phân biệt nó với các kháng thể khác mà liên kết với cùng kháng nguyên.

Để sàng lọc các kháng thể mà liên kết với epitop trên kháng nguyên được liên kết bởi kháng thể cần quan tâm, thử nghiệm phong bế chéo thông thường như các thử nghiệm được mô tả trong *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow và David Lane (1988), có thể được tiến hành.

Để làm tăng thời gian bán thải của các kháng thể hoặc polypeptit chứa trình tự axit amin theo sáng chế, người ta có thể gắn epitop liên kết thụ thể cứu vào kháng thể (cụ thể là đoạn kháng thể), như được mô tả, ví dụ, trong Bằng Mỹ số 5,739,277. Ví dụ, phân tử axit nucleic mã hóa epitop liên kết thụ thể cứu có thể được liên kết trong khung với axit nucleic mã hóa cho trình tự polypeptit theo sáng chế sao cho protein dung hợp được biểu hiện bởi phân tử axit nucleic được thao tác di truyền chứa epitop liên kết thụ thể cứu và trình tự polypeptit theo sáng chế. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “epitop liên kết thụ thể cứu” chỉ epitop của vùng Fc của phân tử IgG (ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, hoặc IgG₄) mà chịu trách nhiệm làm tăng thời gian bán thải *in vivo* trong huyết thanh của phân tử IgG (ví dụ, Ghetie et al., *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000), bảng 1). Các kháng thể có các đột biến thể trong vùng Fc của chúng và thời gian bán thải trong huyết thanh được gia tăng còn được mô tả trong WO00/42072, WO 02/060919; Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Hinton, *J. Biol. Chem.* 279:6213-6216 (2004)). Theo phương án khác, thời gian bán thải trong huyết thanh còn có thể được tăng lên, ví dụ, bằng cách gắn các trình tự polypeptit khác. Ví dụ, các kháng thể hoặc polypeptit khác hữu dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể được gắn vào albumin huyết thanh hoặc một phần của albumin huyết thanh mà liên kết với thụ thể FcRn hoặc peptit liên kết albumin huyết thanh sao cho albumin huyết thanh liên kết với kháng thể hoặc polypeptit này, ví dụ, trình tự polypeptit này được mô tả trong WO01/45746. Theo một phương án ưu tiên, peptit albumin huyết thanh cần gắn chứa trình tự axit amin là DICLPRWGCLW (SEQ ID NO:183). Theo phương án khác, thời gian bán thải của Fab được gia tăng bằng các phương pháp này. Xem thêm, Dennis et al. *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002) về trình tự peptit liên kết albumin huyết thanh.

“Mảnh” chỉ một phần của phân tử polypeptit hoặc axit nucleic mà chứa, tốt hơn là, ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, hoặc nhiều hơn của

toàn bộ chiều dài của phân tử axit nucleic hoặc polypeptit tham chiếu. Mảnh có thể chứa 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, hoặc 100, 200, 300, 400, 500, 600 nucleotit hoặc nhiều hơn hoặc 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 axit amin hoặc nhiều hơn.

Cụm từ “có ít đến không có chức năng chủ vận” đối với kháng thể theo sáng chế, trong bản mô tả này, chỉ kháng thể không tạo ra lượng có ý nghĩa sinh học của hoạt tính chủ vận, ví dụ, nhờ việc sử dụng cho đối tượng. Sẽ được hiểu trong lĩnh vực này, lượng hoạt tính có thể được xác định định tính hoặc định lượng, miễn là có thể thực hiện được so sánh giữa kháng thể theo sáng chế và đối chứng tham chiếu. Hoạt tính này có thể được đo hoặc phát hiện theo thử nghiệm hoặc kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, gồm, ví dụ, các thử nghiệm hoặc kỹ thuật được nêu trong bản mô tả này. Lượng hoạt tính đối với kháng thể theo sáng chế và đối chứng tham chiếu của nó có thể được xác định song song hoặc được chạy riêng biệt. Theo một số phương án, kháng thể hóa trị hai theo sáng chế không có chức năng chủ vận đáng kể.

Thuật ngữ “chết theo chương trình” và “hoạt tính gây chết theo chương trình” được sử dụng theo nghĩa rộng và chỉ dạng chết của tế bào theo yêu cầu hoặc được kiểm soát ở động vật có vú mà thường được đi kèm theo bởi một hoặc nhiều thay đổi tế bào đặc trưng, bao gồm sự hóa đặc tế bào chất, mất vi nhung mao màng huyết tương, phân đoạn nhân, thoái biến ADN nhiễm sắc thể hoặc mất chức năng ty thể. Hoạt tính này có thể được xác định và được đo bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, bằng thử nghiệm khả năng sống của tế bào, phân tích FACS hoặc điện di ADN, và cụ thể hơn bằng cách liên kết annexin V, phân đoạn ADN, co tế bào, sự giãn nở mạng lưới nội chất, phân đoạn tế bào, và/hoặc sự tạo thành túi màng (được gọi là thể chết theo chương trình).

Thuật ngữ “kháng thể” và “globulin miễn dịch” được sử dụng thay thế lẫn nhau theo nghĩa rộng nhất và bao gồm các kháng thể đơn dòng (ví dụ, các kháng thể đơn dòng nguyên vẹn hoặc có chiều dài đầy đủ), các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa giá, các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép miễn là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn) và còn có thể bao gồm một số mảnh kháng thể (như được nêu chi tiết hơn trong bản mô tả). Kháng thể có thể là của người, được làm tương thích với người, và/hoặc được làm hoàn thiện ái lực.

Thuật ngữ “biến đổi” chỉ thực tế là một số phần của miền biến đổi khác nhau về trình tự giữa các kháng thể và được sử dụng trong việc liên kết và tính đặc hiệu của mỗi kháng thể cụ thể đối với kháng nguyên cụ thể của nó. Tuy nhiên, khả năng biến đổi không được phân bố đồng đều trên toàn bộ miền biến đổi của các kháng thể. Nó được tập trung trong ba đoạn được gọi là các vùng quyết định bổ sung (CDR) hoặc vùng siêu biến cả ở trong miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Các phần bảo toàn cao hơn của miền biến đổi được gọi là khung (FR). Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tự nhiên, mỗi miền chứa bốn vùng FR, phần lớn là cấu trúc phiến β , được nối bởi ba CDR, mà tạo thành các vòng kết nối, và trong một số trường hợp tạo thành một phần của, cấu trúc phiến β . Các CDR trong mỗi chuỗi được giữ gần nhau bởi các vùng FR và, cùng với các CDR từ chuỗi còn lại, góp phần tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên của các kháng thể (xem Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Protein of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Miền hằng định không tham gia trực tiếp vào việc liên kết kháng thể với kháng nguyên, nhưng thể hiện nhiều chức năng hiệu ứng khác nhau, như sự tham gia của kháng thể vào tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể.

Sự cắt kháng thể bằng papain tạo ra hai mảnh liên kết kháng nguyên giống nhau, gọi là mảnh “Fab”, mỗi mảnh có một vị trí liên kết kháng nguyên, và mảnh “Fc” còn lại, mà tên của nó phản ánh khả năng dễ dàng kết tinh của nó. Việc xử lý pepsin tạo ra mảnh $F(ab')_2$ mà có hai vị trí kết hợp kháng nguyên và vẫn có khả năng liên kết chéo kháng nguyên.

“Fv” là mảnh kháng thể nhỏ nhất chứa vị trí nhận biết và liên kết kháng nguyên hoàn thiện. Ở dạng Fv hai chuỗi, vùng này bao gồm dime của một miền biến đổi chuỗi nặng và một miền biến đổi chuỗi nhẹ kết hợp chặt chẽ, không cộng hóa trị. Ở dạng Fv một chuỗi, một miền biến đổi chuỗi nặng và một miền biến đổi chuỗi nhẹ có thể được liên kết cộng hóa trị bằng liên kết peptit linh hoạt sao cho chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể kết hợp trong cấu trúc “dime” tương tự với cấu trúc ở dạng Fv hai chuỗi. Nó ở cấu hình mà ba CDR của mỗi miền biến đổi tương tác để xác định vị trí liên kết kháng nguyên trên bề mặt của dime VH-VL. Cùng với nhau, sáu CDR tạo ra tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên cho kháng thể. Tuy nhiên, ngay cả một miền biến đổi (hoặc một nửa Fv chỉ bao gồm ba CDR đặc hiệu với kháng nguyên) có khả năng nhận biết và liên kết kháng nguyên, mặc dù ở ái lực thấp hơn so với toàn bộ vị trí liên kết.

Mảnh Fab còn chứa miền hằng định của chuỗi nhẹ và miền hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Các mảnh Fab' khác với các mảnh Fab này bởi sự thêm vào một vài gốc ở đầu cùng carboxy của miền CH1 chuỗi nặng bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề kháng thể. Fab'-SH được ký hiệu ở đây cho Fab' trong đó gốc xystein của miền hằng định mang nhóm thiol tự do. Các mảnh kháng thể F(ab')₂ ban đầu được sản sinh dưới dạng các cặp của các mảnh Fab' có các xystein bản lề giữa chúng. Các ghép cặp hóa học khác của các mảnh kháng thể cũng đã biết.

“Chuỗi nhẹ” của kháng thể (globulin miễn dịch) từ loài động vật có xương sống bất kỳ có thể được chỉ định vào một trong số hai typ riêng biệt, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của các miền hằng định của chúng.

Tùy thuộc vào trình tự axit amin của miền hằng định của chuỗi nặng của chúng, globulin miễn dịch có thể được chỉ định vào các lớp khác nhau. Có năm lớp globulin miễn dịch chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài trong số các lớp này có thể còn được chia thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Miền hằng định chuỗi nặng mà tương ứng với các lớp khác nhau của các globulin miễn dịch được gọi lần lượt là α , δ , ϵ , γ , và μ . Các cấu trúc dưới đơn vị và cấu hình ba chiều của các lớp khác nhau của globulin miễn dịch là đã biết. “Các mảnh kháng thể” chứa chỉ một phần của kháng thể nguyên vẹn, trong đó phần này tốt hơn là vẫn giữ ít nhất một, tốt hơn là phần lớn hoặc tất cả, các chức năng mà bình thường có liên quan đến phần này khi có mặt trong kháng thể nguyên vẹn. Ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv; kháng thể kép; các kháng thể thẳng; phân tử kháng thể chuỗi đơn; và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các mảnh kháng thể. Theo một phương án, mảnh kháng thể chứa vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể nguyên vẹn và do đó vẫn giữ khả năng liên kết kháng nguyên. Theo phương án khác, mảnh kháng thể, ví dụ mảnh mà chứa vùng Fc, vẫn giữ được ít nhất một trong số các chức năng sinh học mà bình thường liên quan đến vùng Fc khi có mặt trong kháng thể nguyên vẹn, như liên kết FcRn, sự điều biến thời gian bán thải kháng thể, chức năng ADCC và liên kết bổ thể. Theo một phương án, mảnh kháng thể là kháng thể hóa trị một mà có thời gian bán thải in vivo gần như là tương tự với kháng thể nguyên vẹn. Ví dụ, mảnh kháng thể này có thể chứa trên nhánh liên kết kháng nguyên được liên kết với Fc trình tự có khả năng gây ra tính ổn định in vivo cho mảnh kháng thể này.

Thuật ngữ “vùng siêu biến”, “HVR,” hoặc “HV,” khi được sử dụng trong bản mô tả chỉ các vùng của miền biến đổi kháng thể mà có khả năng biến đổi cao về trình tự và/hoặc tạo thành các vòng xác định về mặt cấu trúc. Thông thường, các kháng thể chứa sáu vùng siêu biến; ba vùng trong VH (H1, H2, H3), và ba vùng trong VL (L1, L2, L3). Nhiều mô tả về vùng siêu biến được sử dụng và được bao gồm trong bản mô tả. Vùng quyết định bổ sung Kabat (CDR) là dựa trên khả năng biến đổi trình tự và được sử dụng phổ biến nhất (Kabat et al., Sequences of Protein of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia lại đề cập đến vị trí của vòng cấu trúc (Chothia và Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Vùng siêu biến AbM là sự thỏa hiệp giữa CDR Kabat và vòng cấu trúc Chothia, và được sử dụng bằng phần mềm tạo mô hình kháng thể AbM của Oxford Molecular. Vùng siêu biến “tiếp xúc” là dựa trên phân tích cấu trúc tinh thể phức hợp sẵn có. Các gốc từ mỗi vùng siêu biến này được chú thích dưới đây.

Vòng	Kabat	AbM	Chothia	Tiếp xúc
----	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Đánh số Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Đánh số Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Vùng siêu biến có thể chứa “vùng siêu biến kéo dài” như sau: 24-36 hoặc 24-34 (L1), 46-56 hoặc 50-56 (L2) và 89-97 (L3) trong VL và 26-35 (H1), 50-65 hoặc 49-65 (H2) và 93-102, 94-102 hoặc 95-102 (H3) trong VH. Các gốc miền biến đổi được đánh số theo Kabat *et al.*, *supra* cho mỗi định nghĩa này.

Các gốc “khung” hoặc “FR” là các gốc miền biến đổi khác với các gốc vùng siêu biến như được xác định trong bản mô tả.

Dạng “được làm tương thích với người” của các kháng thể không phải của người (ví dụ, chuột) là các kháng thể khảm mà chứa trình tự tối thiểu thu được từ globulin miễn dịch không phải của người. Đối với phần lớn, các kháng thể được làm tương thích với người là globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) trong đó các gốc từ vùng biến đổi cao của thể nhận được thay bằng các gốc từ vùng biến đổi cao của loài không phải người (kháng thể cho) như chuột, chuột cống, thỏ hoặc động vật linh trưởng không phải người có tính đặc hiệu, ái lực và khả năng mong muốn. Trong một số ví dụ, các gốc khung (FR) của globulin miễn dịch người được thay bằng các gốc không phải của người tương ứng. Ngoài ra, các kháng thể được làm tương thích với người có thể chứa các gốc mà không được tìm thấy ở kháng thể nhận hoặc kháng thể cho. Các cải biến này được tạo ra để cải thiện thêm hoạt động của kháng thể. Nhìn chung, kháng thể được làm tương thích với người sẽ chứa gần như là toàn bộ của ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như là tất cả các vòng siêu biến tương ứng với của globulin miễn dịch không phải người và tất cả hoặc gần như là tất cả các FR là của trình tự globulin miễn dịch người. Kháng thể được làm tương thích với người tùy ý sẽ còn chứa ít nhất một phần của vùng hằng định globulin miễn dịch (Fc), thường là của globulin miễn dịch người. Để biết chi tiết hơn, xem Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); và Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Xem thêm các bài báo sau và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó: Vaswani và Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle và Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Các kháng thể (globulin miễn dịch) “khảm” có một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ giống với hoặc đồng nhất với trình tự tương ứng ở các kháng thể thu được từ loài cụ thể hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi là giống với hoặc đồng nhất với trình tự tương ứng ở các kháng thể thu được từ loài khác hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể khác, cũng như các mảnh của các kháng thể này, miễn là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn (Patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Kháng thể được làm tương thích với người trong bản mô tả này là tập con của các kháng thể khảm.

Các mảnh kháng thể “Fv chuỗi đơn” hoặc “scFv” chứa miền VH và VL của kháng thể, trong đó các miền này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Thông thường, polypeptit

scFv còn bao gồm cầu nối polypeptit giữa miền VH và VL mà cho phép scFv tạo thành cấu trúc mong muốn để liên kết kháng nguyên. Để xem lại về scFv, xem Pluckthun, trong *Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg và Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

“Kháng nguyên” là kháng nguyên được xác định trước mà, kháng thể có thể liên kết chọn lọc với nó. Kháng nguyên đích có thể là polypeptit, hydrat cacbon, axit nucleic, lipid, hapten hoặc hợp chất có trong tự nhiên hoặc tổng hợp khác. Tốt hơn nếu, kháng nguyên đích là polypeptit.

Thuật ngữ “kháng thể kép” chỉ các mảnh kháng thể nhỏ có hai vị trí liên kết kháng nguyên, các mảnh này chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được nối với miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trong cùng chuỗi polypeptit (VH - VL). Bằng cách sử dụng cầu nối mà là quá ngắn để cho phép bắt cặp giữa hai miền trên cùng chuỗi, các miền này được thúc đẩy để bắt cặp với các miền bổ sung của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên. Các kháng thể kép được mô tả đầy đủ hơn trong, ví dụ, EP 404,097; WO 93/11161; và Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

“Kháng thể người” là kháng thể có trình tự axit amin tương ứng với trình tự của kháng thể được sản sinh bởi người và/hoặc được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ để sản xuất các kháng thể người như được nêu trong bản mô tả. Định nghĩa về kháng thể người này rõ ràng không bao gồm kháng thể được làm tương thích với người chứa các gốc liên kết kháng nguyên không phải của người.

Kháng thể “được hoàn thiện ái lực” là kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi trong một hoặc nhiều CDR của chúng mà tạo ra sự cải thiện ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên, so với kháng thể bố mẹ mà không có các thay đổi này. Kháng thể được hoàn thiện ái lực ưu tiên sẽ có ái lực ở mức nanomol hoặc thậm chí là picomol đối với kháng nguyên đích. Các kháng thể được hoàn thiện ái lực được tạo ra bởi các quy trình đã biết trong lĩnh vực. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) mô tả sự hoàn thiện ái lực bằng cách trộn rối miền VH và VL. Kỹ thuật gây đột biến ngẫu nhiên các gốc CDR và/hoặc khung được mô tả bởi: Barbas *et al.*, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); và Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

“Chức năng hiệu ứng” của kháng thể chỉ hoạt tính sinh học do vùng Fc (vùng Fc trình tự tự nhiên hoặc vùng Fc biến đổi trình tự axit amin) của kháng thể, và thay đổi theo isotyp kháng thể. Ví dụ về chức năng hiệu ứng của kháng thể bao gồm: liên kết C1q và tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể; liên kết thụ thể Fc; tác dụng gây độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC); thực bào; điều hòa giảm thụ thể bề mặt tế bào (*ví dụ*, thụ thể tế bào B); và sự hoạt hóa tế bào B.

“Tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể” hoặc “ADCC” chỉ dạng tác dụng gây độc tế bào trong đó Ig tiết ra được gắn lên thụ thể Fc (FcR) có mặt trên một số tế bào có tác dụng gây độc tế bào (*ví dụ*, tế bào giết tự nhiên (NK), bạch cầu trung tính, và đại thực bào) cho phép các tế bào hiệu ứng gây độc tế bào này liên kết đặc hiệu với tế bào đích mang kháng nguyên và sau đó tiêu diệt tế bào đích bằng các độc tố tế bào. Các kháng thể “trang bị cho” tế bào tác dụng gây độc tế bào và tuyệt đối cần thiết cho tác dụng tiêu diệt này. Tế bào sơ cấp để tạo ra ADCC, tế bào NK, chỉ biểu hiện FcγRIII, trong khi đó các bạch cầu đơn nhân to biểu hiện cả FcγRI, FcγRII và FcγRIII. Sự biểu hiện FcR trên tế bào tạo máu được tóm tắt trong bảng 3 ở trang 464 của tài liệu Ravetch và Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử cần quan tâm, thử nghiệm ADCC *in vitro*, như được mô tả trong Patent Mỹ số 5,500,362 hoặc 5,821,337 hoặc Presta Patent Mỹ số 6,737,056 có thể được tiến hành. Tế bào hiệu ứng hữu dụng cho các thử nghiệm này bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và tế bào giết tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử cần quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, *ví dụ*, ở mô hình động vật như được mô tả trong tài liệu Clynes et al., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

“Tế bào hiệu ứng của người” là các bạch cầu biểu hiện một hoặc nhiều FcR và thực hiện chức năng hiệu ứng. Tốt hơn là, tế bào này biểu hiện ít nhất là FcγRIII và thực hiện chức năng hiệu ứng ADCC. Ví dụ về bạch cầu của người mà gây ra ADCC gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), tế bào giết tự nhiên (NK), bạch cầu đơn nhân to, tế bào T gây độc tế bào và bạch cầu trung tính; với PBMC và tế bào NK được ưu tiên hơn. Tế bào hiệu ứng có thể được phân lập từ nguồn tự nhiên, *ví dụ*, từ máu.

“Thụ thể Fc” hoặc “FcR” mô tả thụ thể mà liên kết với vùng Fc của kháng thể. FcR được ưu tiên là FcR trình tự tự nhiên của người. Hơn nữa, FcR được ưu tiên là thụ thể liên kết với kháng thể IgG (thụ thể gamma) và bao gồm các thụ thể thuộc phân lớp FcγRI, FcγRII, và FcγRIII, bao gồm các biến thể alen và các dạng được cắt nối luân

phiên của các thụ thể này. Các thụ thể FcγRII bao gồm FcγRIIA (“thụ thể hoạt hóa”) và FcγRIIB (“thụ thể ức chế”), có trình tự axit amin tương tự mà chủ yếu khác nhau về miền tế bào chất của chúng. Thụ thể hoạt hóa FcγRIIA chứa motif hoạt hóa dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch (ITAM) trong miền tế bào chất của nó. Thụ thể ức chế FcγRIIB chứa motif ức chế dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch (ITIM) trong miền tế bào chất của nó. (Xem M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR được đánh giá trong Ravetch và Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); và de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Các FcR khác, bao gồm các thụ thể cần được xác định trong tương lai, được bao gồm bởi thuật ngữ “FcR” trong bản mô tả. Thuật ngữ này còn bao gồm thụ thể mới sinh, FcRn, mà chịu trách nhiệm về việc chuyển IgG từ mẹ sang bào thai (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) và Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) và điều hòa sự cân bằng nội mô của globulin miễn dịch. WO 00/42072 (Presta) mô tả biến thể kháng thể có liên kết với FcR giảm hoặc được cải thiện. Xem thêm, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

Phương pháp đo liên kết với FcRn là đã biết (xem, ví dụ, Ghetie 1997, Hinton 2004). Liên kết với FcRn người *in vivo* và thời gian bán thải trong huyết thanh của polypeptit liên kết ái lực cao với FcRn người có thể được thử nghiệm, ví dụ, trong chuột chuyển gen hoặc dòng tế bào của người đã được chuyển nhiễm biểu hiện FcRn của người, hoặc ở các động vật linh trưởng được sử dụng polypeptit biến đổi Fc.

“Tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể” hoặc “CDC” chỉ sự dung giải tế bào đích khi có mặt bổ thể. Tác dụng hoạt hóa con đường bổ thể cổ điển được bắt đầu bằng sự liên kết của thành phần thứ nhất của hệ bổ thể (C1q) với các kháng thể (của phân lớp thích hợp) mà được liên kết với kháng nguyên cùng nguồn gốc của chúng. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC, ví dụ, như được nêu trong Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), có thể được tiến hành.

Biến thể polypeptit có trình tự axit amin vùng Fc biến đổi và khả năng liên kết C1q được tăng hoặc giảm đã được mô tả trong Patent Mỹ số 6,194,551B1 và WO 99/51642. Xem thêm, Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

Thuật ngữ “polypeptit chứa vùng Fc” chỉ polypeptit, như kháng thể hoặc chất kết dính miễn dịch, mà chứa vùng Fc. Lysin đầu cùng C (gốc 447 theo hệ thống đánh số EU) của vùng Fc có thể được loại bỏ, ví dụ, trong quá trình tinh chế polypeptit hoặc bằng các

thao tác di truyền tái tổ hợp axit nucleic mã hóa cho polypeptit này. Theo đó, chế phẩm chứa polypeptit có vùng Fc theo sáng chế có thể chứa polypeptit có K447, có tất cả K447 được loại bỏ, hoặc hỗn hợp của polypeptit có và không có gốc K447.

“Khung nhận của người” cho các mục đích trong bản mô tả là khung chứa trình tự axit amin của khung VL hoặc VH thu được từ khung globulin miễn dịch của người, hoặc từ khung liên ứng của người. Khung nhận của người “thu được từ” khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người có thể chứa cùng một trình tự axit amin của chúng, hoặc có thể chứa các thay đổi trình tự axit amin đã tồn tại trước đó. Khi các thay đổi axit amin đã tồn tại trước đó có mặt, tốt hơn nếu không nhiều hơn 5 và tốt hơn là 4 hoặc ít hơn, hoặc 3 hoặc ít hơn, các thay đổi axit amin đã tồn tại trước đó là có mặt. Khi các thay đổi axit amin đã tồn tại trước đó có mặt trong VH, tốt hơn nếu các thay đổi này chỉ ở ba, hai, hoặc một trong số các vị trí 71H, 73H, và 78H; ví dụ, các gốc axit amin ở các vị trí này có thể là 71A, 73T, và/hoặc 78A. Theo một phương án, khung nhận VL của người là giống về trình tự với trình tự khung globulin miễn dịch VL của người hoặc trình tự khung liên ứng VL của người.

“Khung liên ứng của người” là khung thể hiện gốc axit amin xuất hiện phổ biến nhất trong quá trình chọn lọc trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch của người. Thông thường, việc chọn lọc trình tự VL hoặc VH globulin miễn dịch người là từ phân nhóm của các trình tự miền biến đổi. Thông thường, phân nhóm của các trình tự là phân nhóm như trong Kabat et al. Theo một phương án, với VL, phân nhóm này là phân nhóm kappa I như trong Kabat et al. Theo một phương án, với VH, phân nhóm này là phân nhóm III như trong Kabat et al.

“Khung liên ứng phân nhóm III VH” chứa trình tự liên ứng thu được từ các trình tự axit amin trong phân nhóm III chuỗi nặng biến đổi của Kabat et al. Theo một phương án, trình tự axit amin khung liên ứng phân nhóm III VH chứa ít nhất một phần hoặc toàn bộ của mỗi trình tự sau đây: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:184)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:185)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC (SEQ ID NO:186)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:187).

“Khung liên ứng phân nhóm I VL” chứa trình tự liên ứng thu được từ trình tự axit amin trong phân nhóm I kappa chuỗi nhẹ biến đổi của Kabat et al. Theo một phương án, trình tự axit amin khung liên ứng phân nhóm I VH chứa ít nhất một phần hoặc toàn bộ của mỗi trình tự sau đây:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO:188)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:189)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:190)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:191).

Trong bản mô tả này, “đột biến kháng thể” hoặc “biến thể kháng thể” chỉ biến thể trình tự axit amin của kháng thể trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin của kháng thể phụ thuộc loài này đã được cải biến. Các đột biến này cần có tỷ lệ đồng nhất hoặc tương tự về trình tự ít hơn 100% với kháng thể phụ thuộc loài. Theo một phương án, đột biến kháng thể sẽ có trình tự axit amin có tỷ lệ đồng nhất hoặc tương tự về trình tự axit amin ít nhất là 75% với trình tự axit amin của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể phụ thuộc loài này, tốt hơn nếu ít nhất là 80%, tốt hơn nếu ít nhất là 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 90%, và tốt nhất nếu ít nhất là 95%. Tỷ lệ đồng nhất hoặc tương tự đối với trình tự này được xác định trong bản mô tả dưới dạng tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin trong trình tự ứng viên mà giống (tức là cùng một gốc) hoặc tương tự (tức là gốc axit amin từ cùng một nhóm dựa trên các tính chất chuỗi bên thông thường, xem dưới đây) với các gốc kháng thể phụ thuộc loài, sau khi sắp xếp thẳng hàng các trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần thiết, để thu được tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự tối đa. Không có đột biến nào trong số các đột biến kéo dài, đột biến mất đoạn hoặc đột biến gắn xen vào đầu cùng N, đầu cùng C hoặc bên trong của trình tự kháng thể bên ngoài miền biến đổi sẽ được hiểu là gây ảnh hưởng đến mức đồng nhất hoặc tương tự trình tự.

“Rối loạn” hoặc “bệnh” là tình trạng bất kỳ mà sẽ có lợi từ việc điều trị với chất/phân tử hoặc phương pháp theo sáng chế. Thuật ngữ này bao gồm các rối loạn hoặc bệnh mãn tính và cấp tính bao gồm các tình trạng bệnh mà làm cho động vật có vú mắc rối loạn được đề cập. Ví dụ không giới hạn về các rối loạn cần được điều trị trong bản mô tả gồm các khối u lành tính và ác tính; caxinom, u nguyên bào, và sacôm.

“Việc điều trị” chỉ cả điều trị chữa bệnh và các phương pháp phòng bệnh hoặc ngăn ngừa bệnh. Đối tượng cần điều trị là các đối tượng đã có khối u lành tính, tiền ung thư, hoặc khối u không di căn cũng như các đối tượng trong đó sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh ung thư cần được ngăn ngừa.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu điều trị” chỉ lượng dược chất để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn ở động vật có vú. Trong trường hợp ung thư, lượng hữu hiệu điều trị của dược chất có thể làm giảm số lượng tế bào ung thư; làm giảm kích thước khối u nguyên phát; ức chế (tức là, làm chậm đến một mức độ nào đó và tốt hơn là làm dừng)

sự thâm nhập tế bào ung thư vào cơ quan ngoại vi; ức chế (tức là, làm chậm đến một mức độ nào đó và tốt hơn là làm dừng) sự di căn khối u; ức chế, đến một mức độ nào đó, sự phát triển khối u; và/hoặc làm nhẹ đến một mức độ nào đó một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến rối loạn này. Ở một mức độ nhất định, thuốc có thể ngăn ngừa sự phát triển và/hoặc tiêu diệt tế bào ung thư đang tồn tại, nó có thể có tính kìm hãm tế bào và/hoặc gây độc tế bào. Đối với liệu pháp điều trị ung thư, tính hiệu quả in vivo có thể, ví dụ, được xác định bằng cách đánh giá khoảng thời gian sống sót, thời gian tiến triển bệnh (TTP), tỷ lệ đáp ứng (RR), thời gian đáp ứng, và/hoặc chất lượng cuộc sống.

Thuật ngữ “ung thư” và “thuộc ung thư” chỉ hoặc mô tả tình trạng sinh lý học ở động vật có vú mà thường được đặc trưng bởi sự phát triển tế bào không được điều tiết. Được bao gồm trong định nghĩa này là ung thư lành tính và ác tính. “Ung thư giai đoạn đầu” hoặc “khối u giai đoạn sớm” chỉ ung thư không xâm lấn hoặc di căn hoặc được phân loại là ung thư giai đoạn 0, I, hoặc II. Ví dụ về ung thư bao gồm, nhưng không giới hạn ở, caxinom, u bạch huyết, u nguyên bào (gồm u nguyên bào tủy và u nguyên bào võng mạc), sacôm (gồm sacôm mỡ và sacôm tế bào hoạt dịch), khối u nội tiết thần kinh (gồm khối u carcinoid, u bài tiết gastrin, và ung thư tế bào đảo), u thần kinh nội tiết, u tế bào schwan (gồm u dây thần kinh thính giác), u màng não, caxinom tuyến, ung thư tế bào hắc tố, và bệnh bạch cầu hoặc bệnh ác tính lympho. Các ví dụ cụ thể về các bệnh ung thư này bao gồm ung thư tế bào vảy (ví dụ ung thư tế bào vảy biểu mô), ung thư phổi bao gồm ung thư phổi tế bào nhỏ (SCLC), ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC), caxinom tuyến ở phổi và caxinom phổi có vảy, ung thư màng bụng, ung thư tế bào gan, ung thư dạ dày hoặc hệ tiêu hóa bao gồm ung thư dạ dày-ruột, ung thư tụy, u nguyên bào thần kinh, ung thư cổ tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư gan, ung thư vú (bao gồm ung thư vú di căn), ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư ruột già, caxinom nội mạc tử cung hoặc tử cung, caxinom tuyến nước bọt, ung thư thận hoặc ung thư thuộc thận, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư âm hộ, ung thư tuyến giáp, caxinom gan, caxinom hậu môn, caxinom dương vật, ung thư tinh hoàn, ung thư thực quản, khối u đường dẫn mật, cũng như ung thư đầu và cổ và đa u tủy.

Thuật ngữ “tiền ung thư” chỉ tình trạng bệnh hoặc sự phát triển mà thường xảy ra trước hoặc phát triển thành ung thư. Sự phát triển “tiền ung thư” sẽ có tế bào được đặc trưng bởi sự điều hòa chu kỳ tế bào, sự tăng sinh, hoặc biệt hóa tế bào bất thường, mà có

thể được xác định bằng chất đánh dấu quá trình điều hòa chu kỳ, tăng sinh, hoặc biệt hóa tế bào.

“Chứng loạn sản” chỉ sự tăng trưởng hoặc sự phát triển bất thường bất kỳ của mô, cơ quan, hoặc tế bào. Tốt hơn nữa, chứng loạn sản là ở mức cao hoặc thuộc tiền ung thư.

“Di căn” chỉ sự lan rộng của ung thư từ vị trí ban đầu của nó sang các chỗ khác trong cơ thể. Tế bào ung thư có thể rời bỏ khối u ban đầu, xâm lấn vào các mạch máu và mạch bạch huyết, tuần hoàn qua dòng máu, và phát triển ở các vị trí xa (di căn) trong các mô bình thường nằm đâu đó trong cơ thể. Di căn có thể là khu trú hoặc xa. Di căn là quá trình liên tiếp, phụ thuộc vào việc tế bào khối u rời khỏi khối u ban đầu, di chuyển theo dòng máu, và dừng ở vị trí xa. Ở vị trí mới, tế bào thiết lập sự cung cấp máu và có thể phát triển để tạo thành khối đe dọa sự sống.

Cả con đường kích thích và ức chế phân tử bên trong tế bào khối u điều hòa hoạt động này, và các tương tác giữa tế bào khối u và tế bào chủ ở vị trí xa là cũng có ý nghĩa.

“Không di căn” chỉ ung thư lành tính hoặc vẫn ở vị trí ban đầu và không xâm lấn vào hệ mạch bạch huyết hoặc hệ mạch máu hoặc đến các mô nằm ngoài vị trí ban đầu. Thông thường, ung thư không di căn là bệnh ung thư bất kỳ mà là ung thư giai đoạn 0, I, hoặc II, và thường là ung thư giai đoạn III.

“Khối u ban đầu” hoặc “ung thư ban đầu” chỉ bệnh ung thư ban đầu và không có thương tổn di căn nằm trong các mô, cơ quan, hoặc vị trí khác trong cơ thể của đối tượng.

“Khối u lành tính” hoặc “ung thư lành tính” chỉ khối u mà vẫn nằm ở vị trí ban đầu và không có khả năng thâm nhiễm, xâm nhập, hoặc di căn đến vị trí xa.

“Gánh nặng khối u” chỉ số lượng tế bào ung thư, kích thước của khối u, hoặc lượng ung thư trong cơ thể. Gánh nặng khối u còn được gọi là lượng tải khối u.

“Số lượng khối u” là số lượng khối u.

“Đối tượng” là động vật có vú, gồm, nhưng không giới hạn ở, người hoặc động vật có vú không phải người, như bò, ngựa, chó, cừu, hoặc mèo. Tốt hơn, nếu đối tượng là người.

Thuật ngữ “liệu pháp chống ung thư” chỉ liệu pháp hữu dụng trong điều trị ung thư. Ví dụ về dược chất chống ung thư bao gồm, nhưng giới hạn ở, ví dụ, chất hóa trị liệu, chất ức chế phát triển, chất gây độc tế bào, chất được sử dụng trong liệu pháp phóng xạ, chất chống sự tạo mạch, chất gây chết tế bào theo chương trình, chất chống tubulin,

và các chất khác để điều trị ung thư, các kháng thể kháng CD20, chất ức chế yếu tố tăng trưởng thu được từ tiểu cầu (ví dụ, Gleevec™ (Imatinib Mesylate)), chất ức chế COX-2 (ví dụ, celecoxib), interferon, xytokin, chất đối kháng (ví dụ, các kháng thể trung hòa) mà liên kết với một hoặc nhiều đích sau: thụ thể ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA hoặc VEGF, TRAIL/Apo2, và các hóa chất hữu cơ và có hoạt tính sinh học khác, v.v. Hỗn hợp của chúng cũng được bao gồm trong sáng chế.

Thuật ngữ “chất gây độc tế bào” trong bản mô tả này chỉ chất ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng của tế bào và/hoặc gây phá hủy tế bào. Thuật ngữ này được dự định bao gồm các chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ (ví dụ, I^{131} , I^{125} , Y^{90} và Re^{186}), chất hóa trị liệu, và các độc tố như các độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng.

“Chất hóa trị liệu” là hợp chất hóa học hữu dụng trong điều trị ung thư. Ví dụ về chất hóa trị liệu gồm hợp chất hóa học hữu dụng trong điều trị ung thư. Ví dụ về chất hóa trị liệu gồm chất alkyl hóa như thiotepa và xyclophosphamid CYTOXAN®; các alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; aziridin như benzodopa, carboquone, meturedopa, và uredopa; etylenimin và metylamelamin gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, triethylenethiophosphoramit và trimetylolomelamin; axetogenin (đặc biệt là bullatacin và bullatacinon); camptothecin (gồm topotecan tương tự tổng hợp); bryostatin; callystatin; CC-1065 (bao gồm chất tương tự tổng hợp adozelesin, carzelesin và bizelesin của nó); cryptophyxin (cụ thể là cryptophyxin 1 và cryptophyxin 8); dolastatin; duocarmyxin (gồm các chất tương tự tổng hợp, KW-2189 và CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; mù tạt nitơ như chlorambuxil, chlornaphazin, cholophosphamid, estramustin, ifosfamid, mechlorethamin, meclorethamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phensterin, prednimustin, trofosfamid, mù tạt uraxil; nitrosure như carmustine, clorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, và ranimustine; các chất kháng sinh như chất kháng sinh enediyne (e. g., calicheamicin, đặc biệt là calicheamicin gammaII và calicheamicin omegaII (xem, ví dụ, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))); dynemixin, gồm dynemixin A; bisphosphonat, như clodronat; esperamicin; cũng như nhóm mang màu neocarzinostatin và nhóm mang màu kháng sinh chromoprotein enediyne có liên quan), aclacinomycin, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycin, cactinomycin, carabycin, carminomycin, carzinophilin, chromomycini, dactinomycin, daunorubicin,

detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, ADRIAMYCIN® doxorubicin (bao gồm morpholino-doxorubicin, xyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin và deoxydoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycin như mitomycin C, axit mycophenolic, nogalamycin, olivomycin, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; chất chống chuyển hóa như methotrexat và 5-florouracil (5-FU); chất tương tự axit folic như denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprine, thioguanine; chất tương tự pyrimidin như ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridin, enocitabin, floxuridin; các androgen như calusterone, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolacton; chất chống thượng thận như aminoglutethimit, mitotane, trilostane; chất độn axit folic như axit frolinic; aceglatone; aldophosphamit glycoside; axit aminolevulinic; eniluraxil; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamin; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium axetat; epothilone; etoglucid; gallium nitrat; hydroxyurea; lentinan; lonidainine; maytansinoid như maytansine và ansamitocin; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmol; nitraerine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; losoxantrone; axit podophyllinic; 2-etylhydrazide; procarbazine; phức hợp polysacarit PSK® (JHS Natural Product, Eugene, OR); razoxan; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; axit tenuazonic; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotrietylamin; trichothecene (đặc biệt là độc tố T-2, verracurin A, roridin A và anguidine); uretan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosin; arabinoside ("Ara-C"); xyclophosphamit; thiotepa; các taxoid, ví dụ, paclitaxel TAXOL® (Bristol- Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), chế phẩm không chứa hạt nano được xử lý albumin không cremophor của paclitaxel ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), và doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); chloranbucil; gemcitabine GEMZAR®; 6-thioguanin; mercaptopurine; methotrexate; chất tương tự platin như cisplatin và carboplatin; vinblastine; platin; etoposide (VP-16); ifosfamid; mitoxantrone; vincristine; NAVELBINE® vinorelbine; novantrone; teniposide; edatrexate; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; irinotecan (Camptosar, CPT-11) (gồm phác đồ điều trị irinotecan cùng với 5-FU và leucovorin); chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflorometlhyllornithin (DMFO); các retinoid như axit retinoic; capecitabine;

combretastatin; VELCADE bortezomib; REVLIMID lenalidomide; leucovorin (LV); oxaliplatin, gồm chế độ điều trị oxaliplatin (FOLFOX); chất ức chế PKC- α , Raf, H-Ras, EGFR (ví dụ, erlotinib (TarcevaTM)) và VEGF-A làm giảm sự tăng sinh tế bào và muối được dùng, axit hoặc dẫn xuất của chất bất kỳ trong số các chất trên.

Còn được bao gồm trong định nghĩa này là chất kháng hormon mà có tác dụng điều hòa hoặc ức chế tác dụng hormon trên khối u như kháng estrogen và chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (SERM), bao gồm, ví dụ, tamoxifen (gồm NOLVADEX[®] tamoxifen), raloxifene, droloxifene, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, và FARESTON[®] toremifen; chất ức chế aromataza ức chế enzym aromataza, điều hòa sự sản sinh estrogen trong tuyến thượng thận, như, ví dụ, 4(5)-imidazol, aminoglutethimit, megestrol axetat MEGASE[®], exemestan AROMASIN[®], formestanie, fadrozole, vorozole RIVISOR[®], letrozole FEMARA[®], và anastrozole ARIMIDEX[®]; và chất kháng androgen như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolide, và goserelin; cũng như troxacitabine (chất tương tự 1,3-dioxolan nucleosit xytosin); oligonucleotit đối nghĩa, cụ thể là các chất ức chế sự biểu hiện của gen trong con đường dẫn truyền tín hiệu liên quan đến sự tăng sinh tế bào bất thường, như, ví dụ, PKC- α , Raf và H-Ras; các ribozym như chất ức chế sự biểu hiện VEGF (ví dụ, ribozym ANGIOZYME[®]) và chất ức chế sự biểu hiện HER2; các vắc xin như vắc xin liệu pháp gen, ví dụ, vắc xin ALLOVECTIN[®], vắc xin LEUVECTIN[®], và vắc xin VAXID[®]; PROLEUKIN[®] rIL-2; LURTOTECAN[®] chất ức chế topoisomeraza 1; ABARELIX[®] rmRH; Vinorelbine và Esperamicins (xem Pat. Mỹ số 4,675,187), và muối được dùng, axit hoặc dẫn xuất của chất bất kỳ trong số các chất trên.

Thuật ngữ “tiền dược chất” như được sử dụng trong sáng chế chỉ tiền chất hoặc dạng dẫn xuất của dược chất mà ít gây độc tế bào đối với tế bào khối u so với dược chất gốc và có khả năng được hoạt hóa bằng enzym hoặc được chuyển hóa thành dạng gốc có hoạt tính mạnh hơn. Xem, ví dụ, Wilman, “Prodrug in Cancer Chemotherapy” *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) và Stella et al., “Prodrug: A Chemical Approach to Directed Drug Delivery,” *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Tiền dược chất theo sáng chế gồm, nhưng không giới hạn ở, tiền dược chất chứa phosphat, tiền dược chất chứa thiophosphat, tiền dược chất chứa sulfat, tiền dược chất chứa peptit, tiền dược chất được biến đổi D-axit amin, tiền dược chất được glycosyl hóa, tiền dược chất chứa β -

lactam, tiền dược chất chứa phenoxyaxetamit được thể tùy ý hoặc tiền dược chất chứa phenylaxetamit được thể tùy ý, 5-flocytosine và các tiền dược chất 5-florouridin khác mà có thể được chuyển hóa thành dược chất tự do gây độc tế bào có hoạt tính mạnh hơn. Ví dụ về thuốc gây độc tế bào mà có thể được tạo dẫn xuất thành dạng tiền dược chất để sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất hóa trị liệu được nêu ở trên.

“Liệu pháp phóng xạ” là việc sử dụng các tia gamma hoặc tia beta được định hướng để gây tổn thương thích hợp đến tế bào để giới hạn khả năng hoạt động bình thường của nó hoặc để phá hủy hoàn toàn tế bào. Sẽ được hiểu rõ là có nhiều cách đã biết trong lĩnh vực để xác định liều lượng và thời gian điều trị. Các phương pháp điều trị điển hình được đưa ra là sử dụng một lần và các liều lượng điển hình nằm trong khoảng từ 10 đến 200 đơn vị (Grays) mỗi ngày.

“Mẫu sinh học” (được gọi theo cách khác là “mẫu” hoặc “mẫu mô hoặc mẫu tế bào”) bao gồm nhiều loại mẫu thu được từ cá thể và có thể được sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán hoặc theo dõi. Định nghĩa này bao gồm các mẫu máu và các mẫu chất lỏng khác có nguồn gốc sinh học, mẫu mô rắn như mẫu sinh thiết hoặc môi trường nuôi cấy mô hoặc tế bào thu được từ đó, và thể hệ con của chúng. Định nghĩa này còn bao gồm các mẫu mà đã được thao tác theo cách bất kỳ sau khi thu được chúng, như bằng cách xử lý với chất phản ứng, hòa tan, hoặc làm giàu các thành phần, như protein hoặc polynucleotit, hoặc gắn vào chất nền dạng rắn hoặc bán rắn nhằm mục đích phân cắt. Thuật ngữ “mẫu sinh học” bao gồm mẫu lâm sàng, và còn bao gồm tế bào trong môi trường nuôi cấy, chất nổi bề mặt tế bào, dịch dung giải tế bào, huyết thanh, huyết tương, chất lưu sinh học, và mẫu mô. Nguồn mẫu sinh học có thể là mô rắn như từ mẫu cơ quan hoặc mô mới, đông lạnh và/hoặc được bảo quản hoặc sinh thiết hoặc mẫu được hút ra; máu hoặc thành phần máu bất kỳ; dịch cơ thể như dịch não tủy, dịch màng ối, dịch màng bụng, hoặc dịch kẽ mô; các tế bào từ thời điểm bất kỳ trong thời kỳ thai nghén hoặc trong giai đoạn phát triển của cá thể. Theo một số phương án, mẫu sinh học thu được từ khối u nguyên phát hoặc di căn. Mẫu sinh học có thể chứa các hợp chất mà không được trộn lẫn tự nhiên với mô trong tự nhiên như chất bảo quản, chất chống đông tụ, chất đệm, thuốc hãm, chất dinh dưỡng, chất kháng sinh, hoặc các chất tương tự.

Với các mục đích của sáng chế, một “phần” của mẫu mô là một phần hoặc miếng của mẫu mô, ví dụ, lát mỏng của mô hoặc tế bào cắt từ mẫu mô. Được hiểu là nhiều phần

của mẫu mô có thể được lấy và đưa đi phân tích theo sáng chế. Theo một số phương án, cùng một phần của mẫu mô được phân tích ở cả hai mức hình thái học và phân tử, hoặc được phân tích về cả protein và axit nucleic.

Từ “chất đánh dấu” khi được sử dụng trong bản mô tả chỉ hợp chất hoặc chế phẩm mà được liên hợp hoặc được dung hợp trực tiếp hoặc gián tiếp với chất phản ứng như đoạn dò axit nucleic hoặc kháng thể và tạo thuận lợi cho việc phát hiện các chất phản ứng mà nó được liên hợp hoặc được dung hợp cùng. Chính chất đánh dấu này có thể được phát hiện (ví dụ, chất đánh dấu đồng vị phóng xạ hoặc chất đánh dấu phát huỳnh quang) hoặc, trong trường hợp chất đánh dấu enzym, có thể xúc tác cho sự biến đổi hóa học của cơ chất hoặc chế phẩm phát hiện được.

Chế phẩm và phương pháp sáng chế

Sáng chế bao gồm chế phẩm, bao gồm được phẩm, chứa kháng thể kháng FGFR3; và polynucleotit chứa trình tự mã hóa cho kháng thể kháng FGFR3. Trong bản mô tả này, chế phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể mà liên kết với FGFR3, và/hoặc một hoặc nhiều polynucleotit chứa trình tự mã hóa cho một hoặc nhiều kháng thể mà liên kết với FGFR3. Chế phẩm này có thể còn chứa chất mang thích hợp, như tá dược được dung gồm chất đệm, mà đã được biết rõ trong lĩnh vực.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể đã và polynucleotit được phân lập theo sáng chế. Sáng chế còn bao gồm kháng thể và polynucleotit gần như tinh khiết.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng FGFR3 để sử dụng trong phương pháp điều trị rối loạn, ví dụ đa u tủy hoặc caxinom giai đoạn chuyển tiếp (ví dụ, caxinom giai đoạn chuyển tiếp xâm lấn) (như được nêu trong bản mô tả này).

Chế phẩm

Các kháng thể kháng FGFR3 tốt hơn nếu là đơn dòng. Còn được bao gồm là các mảnh Fab, Fab', Fab'-SH và F(ab')₂ của các kháng thể kháng FGFR3 được đề xuất ở đây. Các mảnh kháng thể này có thể được tạo ra bằng phương pháp truyền thống, như sự phương pháp phân cắt bằng enzym, hoặc có thể được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp. Các mảnh kháng thể này có thể là thể khảm hoặc được làm tương thích với người. Các mảnh này là hữu dụng cho các mục đích chẩn đoán và điều trị như nêu dưới đây.

Các kháng thể đơn dòng thu được từ quần thể các kháng thể gần như là đồng nhất, *tức là*, các kháng thể đơn lẻ tạo thành quần thể này là giống nhau ngoại trừ các đột biến

có thể có trong tự nhiên mà có thể có mặt với lượng nhỏ. Do đó, bổ ngữ “đơn dòng” chỉ đặc điểm của kháng thể là không phải là hỗn hợp của các kháng thể riêng biệt.

Các kháng thể đơn dòng kháng FGFR3 có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp lai được mô tả đầu tiên bởi Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), hoặc có thể được tạo ra bằng phương pháp ADN tái tổ hợp (Patent Mỹ số 4,816,567).

Trong phương pháp lai, chuột hoặc động vật chủ thích hợp khác, như chuột hàng, được gây miễn dịch để kích thích các tế bào lympho mà sản sinh ra hoặc có khả năng sản sinh ra các kháng thể mà sẽ liên kết đặc hiệu với protein được sử dụng để gây miễn dịch. Các kháng thể với FGFR3 có thể được sinh ra ở động vật bằng cách tiêm nhiều lần FGFR3 và chất phụ trợ dưới da (sc) hoặc tiêm trong màng bụng (ip). FGFR3 có thể được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực, một số phương pháp trong số này cũng được nêu trong bản mô tả. Ví dụ, phương pháp sản xuất tái tổ hợp FGFR3 của người và chuột được nêu dưới đây. Theo một phương án, động vật được gây miễn dịch với FGFR3 đã được dung hợp với phần Fc của chuỗi nặng globulin miễn dịch. Theo phương án ưu tiên, động vật được gây miễn dịch với protein dung hợp FGFR3-IgG1. Động vật thường được gây miễn dịch kháng lại các thể liên hợp miễn dịch hoặc dẫn xuất của FGFR3 với monophosphoryl lipid A (MPL)/trehalosa dicrynomycolat (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) và dung dịch được tiêm trong da ở nhiều vị trí. Hai tuần sau, các con vật được tiêm nhắc lại. 7 đến 14 ngày sau, các con vật được lấy máu và huyết thanh được phân tích về hiệu giá kháng FGFR3. Các con vật được tiêm nhắc lại cho đến khi đạt đến trạng thái ổn định hiệu giá.

Theo cách khác, các tế bào lympho có thể được gây miễn dịch *in vitro*. Sau đó các tế bào lympho được dung hợp với tế bào u tủy bằng cách sử dụng chất dung hợp thích hợp, như polyetylen glycol, để tạo thành tế bào lai (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Do đó, tế bào lai đã tạo ra được gieo và nuôi trong môi trường nuôi cấy thích hợp mà tốt hơn nếu chứa một hoặc nhiều chất ức chế sự phát triển hoặc khả năng sống sót của tế bào u tủy bố mẹ chưa dung hợp. Ví dụ, nếu tế bào u tủy bố mẹ thiếu enzym hypoxanthin guanin phosphoribosyl transferaza (HGPRT hoặc HPRT), môi trường nuôi cấy cho thể lai thường sẽ bao gồm hypoxanthin, aminopterin, và thymidin (môi trường HAT), các chất này ngăn ngừa sự phát triển của tế bào thiếu HGPRT.

Tế bào u tủy được ưu tiên là các tế bào dung hợp hiệu quả, hỗ trợ quá trình sản sinh kháng thể ổn định ở mức cao bởi các tế bào sản xuất kháng thể chọn lọc, và là nhạy với môi trường như môi trường HAT. Trong số các tế bào này, dòng tế bào u tủy được ưu tiên là dòng u tủy của chuột, như thu được từ khối u chuột MOPC-21 và MPC-11 sẵn có ở Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, và tế bào SP-2 hoặc X63-Ag8-653 sẵn có từ American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Dòng tế bào u tủy của người và u tủy khác loại chuột-người còn được mô tả để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Môi trường nuôi cấy trong đó tế bào lai đang phát triển được thử nghiệm để sản xuất các kháng thể đơn dòng kháng FGFR3. Tốt hơn nữa, tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi tế bào lai được xác định bằng các kết tủa miễn dịch hoặc bằng thử nghiệm liên kết *in vitro*, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (ELISA).

Ái lực liên kết của kháng thể đơn dòng có thể, ví dụ, được xác định bằng phân tích Scatchard của Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Sau khi các tế bào lai được xác định là sản xuất ra các kháng thể có tính đặc hiệu, ái lực và/hoặc hoạt tính mong muốn, các dòng này có thể được tách dòng phụ bằng các quy trình pha loãng giới hạn và được nuôi bằng các phương pháp chuẩn (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Môi trường nuôi cấy thích hợp cho mục đích này bao gồm, ví dụ, môi trường D-MEM hoặc RPMI-1640. Ngoài ra, tế bào lai có thể được nuôi *in vivo* dưới dạng khối u cổ trướng ở động vật.

Các kháng thể đơn dòng được tiết ra bởi các dòng phụ được phân tách thích hợp khỏi môi trường nuôi cấy, dịch cổ trướng, hoặc huyết thanh bằng các quy trình tinh chế globulin miễn dịch thông thường như, ví dụ, protein A-Sepharose, sắc ký hydroxylapatite, điện di gel, thẩm tách, hoặc sắc ký ái lực.

Các kháng thể kháng FGFR3 có thể được sản xuất bằng cách sử dụng thư viện tổ hợp để sàng lọc các dòng kháng thể tổng hợp có hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Về nguyên tắc, các dòng kháng thể tổng hợp được chọn bằng cách sàng lọc thư viện thể thực khuẩn chứa thể thực khuẩn mà biểu hiện nhiều mảnh khác nhau của vùng biến đổi

kháng thể (Fv) được dung hợp với protein vỏ thể thực khuẩn. Thư viện thể thực khuẩn này được sàng lọc bằng sắc ký ái lực dựa trên kháng nguyên mong muốn. Các dòng biểu hiện mảnh Fv có khả năng liên kết với kháng nguyên mong muốn được hấp thu vào kháng nguyên này và do đó được tách khỏi các dòng không liên kết trong thư viện. Sau đó các dòng liên kết được rửa giải từ kháng nguyên, và có thể còn được làm giàu thêm bằng các chu trình bổ sung gồm hấp phụ/rửa giải kháng nguyên. Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng FGFR3 theo sáng chế có thể thu được bằng cách thiết kế quy trình sàng lọc kháng nguyên thích hợp để chọn lọc ra dòng thể thực khuẩn cần quan tâm sau đó tạo cấu trúc dòng kháng thể kháng FGFR3 có chiều dài đầy đủ sử dụng các trình tự Fv từ dòng thể thực khuẩn cần quan tâm và trình tự vùng hằng định thích hợp (Fc) được mô tả trong Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

Miền liên kết kháng nguyên của kháng thể được tạo thành từ hai vùng biến đổi (V) gồm khoảng 110 axit amin, một vùng từ chuỗi nhẹ (VL) và một vùng từ chuỗi nặng (VH), mà cả hai vùng đều có mặt ba vòng có siêu biến hoặc vùng quyết định bổ sung (CDR). Các miền biến đổi có thể được biểu hiện về mặt chức năng trên thể thực khuẩn, dưới dạng các mảnh Fv chuỗi đơn (scFv), trong đó VH và VL được liên kết đồng hóa trị qua các peptit ngắn, linh hoạt, hoặc ở dạng các mảnh Fab, trong đó chúng được dung hợp với miền hằng định và tương tác không đồng hóa trị, như được mô tả trong Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Trong bản mô tả này, các dòng thể thực khuẩn mã hóa scFv và các dòng thể thực khuẩn mã hóa Fab được gọi chung bằng tên "dòng thể thực khuẩn Fv" hoặc "dòng Fv".

Các nguồn gen VH và VL có thể được tách dòng riêng bằng phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) và được tái tổ hợp ngẫu nhiên trong thư viện thể thực khuẩn, mà sau đó có thể được tìm kiếm đối với các dòng liên kết kháng nguyên như được mô tả trong Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Các thư viện từ các nguồn được gây miễn dịch tạo ra các kháng thể ái lực cao với chất kháng nguyên mà không cần tạo ra thể lai. Theo cách khác, nguồn tự nhiên có thể được tách dòng để cung cấp một nguồn gồm các kháng thể người cho phạm vi rộng các kháng nguyên tự thân và không tự thân mà không cần gây miễn dịch bất kỳ như được mô tả bởi Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Cuối cùng, thư viện tự nhiên còn có thể được tạo ra theo cách tổng hợp bằng cách tách dòng các đoạn gen V chưa được sắp xếp lại từ tế bào gốc, và sử dụng các

đoạn mỗi PCR chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hóa cho các vùng CDR3 biến đổi cao và để thực hiện sự sắp xếp lại in vitro như được nêu bởi Hoogenboom và Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Thể thực khuẩn dạng sợi được sử dụng để biểu hiện các mảnh kháng thể bằng cách dung hợp với protein vỏ nhỏ pIII. Các mảnh kháng thể có thể được biểu hiện dưới dạng các mảnh Fv chuỗi đơn, trong đó miền VH và VL được nối trên cùng một chuỗi polypeptit bởi đoạn đệm polypeptit linh hoạt, ví dụ, như được mô tả bởi Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), hoặc dưới dạng các mảnh Fab, trong đó một chuỗi được dung hợp với pIII và chuỗi kia được tiết vào chất tế bào của tế bào chủ của vi khuẩn trong đó sự lắp ráp cấu trúc protein vỏ Fab trở nên được biểu hiện trên bề mặt thể thực khuẩn bằng cách thay thế một số trong số các protein vỏ kiểu đại, ví dụ, như được mô tả trong Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

Nhìn chung, axit nucleic mã hóa cho các đoạn gen kháng thể thu được từ tế bào miễn dịch được thu hoạch từ người hoặc động vật. Nếu thư viện thiên về phía các dòng kháng FGFR3 là mong muốn, cá thể được gây miễn dịch với FGFR3 để tạo ra đáp ứng kháng thể, và tế bào lách và/hoặc tế bào B tuần hoàn, các lympho bào máu ngoại vi (PBL) khác được phục hồi cho cấu trúc thư viện. Theo phương án được ưu tiên, thư viện mảnh gen kháng thể của người thiên về phía các dòng kháng FGFR3 thu được bằng cách tạo ra đáp ứng kháng thể kháng FGFR3 ở chuột chuyển gen mang mảnh gen globulin miễn dịch chức năng của người (và thiếu hệ thống sản xuất kháng thể nội sinh chức năng) sao cho phương pháp gây miễn dịch FGFR3 làm cho các tế bào B sản sinh các kháng thể người kháng FGFR3. Việc tạo ra chuột chuyển gen sản xuất kháng thể của người được mô tả dưới đây.

Phương pháp làm giàu thêm đối với quần thể tế bào có tính phản ứng kháng FGFR3 có thể thu được bằng cách sử dụng quy trình sàng lọc thích hợp để phân lập tế bào B biểu hiện kháng thể liên kết màng đặc hiệu FGFR3, ví dụ, bằng cách phân tách tế bào bằng sắc ký ái lực FGFR3 hoặc sự hấp thụ tế bào vào FGFR3 được đánh dấu bằng florocrom sau đó là phân loại tế bào bằng hoạt hóa dòng (FACS).

Theo cách khác, việc sử dụng tế bào lách và/hoặc tế bào B hoặc các PBL khác từ động vật cho chưa được gây miễn dịch tạo ra đại diện tốt hơn của nguồn kháng thể khả thi, và còn cho phép tạo cấu trúc thư viện kháng thể bằng cách sử dụng loài động vật bất kỳ (người hoặc không phải người) trong đó FGFR3 không có tính kháng nguyên. Đối với

các thư viện kết hợp với cấu trúc gen kháng thể *in vitro*, tế bào gốc được thu hoạch từ cá thể để tạo ra axit nucleic mã hóa cho các đoạn gen kháng thể chưa được sắp xếp lại. Tế bào miễn dịch cần quan tâm có thể thu được từ nhiều loài động vật, như người, chuột, chuột cống, thỏ, chim, chó, mèo, lợn, bò, ngựa, và loài chim, v.v.

Axit nucleic mã hóa cho các đoạn gen biến đổi của kháng thể (gồm các đoạn VH và VL) được phục hồi từ các tế bào cần quan tâm và được khuếch đại. Trong trường hợp thư viện gen VH và VL được sắp xếp lại, ADN mong muốn có thể thu được bằng cách phân lập ADN hệ gen hoặc mRNA từ các tế bào lympho sau đó là phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) với các đoạn môi bắt cặp các đầu cùng 5' và 3' của gen VH và VL được sắp xếp lại như được mô tả trong Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), do đó tạo ra các nguồn gen V đa dạng để biểu hiện. Gen V có thể được khuếch đại từ cADN và ADN hệ gen, với các đoạn môi ngược ở đầu 5' của exon mã hóa cho miền V trưởng thành và các đoạn môi xuôi nằm trong đoạn J như được mô tả trong Orlandi *et al.* (1989) và trong Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). Tuy nhiên, để khuếch đại từ cADN, các đoạn môi ngược còn có thể được đặt trong exon khởi đầu như được mô tả trong Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), và các đoạn môi xuôi trong vùng hằng định như được nêu trong Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Để tối đa hóa tính bổ sung, sự thoái biến có thể được đưa vào trong các đoạn môi như được nêu trong Orlandi *et al.* (1989) hoặc Sastry *et al.* (1989). Tốt hơn nếu, tính đa dạng thư viện được tối đa hóa bằng cách sử dụng các đoạn môi PCR hướng đến mỗi họ gen V để khuếch đại tất cả các sắp xếp VH và VL sẵn có có mặt trong mẫu axit nucleic tế bào miễn dịch, ví dụ như được nêu trong phương pháp Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) hoặc như được nêu trong phương pháp Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Để tách dòng ADN đã được khuếch đại vào vector biểu hiện, các vị trí giới hạn hiếm có thể được đưa vào trong đoạn môi PCR dưới dạng nhãn ở một đầu như được nêu trong Orlandi *et al.* (1989), hoặc bằng cách khuếch đại PCR thêm với đoạn môi đã gắn nhãn như được nêu trong Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Các nguồn gen V được sắp xếp lại tổng hợp có thể thu được *in vitro* từ các đoạn gen V. Phần lớn các đoạn gen VH người đã được tách dòng và được giải trình tự (được báo cáo trong Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), và lập bản đồ (được báo cáo trong Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)); các đoạn đã được tách

dòng này (gồm tất cả các cấu hình chính của vòng H1 và H2) có thể được sử dụng để tạo ra các nguồn gen VH đa dạng với các đoạn mồi PCR mã hóa cho vòng H3 có trình tự và chiều dài khác nhau như được nêu trong Hoogenboom và Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Các nguồn VH còn có thể được tạo ra với tất cả tính đa dạng trình tự được tập trung trong vòng H3 dài của chiều dài đơn như được nêu trong Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Các đoạn V κ và V λ của người đã được tách dòng và được giải trình tự (được báo cáo trong Williams và Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) và có thể được sử dụng để tạo ra các nguồn chuỗi nhẹ tổng hợp. Các nguồn gen V tổng hợp, dựa trên phạm vi các nếp gấp VH và VL, và các chiều dài L3 và H3, sẽ mã hóa cho các kháng thể có tính đa dạng cấu trúc đáng kể. Sau khi khuếch đại ADN mã hóa gen V, các đoạn gen V mầm có thể được sắp xếp lại *in vitro* theo phương pháp của Hoogenboom và Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Các nguồn mảnh kháng thể có thể được cấu trúc bằng cách kết hợp các nguồn gen VH và VL cùng nhau theo một vài cách. Mỗi nguồn có thể được tạo ra trong các vector khác nhau, và các vector được tái tổ hợp *in vitro*, ví dụ, như được nêu trong Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128:119-126 (1993), hoặc *in vivo* bằng cách gây nhiễm tổ hợp, ví dụ, hệ thống loxP được nêu trong Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993). Phương pháp tái tổ hợp *in vivo* khai thác bản chất hai chuỗi của các mảnh Fab để khắc phục hạn chế về kích thước thư viện được áp đặt bởi tính hiệu quả biến nạp *E. coli*. Các nguồn VH và VL tự nhiên được tách dòng riêng rẽ, một vào phagemid và một vào vector thể thực khuẩn. Hai thư viện này sau đó được tổ hợp bằng cách gây nhiễm thể thực khuẩn vi khuẩn chứa phagemid sao cho mỗi tế bào chứa tổ hợp khác nhau và kích thước thư viện chỉ bị giới hạn bởi số lượng tế bào có mặt (khoảng 10^{12} dòng). Cả hai vector chứa tín hiệu tái tổ hợp *in vivo* sao cho các gen VH và VL được tái tổ hợp lên một đơn vị sao chép và được đồng bao gói vào virion thể thực khuẩn. Các thư viện khổng lồ này tạo ra số lượng lớn các kháng thể khác nhau có ái lực tốt (K_d^{-1} vào khoảng 10^8 M).

Theo cách khác, các nguồn có thể được tách dòng lần lượt vào cùng vector, ví dụ, như được nêu trong Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991), hoặc được lắp ráp với nhau bằng PCR và sau đó tách dòng, ví dụ như được nêu trong Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Kỹ thuật ghép bằng PCR còn có thể được sử dụng để nối ADN VH và VL với ADN mã hóa cho đoạn đệm peptit linh hoạt để tạo thành các nguồn Fv chuỗi đơn (scFv). Vẫn trong kỹ thuật khác, “ghép PCR trong tế bào”

được sử dụng kết hợp các gen VH và VL trong các tế bào lympho bằng PCR và sau đó tách dòng các nguồn chứa các gen được liên kết như được nêu trong Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20:3831-3837 (1992).

Các kháng thể tạo ra bởi các thư viện ban đầu (tự nhiên hoặc tổng hợp) có thể có ái lực vừa phải (K_d^{-1} vào khoảng từ 10^6 đến 10^7 M^{-1}), nhưng sự hoàn thiện ái lực cũng có thể được bắt chước *in vitro* bằng cách tạo cấu trúc và lựa chọn lại từ thư viện bậc hai như được nêu trong Winter *et al.* (1994), *supra*. Ví dụ, các đột biến có thể được đưa vào ngẫu nhiên *in vitro* bằng cách sử dụng polymeaza có xu hướng gây lỗi (được báo cáo trong Leung *et al.*, *Kỹ thuật*, 1:11-15 (1989)) trong phương pháp của Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) hoặc trong phương pháp của Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992). Ngoài ra, sự hoàn thiện ái lực có thể được tiến hành bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên một hoặc nhiều CDR, ví dụ sử dụng PCR với các đoạn môi mang trình tự ngẫu nhiên kéo dài CDR cần quan tâm, trong dòng Fv cá thể được chọn và sàng lọc các dòng có ái lực cao hơn. WO 96/07754 (được công bố ngày 14/3/1996) mô tả phương pháp gây đột biến trong vùng quyết định bổ sung của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch để tạo ra thư viện gồm các gen chuỗi nhẹ. Phương pháp hiệu quả khác để tái tổ hợp các miền VH hoặc VL được chọn bằng sự biểu hiện thể thực khuẩn với các nguồn biến thể miền V có trong tự nhiên thu được từ thể cho chưa được gây miễn dịch và sàng lọc ái lực cao hơn trong vài vòng trộn rồi lại chuỗi như được nêu trong Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992). Kỹ thuật này cho phép sản xuất các kháng thể và các mảnh kháng thể có ái lực nằm trong khoảng 10^{-9} M.

Axit nucleic FGFR3 và trình tự axit amin là đã biết trong lĩnh vực. Trình tự axit nucleic mã hóa cho FGFR3 có thể được thiết kế bằng cách sử dụng trình tự axit amin của vùng FGFR3 mong muốn. Như được biết trong lĩnh vực, có hai đồng dạng ghép nối chính của FGFR3 là FGFR3 IIIb và FGFR3 IIIc. Trình tự FGFR3 là đã biết trong lĩnh vực và có thể gồm trình tự có số truy cập UniProKB/Swiss-Prot là P22607 (FGFR3 IIIc) hoặc P22607_2 (FGFR3 IIIb). Các đột biến FGFR3 đã được xác định và là đã biết trong lĩnh vực và gồm các đột biến sau (tham khảo trình tự được thể hiện ở số truy cập UniProKB/Swiss-Prot P22607 (FGFR3 IIIc) hoặc P22607_2 (FGFR3 IIIb):

FGFR3-IIIb	FGFR3 IIIc
R248C	R248C
S249C	S249C

G372C	G370C
Y375C	Y373C
G382R	G380R
K652E	K650E

Axit nucleic mã hóa cho FGFR3 có thể tạo ra bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp tổng hợp hóa học bằng phương pháp bất kỳ được nêu trong Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989), như phương pháp trieste, phosphit, phosphoramidite và H-phosphonat. Theo một phương án, các codon được ưu tiên bởi tế bào chủ biểu hiện được sử dụng trong thiết kế ADN mã hóa FGFR3. Theo cách khác, ADN mã hóa cho FGFR3 có thể được phân lập từ thư viện hệ gen hoặc thư viện cADN.

Sau khi tạo cấu trúc phân tử ADN mã hóa cho FGFR3, phân tử ADN được liên kết chức năng với trình tự kiểm soát biểu hiện trong vector biểu hiện, như plasmid, trong đó trình tự kiểm soát được nhận diện bởi tế bào chủ đã được biến nạp với vector. Nhìn chung, vector plasmid chứa bản sao và trình tự kiểm soát thu được từ loài tương thích với tế bào chủ. Vector thường mang vị trí sao chép, cũng như trình tự mã hóa cho protein có khả năng tạo ra sự chọn lọc kiểu hình trong các tế bào đã biến nạp. Vector thích hợp để biểu hiện trong tế bào chủ tiền nhân và nhân chuẩn là đã biết trong lĩnh vực và một số vector này cũng được nêu thêm trong bản mô tả này. Sinh vật nhân chuẩn, như nấm men, hoặc tế bào thu được từ sinh vật đa bào, như động vật có vú, có thể được sử dụng.

Tùy chọn, ADN mã hóa cho FGFR3 được liên kết chức năng với trình tự dẫn đầu kích thích tiết gây ra sự tiết các sản phẩm biểu hiện bởi tế bào chủ vào môi trường nuôi cấy. Ví dụ về trình tự dẫn đầu kích thích tiết gồm stII, ecotin, lamB, herpes GD, lpp, phosphataza kiềm, invertaza, và yếu tố alpha. Cũng thích hợp để sử dụng trong bản mô tả là trình tự dẫn đầu 36 axit amin của protein A (Abrahmsen *et al.*, *EMBO J.*, 4: 3901 (1985)).

Tế bào chủ được chuyển nhiễm và tốt hơn là được biến nạp với vector biểu hiện hoặc vector tách dòng trên đây theo sáng chế và được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng truyền thống được biến đổi thích hợp để cảm ứng trình tự khởi động, lựa chọn thể biến nạp, hoặc khuếch đại gen mã hóa cho trình tự mong muốn.

Phương pháp gây nhiễm chỉ sự hấp thu vector biểu hiện bởi tế bào chủ dù trình tự mã hóa bất kỳ có được biểu hiện trên thực tế hay không. Nhiều phương pháp chuyển nhiễm là đã biết với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực, ví dụ, kết tủa CaPO_4 và điện di. Phương pháp chuyển nhiễm thành công thường được nhận ra khi dấu hiệu bất kỳ về sự hoạt động của vector này xuất hiện trong tế bào chủ. Phương pháp chuyển nhiễm là đã biết trong lĩnh vực, và một số phương pháp này còn được mô tả thêm trong bản mô tả này.

Phương pháp biến nạp chỉ việc đưa ADN vào sinh vật sao cho ADN có thể được sao chép, dưới dạng yếu tố ngoài nhiễm sắc thể hoặc bằng sự tích hợp vào nhiễm sắc thể. Tùy thuộc vào tế bào chủ được sử dụng, phương pháp biến nạp được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn thích hợp với các tế bào này. Phương pháp biến nạp là đã biết trong lĩnh vực, và một số được mô tả thêm ở đây.

Tế bào chủ tiền nhân được sử dụng để sản sinh FGFR3 có thể được nuôi cấy như được mô tả tổng quát trong Sambrook *et al.*, *supra*.

Tế bào chủ động vật có vú được sử dụng để sản sinh FGFR3 có thể được nuôi cấy trong nhiều môi trường khác nhau, mà là đã biết trong lĩnh vực và một số môi trường trong số này được nêu trong bản mô tả.

Tế bào chủ được đề cập đến trong bản mô tả bao gồm các tế bào trong môi trường nuôi cấy *in vitro* cũng như tế bào nằm trong động vật chủ.

Kỹ thuật tinh chế FGFR3 có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực, một số phương pháp này được nêu trong bản mô tả.

FGFR3 đã tinh chế có thể được gắn vào chất nền thích hợp như hạt agarosa, hạt acrylamit, hạt thủy tinh, xenluloza, các copolyme acrylic, gel hydrohydroxyl metacrylat, copolyme polyacrylic và polymetacrylic, nylon, chất mang trung tính và chất mang ion, và chất tương tự, để sử dụng trong kỹ thuật phân tách sắc ký ái lực của dòng biểu hiện thể thực khuẩn. Sự gắn protein FGFR3 với chất nền có thể được thực hiện bằng phương pháp nêu trong *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Kỹ thuật được dùng phổ biến để gắn các phối tử protein với chất nền polysacarit, ví dụ agarosa, dextran hoặc xenluloza, bao gồm hoạt hóa chất mang có cyanogen halogen và sau đó tạo cặp các amin béo hoặc thion bậc một của phối tử peptit với chất nền đã được hoạt hóa.

Theo cách khác, FGFR3 có thể được sử dụng để phủ giếng của các đĩa hấp thụ, được biểu hiện trên tế bào chủ đã được cố định với đĩa hấp thụ hoặc được sử dụng để

phân loại tế bào, hoặc được liên hợp với biotin để bắt giữ bằng hạt được phủ streptavidin, hoặc được sử dụng trong phương pháp bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực đề sàng lọc thư viện biểu hiện thể thực khuẩn.

Các mẫu thư viện thể thực khuẩn được cho tiếp xúc với FGFR3 cố định trong điều kiện thích hợp để liên kết ít nhất một phần của các hạt thể thực khuẩn với chất hấp thụ này. Thông thường, các điều kiện, gồm pH, cường độ ion, nhiệt độ và các điều kiện tương tự được chọn để làm giả các điều kiện sinh lý. Các thể thực khuẩn liên kết với pha rắn được rửa và sau đó được rửa giải bằng axit, ví dụ như được nêu trong Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), hoặc bằng kiềm, ví dụ như được nêu trong Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), hoặc bằng phương pháp cạnh tranh kháng nguyên FGFR3, ví dụ trong quy trình tương tự với phương pháp cạnh tranh kháng nguyên của Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Thể thực khuẩn có thể được làm giàu từ 20 đến 1000 lần trong một vòng chọn lọc. Hơn nữa, thể thực khuẩn đã được làm giàu có thể được nuôi trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn và được đưa vào các vòng chọn lọc tiếp theo.

Hiệu quả chọn lọc phụ thuộc vào nhiều yếu tố, gồm động học phân ly trong quá trình rửa, và việc nhiều mảnh kháng thể trên một thể thực khuẩn có thể gắn đồng thời với kháng nguyên hay không. Các kháng thể có động học phân ly nhanh (và ái lực liên kết yếu) có thể được giữ lại bằng cách sử dụng các lần rửa ngắn, biểu hiện thể thực khuẩn đa giá và mật độ phủ kháng nguyên cao trong pha rắn. Mật độ cao không chỉ làm ổn định thể thực khuẩn qua các tương tác đa hóa trị, mà còn ưu tiên sự liên kết lại thể thực khuẩn đã bị phân ly. Sự chọn lọc các kháng thể có động học phân ly chậm (và ái lực liên kết tốt) có thể được thúc đẩy bằng cách sử dụng các lần rửa dài và sự biểu hiện thể thực khuẩn hóa trị một như được nêu trong Bass *et al.*, *Protein*, 8: 309-314 (1990) và trong WO 92/09690, và mật độ phủ kháng nguyên thấp như được nêu trong Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Có thể chọn lọc giữa các kháng thể thể thực khuẩn có các ái lực khác nhau, thậm chí có các ái lực hơi khác nhau, đối với FGFR3. Tuy nhiên, việc gây đột biến ngẫu nhiên kháng thể đã chọn (ví dụ như được thực hiện trong một số kỹ thuật hoàn thiện ái lực được nêu ở trên) có thể tạo thành nhiều thể đột biến, hầu hết là liên kết với kháng nguyên, và một vài kháng thể có ái lực cao hơn. Với FGFR3 giới hạn, thể thực khuẩn ái lực rất cao có thể bị cạnh tranh. Để giữ lại tất cả các thể đột biến ái lực cao, các thể thực

khuẩn có thể được ủ với lượng dư của FGFR3 được biotin hóa, nhưng với FGFR3 được biotin hóa ở nồng độ mol thấp hơn ái lực mol đích không đổi với FGFR3. Sau đó thể thực khuẩn liên kết ái lực cao sau đó có thể được bắt giữ bằng các hạt thuận từ được phủ streptavidin. Sự “bắt giữ cân bằng” này cho phép các kháng thể được lựa chọn theo ái lực liên kết của chúng, với độ nhạy mà cho phép phân tách riêng dòng đột biến có ái lực cao hơn hai lần từ lượng dư lớn thể thực khuẩn có ái lực thấp. Các điều kiện được sử dụng để rửa thể thực khuẩn đã liên kết với pha rắn còn có thể được thao tác để phân biệt dựa trên động học phân ly.

Dòng FGFR3 có thể được chọn lọc hoạt tính. Theo một phương án, sáng chế đề xuất các kháng thể FGFR3 mà phong bế liên kết giữa thụ thể FGFR3 và phối tử của nó (như FGF1 và/hoặc FGF9). Dòng Fv tương ứng với các kháng thể FGFR3 này có thể được chọn bằng cách (1) phân lập dòng FGFR3 từ thư viện thể thực khuẩn như được nêu ở trên, và tùy ý khuếch đại quần thể dòng thể thực khuẩn đã phân lập bằng cách phát triển quần thể trong vật chủ vi khuẩn thích hợp; (2) chọn lọc FGFR3 và protein thứ hai mà hoạt tính phong bế và không phong bế nó, tương ứng, là mong đợi; (3) hấp thụ dòng thể thực khuẩn kháng FGFR3 vào FGFR3 cố định; (4) sử dụng lượng thừa của protein thứ hai để rửa giải dòng không mong muốn bất kỳ nhận biết quyết định liên kết FGFR3 mà trùng hoặc có chung các quyết định liên kết của protein thứ hai; và (5) rửa giải dòng mà vẫn bị hấp thụ sau bước (4). Tùy ý, dòng có tính chất phong bế/không phong bế mong muốn có thể còn được làm giàu bằng cách lặp lại các quy trình chọn lọc được nêu ở đây một hoặc nhiều lần.

ADN mã hóa các kháng thể đơn dòng thu được từ thể lai hoặc các dòng Fv biểu hiện thể thực khuẩn theo sáng chế dễ dàng được phân lập và được giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng các đoạn môi oligonucleotit được thiết kế để khuếch đại đặc hiệu vùng mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cần quan tâm từ khuôn ADN thể thực khuẩn hoặc thể lai). Khi được phân lập, ADN có thể được đặt vào vectơ biểu hiện, mà sau đó được chuyển nhiễm vào tế bào chủ như tế bào *E. coli*, tế bào simian COS, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), hoặc tế bào u tủy mà không sản xuất protein globulin miễn dịch, để đạt được sự tổng hợp các kháng thể đơn dòng mong muốn trong tế bào chủ tái tổ hợp. Các tài liệu về sự biểu hiện tái tổ hợp trong vi khuẩn của ADN mã hóa kháng thể bao gồm Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) và Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130:151 (1992).

ADN mã hóa cho dòng Fv theo sáng chế có thể được kết hợp với đã biết trình tự ADN đã biết mã hóa cho vùng hằng định chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ (ví dụ, trình tự ADN thích hợp có thể thu từ Kabat *et al.*, supra) để tạo thành dòng mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ hoặc một phần của chiều dài. Sẽ được hiểu rằng vùng hằng định thuộc isotyp bất kỳ có thể được sử dụng cho mục đích này, bao gồm vùng hằng định IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE, và vùng hằng định này có thể thu được từ loài người hoặc loài động vật bất kỳ. Dòng Fv thu được từ ADN miền biến đổi của một loài động vật (như người) và sau đó được dung hợp với ADN vùng hằng định của loài động vật khác để tạo thành (các) trình tự mã hóa để “lai”, chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ được bao gồm trong định nghĩa về kháng thể “thể khảm” và “lai” như được sử dụng ở đây. Theo phương án ưu tiên, dòng Fv thu được từ ADN biến đổi của người được dung hợp với ADN vùng hằng định của người để tạo thành trình tự mã hóa tất cả ca chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của người, có độ dài đầy đủ hoặc một phần chiều dài.

ADN mã hóa cho kháng thể kháng FGFR3 thu được từ thể lai theo sáng chế còn có thể được biến đổi, ví dụ, bằng cách thay thế trình tự mã hóa cho miền hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người ở vị trí của trình tự đồng nhất của chuột thu được từ dòng lai (ví dụ, như trong phương pháp Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). ADN mã hóa cho thể lai hoặc kháng thể hoặc mảnh thu được từ dòng Fv có thể được biến đổi thêm bằng sự nối cộng hóa trị tất cả hoặc một phần của trình tự mã hóa polypeptit không phải globulin miễn dịch với trình tự mã hóa globulin miễn dịch. Theo cách này, kháng thể “thể khảm” và “lai” được tạo ra có tính đặc hiệu liên kết của dòng Fv hoặc các kháng thể thu được từ dòng thể lai theo sáng chế.

Các mảnh kháng thể

Sáng chế bao gồm các mảnh kháng thể. Trong một số trường hợp, có các ưu điểm khi sử dụng các mảnh kháng thể, hơn là toàn bộ kháng thể. Kích thước nhỏ hơn của các mảnh cho phép thanh thải nhanh, và có thể sự tiếp cận các khối u rắn được cải thiện.

Nhiều kỹ thuật đã được phát triển để sản xuất các mảnh kháng thể. Thông thường, các mảnh này thu được bằng cách cắt phân giải protein các kháng thể nguyên vẹn (xem, ví dụ, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical và Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); và Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Tuy nhiên, các mảnh này hiện nay có thể được tạo ra trực tiếp bằng tế bào chủ tái tổ hợp. Các mảnh kháng thể Fab, Fv và ScFv đều có thể được biểu hiện trong và được tiết ra từ *E. coli*, do đó cho phép dễ dàng sản

xuất lượng lớn các mảnh này. Các mảnh kháng thể có thể được phân lập từ thư viện kháng thể thể thực khuẩn như được nêu ở trên. Theo cách khác, các mảnh Fab'-SH có thể được thu lại trực tiếp từ *E. coli* và được bắt cặp hóa học để tạo thành các mảnh F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Theo phương pháp khác, các mảnh F(ab')₂ có thể được phân lập trực tiếp từ môi trường nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp. Mảnh Fab và F(ab')₂ có thời gian bán thải in vivo tăng lên chứa các gốc epitop liên kết thụ thể cứu được mô tả trong Patent Mỹ số 5,869,046. Các kỹ thuật khác để sản xuất các mảnh kháng thể là rõ ràng với người thực hành. Theo các phương án khác, kháng thể được chọn là mảnh Fv chuỗi đơn (scFv) (xem, ví dụ, WO 93/16185; Patent Mỹ số 5,571,894 và 5,587,458). Fv và sFv là dạng duy nhất có vị trí tổ hợp nguyên vẹn mà không có vùng hằng định; do đó, chúng thích hợp cho sự liên kết không đặc hiệu giảm khi sử dụng in vivo. Protein dung hợp sFv có thể được tạo cấu trúc để tạo ra sự dung hợp của protein hiệu ứng ở đầu cùng amino hoặc carboxy của sFv. Xem *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, supra. Mảnh kháng thể còn có thể là “kháng thể thẳng” ví dụ, như được nêu, ví dụ, trong Patent Mỹ số 5,641,870. Các mảnh kháng thể thẳng này có thể là đặc hiệu đơn hoặc đặc hiệu kép.

Các kháng thể được làm tương thích với người

Sáng chế bao gồm các kháng thể được làm tương thích với người. Nhiều phương pháp để làm tương thích với người các kháng thể không phải của người là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, kháng thể được làm tương thích với người có thể có một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào từ nguồn không phải của người. Các gốc axit amin không phải của người này thường được gọi là các gốc “nhập”, mà thường được lấy từ miền biến đổi “nhập”. Việc làm tương thích với người có thể được thực hiện về cơ bản theo phương pháp của Winter và cộng sự (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534-1536), bằng cách thay thế trình tự vùng siêu biến cho trình tự tương ứng của kháng thể của người. Theo đó, các kháng thể “được làm tương thích với người” là kháng thể khảm (Patent Mỹ số 4,816,567) trong đó về gần như ít hơn toàn bộ miền biến đổi của người đã được thế bởi trình tự tương ứng từ loài không phải người. Trong thực tế, các kháng thể được làm tương thích với người thường là các kháng thể của người trong đó một số gốc vùng siêu biến và có thể là một số gốc FR được thế bởi các gốc từ vị trí tương đồng trong các kháng thể của loài gặm nhấm.

Việc lựa chọn miền biến đổi của người, cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, cần được sử dụng để tạo ra các kháng thể được làm tương thích với người là rất quan trọng để làm giảm tính kháng nguyên. Theo phương pháp được cho là “thích hợp nhất”, trình tự của miền biến đổi của kháng thể loài gặm nhấm được sàng lọc dựa trên toàn bộ thư viện của trình tự miền biến đổi người đã biết. Trình tự người mà là gần nhất với trình tự của loài gặm nhấm sau đó được chấp nhận là khung của người cho kháng thể được làm tương thích với người (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Phương pháp khác sử dụng khung cụ thể thu được từ trình tự liên ứng của tất cả các kháng thể của người thuộc phân nhóm cụ thể của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng. Cùng một khung có thể được sử dụng cho một vài kháng thể được làm tương thích với người khác nhau (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

Quan trọng hơn là các kháng thể được làm tương thích với người có sự duy trì ái lực cao với kháng nguyên và các tính chất sinh học thuận lợi khác. Để đạt được mục đích này, theo một phương pháp, các kháng thể được làm tương thích với người được tạo ra bởi quá trình phân tích trình tự bố mẹ và các sản phẩm được làm tương thích với người khác nhau sử dụng mô hình ba chiều của trình tự bố mẹ và trình tự được làm tương thích với người. Mô hình globulin miễn dịch ba chiều có trên thị trường và là quen thuộc đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực. Các chương trình máy tính có sẵn mà minh họa và biểu diễn các cấu trúc hình dáng ba chiều có thể xảy ra của trình tự globulin miễn dịch ứng viên được chọn. Việc kiểm tra các biểu hiện này cho phép phân tích vai trò có thể xảy ra của các gốc trong hoạt động 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 trong việc liên kết với kháng nguyên của nó. Theo cách này, các gốc FR có thể được chọn và được kết hợp từ thể nhận và nhập vào các trình tự sao cho thu được các tính chất của kháng thể mong muốn, như ái lực với kháng nguyên đích tăng lên. Nhìn chung, các gốc vùng siêu biến có ảnh hưởng trực tiếp và cơ bản nhất đến liên kết kháng nguyên.

Các kháng thể của người

Các kháng thể kháng FGFR3 của người theo sáng chế có thể được cấu trúc bằng cách kết hợp (các) trình tự miền biến đổi dòng Fv được chọn từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn thu được từ người với (các) trình tự miền hằng định của người đã biết như được nêu ở trên. Theo cách khác, các kháng thể đơn dòng kháng FGFR3 của người theo

sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp lai. Dòng tế bào u tuỷ của người và u tuỷ khác loại chuột-người để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người được nêu, ví dụ, bởi Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Kỹ thuật and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147:86 (1991).

Hiện nay, có thể tạo ra động vật chuyển gen (ví dụ, chuột) có khả năng, nhờ vào việc gây miễn dịch, sản xuất nguồn kháng thể người đầy đủ khi vắng mặt sự sản xuất globulin miễn dịch nội sinh. Ví dụ, được mô tả là đột biến mất đoạn đồng hợp tử của gen vùng nối chuỗi nặng (JH) của kháng thể ở chuột đột biến thể khảm và dòng mầm dẫn đến ức chế hoàn toàn sự sản sinh kháng thể nội sinh. Việc chuyển dãy gen globulin miễn dịch dòng mầm này của người vào chuột đột biến dòng mầm sẽ dẫn đến việc sản xuất các kháng thể người khi gây nhiễm bằng kháng nguyên. Xem, ví dụ, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993).

Việc trộn rồi gen còn có thể được sử dụng để thu được các kháng thể người từ các kháng thể không phải người, ví dụ, loài gặm nhấm, trong đó kháng thể của người có ái lực và tính đặc hiệu tương tự với kháng thể không phải của người ban đầu. Theo phương pháp này, mà còn được gọi là phương pháp “đóng dấu epitop”, vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của mảnh kháng thể không phải của người thu được bằng kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn như được nêu ở trên được thay bằng nguồn gen miễn V của người, tạo ra quần thể các thể khảm Fab hoặc scFv chuỗi không phải của người/chuỗi của người. Việc lựa chọn kháng nguyên gây ra sự phân lập Fab hoặc scFv thể khảm chuỗi không phải của người/chuỗi của người trong đó chuỗi của người khôi phục vị trí liên kết kháng nguyên bị phá hủy khi sự loại bỏ chuỗi không phải của người tương ứng trong dòng biểu hiện thể thực khuẩn bậc một, tức là epitop chi phối (đóng dấu) việc lựa chọn của đối tác chuỗi người. Khi quy trình được lặp lại để thay thế chuỗi không phải của người còn lại, kháng thể người thu được (xem PCT WO 93/06213 công bố ngày 1/4/1993). Không giống như phương pháp làm tương thích với người thông thường các kháng thể không phải của người bằng cách ghép CDR, kỹ thuật này tạo ra đầy đủ các kháng thể của người, mà không có các gốc FR hoặc CDR có nguồn gốc không phải của người.

Các kháng thể đặc hiệu kép

Các kháng thể đặc hiệu kép là các kháng thể đơn dòng, tốt hơn nếu là của người hoặc được làm tương thích với người, mà có tính đặc hiệu liên kết với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau. Trong trường hợp này, một trong số các tính đặc hiệu liên kết là với FGFR3 và tính đặc hiệu kia là với kháng nguyên bất kỳ. Các kháng thể đặc hiệu kép điển hình có thể liên kết với hai epitop khác nhau của FGFR3. Các kháng thể đặc hiệu kép còn có thể được sử dụng để khu trú các chất gây độc tế bào đến tế bào biểu hiện FGFR3. Các kháng thể này có nhánh liên kết FGFR3 và nhánh liên kết chất gây độc tế bào (ví dụ, saporin, chất kháng interferon- α , vinca alkaloid, chuỗi A ricin, methotrexat hoặc hapten đồng vị có hoạt tính phóng xạ). Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra dưới dạng các kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc các mảnh kháng thể (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép F(ab')₂).

Phương pháp để sản xuất các kháng thể đặc hiệu kép là đã biết trong lĩnh vực. Thông thường, việc sản xuất tái tổ hợp các kháng thể đặc hiệu kép dựa vào sự đồng biểu hiện hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, trong đó hai chuỗi nặng có các tính đặc hiệu khác nhau (Milstein và Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Vì sự phân loại ngẫu nhiên của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, các thể lai này (quadroma) tạo ra hỗn hợp tiềm năng của mười phân tử kháng thể khác nhau, trong đó chỉ một có một phân tử kháng thể có cấu trúc đặc hiệu kép chính xác. Kỹ thuật tinh chế phân tử chính xác, mà thường được thực hiện bằng các bước sắc ký ái lực, là khá công kềnh, và hiệu suất là thấp. Các quy trình tương tự được nêu trong WO 93/08829 được công bố ngày 13/5/1993, và trong Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

Theo các phương pháp khác và được ưu tiên hơn, miền biến đổi kháng thể có tính đặc hiệu liên kết mong muốn (vị trí kết hợp kháng thể kháng nguyên) được dung hợp với trình tự miền hằng định globulin miễn dịch. Tốt hơn là sự dung hợp là với miền hằng định chuỗi nặng globulin miễn dịch, chứa ít nhất một phần của bản lề, vùng CH2, và CH3. Tốt hơn là có vùng hằng định chuỗi nặng thứ nhất (CH1), chứa vị trí cần thiết để liên kết chuỗi nhẹ, có mặt trong ít nhất một trong số các thể dung hợp. Các ADN mã hóa cho các thể dung hợp chuỗi nặng globulin miễn dịch và, nếu cần, chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, được gắn xen vào các vector biểu hiện riêng rẽ, và được đồng chuyển nhiễm vào sinh vật chủ thích hợp. Điều này tạo ra tính linh động cao trong việc điều chỉnh tỷ lệ tương hỗ của ba mảnh polypeptit trong các phương án khi các tỷ lệ không bằng nhau của ba chuỗi polypeptit được sử dụng trong việc tạo cấu trúc tạo ra hiệu suất tối ưu. Tuy

nhiên, có thể gắn xen trình tự mã hóa đối với hai hoặc cả ba chuỗi polypeptit vào một vectơ biểu hiện khi sự biểu hiện của ít nhất hai chuỗi polypeptit theo tỷ lệ bằng nhau tạo ra hiệu suất cao hoặc khi các tỷ số này không có ý nghĩa cụ thể.

Theo phương án ưu tiên của phương pháp này, các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng globulin miễn dịch lai với tính đặc hiệu liên kết thứ nhất ở một nhánh, và cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch lai (tạo ra tính đặc hiệu liên kết thứ hai) ở nhánh còn lại. Phát hiện ra là cấu trúc không đối xứng tạo thuận lợi cho việc phân tách các hợp chất đặc hiệu kép mong muốn từ hỗn hợp chuỗi globulin miễn dịch không mong muốn, vì sự có mặt của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch chỉ trong một nửa của phân tử đặc hiệu kép tạo ra cách phân tách thuận lợi. Phương pháp này được bộc lộ trong WO 94/04690. Chi tiết hơn về việc tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép xem, ví dụ, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Theo phương pháp khác, bề mặt chung giữa cặp các phân tử kháng thể có thể được xử lý để tối đa hóa tỷ lệ phần trăm đime khác loại mà được khôi phục từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp. Bề mặt chung được ưu tiên chứa ít nhất một phần của miền CH3 của miền hằng định kháng thể. Theo phương pháp này, một hoặc nhiều chuỗi bên axit amin nhỏ từ bề mặt chung của phân tử kháng thể thứ nhất được thay bằng chuỗi bên lớn hơn (ví dụ, tyrosin hoặc tryptophan). “Khoang” bù có kích thước giống hoặc tương tự với (các) mạch bên lớn được tạo ra trên bề mặt chung của phân tử kháng thể thứ hai bằng cách thay thế mạch bên axit amin lớn bằng mạch bên axit amin nhỏ hơn (ví dụ, alanin hoặc threonin). Điều này tạo ra cơ chế làm tăng hiệu suất đime khác loại so với sản phẩm cuối không mong muốn như đime cùng loại.

Các kháng thể đặc hiệu kép gồm các kháng thể liên kết chéo hoặc “liên hợp khác loại”. Ví dụ, một trong số các kháng thể trong thể liên hợp khác loại có thể được gắn vào avidin, kháng thể còn lại với biotin. Các kháng thể này, ví dụ, được đề xuất gắn đích tế bào hệ miễn dịch đến các tế bào không mong muốn (Patent Mỹ số 4,676,980), và để điều trị nhiễm HIV (WO 91/00360, WO 92/00373, và EP 03089). Các kháng thể liên hợp khác loại có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp liên kết chéo thuận lợi bất kỳ. Chất liên kết chéo thích hợp là đã biết trong lĩnh vực, và được nêu trong Patent Mỹ số 4,676,980, cùng với các kỹ thuật liên kết chéo.

Các kỹ thuật tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép từ các mảnh kháng thể còn được nêu trong các tài liệu. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra sử dụng liên

kết hóa học. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) mô tả quy trình trong đó các kháng thể nguyên vẹn được cắt bằng phương pháp thủy phân protein để tạo ra các mảnh $F(ab')_2$. Các mảnh này được khử khi có mặt của chất tạo phức dithiol natri arsenite để làm ổn định các vicinal dithiol và ngăn ngừa sự tạo thành disulfua liên phân tử. Các mảnh Fab' được tạo ra sau đó được chuyển thành dẫn xuất thionitrobenzoat (TNB). Một trong số các dẫn xuất Fab' -TNB sau đó được chuyển lại thành Fab' -thiol bằng cách khử với mercaptoethylamin và được trộn lượng đẳng mol của dẫn xuất Fab' -TNB khác để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đặc hiệu kép được sản xuất có thể được sử dụng làm chất để cố định chọn lọc enzym.

Tiến bộ gần đây tạo thuận lợi cho việc phục hồi trực tiếp các mảnh Fab' -SH từ *E. coli*, mà có thể được bất cặp hóa học để tạo thành các kháng thể đặc hiệu kép. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) mô tả việc sản xuất phân tử kháng thể đặc hiệu kép được làm tương thích với người hoàn toàn $F(ab')_2$. Mỗi mảnh Fab' được tiết riêng từ *E. coli* và được tạo cặp hóa học có định hướng *in vitro* để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. Do đó, kháng thể đặc hiệu kép được tạo thành có thể liên kết với tế bào biểu hiện quá mức thụ thể HER2 và tế bào T bình thường của người, cũng như khơi mào hoạt tính phân giải các tế bào lympho gây độc tế bào của người kháng lại đích là khối u vú của người.

Nhiều kỹ thuật khác nhau để tạo ra và phân lập các mảnh kháng thể đặc hiệu kép trực tiếp từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp cũng được nêu. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép đã được sản xuất sử dụng khóa kéo leuxin. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Các peptit khóa kéo leuxin từ protein Fos và Jun được liên kết với các phần Fab' của hai kháng thể khác nhau bằng ca cs dung hợp gen. Homodime kháng thể được khử ở vùng bản lề để tạo thành các monome và sau đó được oxy hóa lại để tạo thành heterodime kháng thể. Phương pháp này còn có thể được sử dụng để sản xuất homodime kháng thể. Công nghệ “kháng thể kép” được nêu bởi Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) tạo ra cơ chế thay thế để sản xuất các mảnh kháng thể đặc hiệu kép. Các mảnh này chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được nối với miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bằng cầu nối mà là quá ngắn để cho phép tạo cặp giữa hai miền trên cùng một chuỗi. Theo đó, miền VH và VL của một mảnh được thúc đẩy để bất cặp với miền VL và VH bổ sung của mảnh khác, do đó tạo thành hai vị trí liên kết kháng nguyên. Chiến lược khác để sản xuất các mảnh kháng thể đặc hiệu kép bằng

cách sử dụng đime Fv chuỗi đơn (sFv) cũng được báo cáo. Xem Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Các kháng thể có nhiều hơn hai hóa trị được đề xuất. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu ba có thể được tạo ra. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Các kháng thể đa giá

Kháng thể đa giá có thể được nội bào hóa (và/hoặc được dị hóa) nhanh hơn kháng thể hóa trị hai bởi tế bào biểu hiện kháng nguyên mà các kháng thể này liên kết với nó. Các kháng thể theo sáng chế có thể là các kháng thể đa hóa trị (mà không thuộc lớp IgM) có ba hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên (ví dụ các kháng thể hóa trị bốn), mà có thể dễ dàng được tạo ra bằng cách biểu hiện tái tổ hợp của axit nucleic mã hóa cho chuỗi polypeptit của kháng thể. Kháng thể đa giá có thể chứa miền đime hóa và ba hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên. Miền đime hóa được ưu tiên chứa (hoặc gồm) vùng Fc hoặc vùng bản lề. Trong trường hợp này, kháng thể sẽ chứa vùng Fc và ba hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên đầu cùng amino với vùng Fc. Kháng thể đa giá được ưu tiên trong bản mô tả chứa (hoặc gồm) ba đến khoảng tám, nhưng tốt hơn là bốn, vị trí liên kết kháng nguyên. Kháng thể đa giá chứa ít nhất một chuỗi polypeptit (và tốt hơn là hai chuỗi polypeptit), trong đó chuỗi polypeptit này chứa hai hoặc nhiều miền biến đổi. Ví dụ, chuỗi polypeptit có thể chứa VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, trong đó VD1 là miền biến đổi thứ nhất, VD2 là miền biến đổi thứ hai, Fc là một chuỗi polypeptit của vùng Fc, X1 và X2 là axit amin hoặc polypeptit, và n là 0 hoặc 1. Ví dụ, chuỗi polypeptit có thể chứa: chuỗi vùng VH-CH1-câu nối linh động-VH-CH1-Fc; hoặc chuỗi vùng VH-CH1-VH-CH1-Fc. Kháng thể đa giá trong bản mô tả tốt hơn là còn gồm ít nhất hai (và tốt hơn là bốn) polypeptit miền biến đổi chuỗi nhẹ. Kháng thể đa giá trong bản mô tả có thể, ví dụ, chứa từ khoảng 2 đến khoảng 8 polypeptit miền biến đổi chuỗi nhẹ. Polypeptit miền biến đổi chuỗi nhẹ được đề xuất ở đây chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ và, tùy ý, còn chứa miền CL.

Biến thể kháng thể

Theo một số phương án, các biến đổi trình tự axit amin của các kháng thể nêu trong bản mô tả này được đề xuất. Ví dụ, có thể mong muốn cải thiện ái lực liên kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể. Biến thể trình tự axit amin của kháng thể được tạo ra bằng cách đưa các thay đổi nucleotit thích hợp vào axit nucleic kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các biến đổi này bao gồm, ví dụ, đột biến mất đoạn,

và/hoặc đột biến gắn xen và/hoặc đột biến thế, các gốc nằm trong trình tự axit amin của kháng thể. Tổ hợp bất kỳ của đột biến mất đoạn, đột biến gắn xen và thế được tạo ra để đạt được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối này có các tính chất mong muốn. Các thay đổi axit amin có thể được đưa vào trình tự axit amin kháng thể mục tiêu ở thời điểm trình tự được tạo ra.

Phương pháp hữu dụng để nhận diện các gốc hoặc vùng của kháng thể mà là các vị trí ưu tiên để gây đột biến được gọi là “kỹ thuật gây đột biến quét alanin” như được nêu bởi Cunningham và Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Trong bản mô tả này, gốc hoặc nhóm các gốc đích được xác định (ví dụ, các gốc mang điện tích như arg, asp, his, lys, và glu) và được thay thế bằng axit amin trung tính hoặc mang điện âm (tốt nhất là alanin hoặc polyalanin) để tác động đến tương tác của axit amin với kháng nguyên. Sau đó các vị trí axit amin thể hiện độ nhạy chức năng với các đột biến thế này được tinh chế bằng cách đưa các biến đổi khác hoặc biến đổi thêm vào hoặc tinh chế đối với các vị trí của đột biến thế. Do đó, mặc dù vị trí để đưa vào biến đổi trình tự axit amin được xác định trước, bản chất của chính đột biến không cần được xác định trước. Ví dụ, để phân tích hiệu quả của đột biến ở vị trí đã cho, kỹ thuật gây đột biến quét ala hoặc gây đột biến ngẫu nhiên được thực hiện ở codon hoặc vùng đích và globulin miễn dịch biểu hiện được sàng lọc về các hoạt tính mong muốn.

Các đột biến gắn xen axit amin bao gồm các thể dung hợp đầu cùng amino- và/hoặc carboxyl có độ dài từ một gốc đến polypeptit chứa hàng trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như các đột biến gắn xen bên trong trình tự của một hoặc nhiều gốc axit amin. Ví dụ về các đột biến gắn xen đầu cùng bao gồm kháng thể có gốc methionyl đầu cùng N hoặc kháng thể dung hợp với polypeptit gây độc tế bào. Các biến thể gắn xen khác của phân tử kháng thể bao gồm thể dung hợp với đầu cùng N- hoặc C của kháng thể này với enzym (ví dụ, đối với ADEPT) hoặc polypeptit mà làm tăng thời gian bán thải huyết thanh của kháng thể.

Sự glycosyl hóa polypeptit thường được liên kết N hoặc được liên kết O. Được liên kết N chỉ sự gắn gốc hydrat cacbon vào chuỗi bên của gốc asparagin. Trình tự tripeptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ trừ prolin, là trình tự nhận biết sự gắn enzym gốc hydrat cacbon với chuỗi bên asparagin. Do đó, sự có mặt của một trong các trình tự tripeptit này trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Glycosyl hóa được liên kết O chỉ sự gắn một trong số các đường

N-aceylgalactosamin, galactosa, hoặc xyloza với axit hydroxyamino, thông thường nhất là serin hoặc threonin, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydrohydroxylysin cũng có thể được sử dụng.

Việc thêm vị trí glycosyl hóa vào kháng thể được thực hiện thuận lợi bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho nó chứa một hoặc nhiều trình tự tripeptit nêu trên (đối với vị trí glycosyl hóa được liên kết N). Sự thay đổi này còn có thể được thực hiện bằng cách thêm, hoặc thay thế bằng, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin vào trình tự của kháng thể ban đầu (đối với vị trí glycosyl hóa được liên kết O).

Khi kháng thể chứa vùng Fc, hydrat cacbon được gắn vào đó có thể được thay đổi. Ví dụ, các kháng thể có cấu trúc hydrat cacbon hoàn thiện mà thiếu fucoza được gắn vào vùng Fc của kháng thể được mô tả trong đơn Sáng chế Mỹ số 2003/0157108 (Presta, L.). Xem thêm US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Các kháng thể có N-acetylglucosamin chia đôi (GlcNAc) trong hydrat cacbon được gắn vào vùng Fc của kháng thể được đề cập trong WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* và Patent Mỹ số 6,602,684, Umana *et al.* Các kháng thể có ít nhất một gốc galactosa trong oligosacarit được gắn vào vùng Fc của kháng thể được báo cáo trong WO 1997/30087, Patel *et al.* Xem thêm, WO 1998/58964 (Raju, S.) và WO 1999/22764 (Raju, S.) về các kháng thể có hydrat cacbon thay đổi được gắn vào vùng Fc của chúng. Xem thêm US 2005/0123546 (Umana *et al.*) về phân tử liên kết kháng nguyên có sự glycosyl hóa được biến đổi.

Biến thể glycosyl hóa được ưu tiên ở đây chứa vùng Fc, trong đó cấu trúc hydrat cacbon được gắn vào vùng Fc thiếu fucoza. Các biến thể này có chức năng ADCC được cải thiện. Tùy ý, vùng Fc còn bao gồm một hoặc nhiều đột biến axit amin trong đó mà cải thiện thêm ADCC, ví dụ, thể ở vị trí 298, 333, và/hoặc 334 của vùng Fc (đánh số gốc theo Eu). Ví dụ về các công bố liên quan đến các kháng thể “bị khử fucosyl” hoặc “thiếu fucoza” bao gồm: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Ví dụ về dòng tế bào sản sinh ra các kháng thể bị khử fucosyl bao gồm tế bào CHO Lec13 thiếu sự fucosyl hóa protein (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); đơn sáng chế Mỹ số US 2003/0157108 A1, Presta, L; và WO 2004/056312

A1, Adams *et al.*, đặc biệt là ở Ví dụ 11), và dòng tế bào bị bất hoạt, như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, *FUT8*, tế bào CHO bị bất hoạt (Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

Một kiểu biến thể khác là biến thể thể axit amin. Các biến thể này có ít nhất một gốc axit amin (ít nhất là hai, ít nhất là ba, ít nhất 4 hoặc nhiều hơn) trong phân tử kháng thể được thay thế bằng gốc khác. Vị trí cần quan tâm nhất đối với phương pháp gây đột biến thể bao gồm vùng siêu biến, nhưng các biến đổi FR cũng được đề xuất. Các đột biến thể bảo toàn được thể hiện trong bảng 1 ở đề mục “đột biến thể được ưu tiên”. Nếu đột biến thể này dẫn đến sự thay đổi về hoạt tính sinh học, thì các thay đổi đáng kể hơn, được gọi là “đột biến thể điển hình” trong bảng 1, hoặc như được mô tả thêm dưới đây về lớp axit amin, có thể được đưa vào và các sản phẩm được sàng lọc.

Bảng 1

Gốc ban đầu	Đột biến thể điển hình	Đột biến thể được ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin	Leu
Leu (L)	Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe

Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin	Leu
---------	---------------------------------------	-----

Các biến đổi cơ bản về tính chất sinh học của kháng thể đạt được bằng cách chọn lọc các đột biến thể mà khác biệt đáng kể về ảnh hưởng của chúng đến sự duy trì (a) cấu trúc của xương sống polypeptit trong vùng có đột biến thể, ví dụ, dưới dạng cấu trúc tấm hoặc xoắn, (b) điện tích hoặc tính kỵ nước của phân tử ở vị trí đích, hoặc (c) kích thước chuỗi bên. Các gốc có trong tự nhiên được chia vào các nhóm dựa trên các tính chất chuỗi bên chung:

- (1) kỵ nước: norleuxin, met, ala, val, leu, ile;
- (2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) axit: asp, glu;
- (4) bazơ: his, lys, arg;
- (5) các gốc mà ảnh hưởng đến hướng chuỗi: gly, pro; và
- (6) thơm: trp, tyr, phe.

Các đột biến thể không bảo tồn sẽ gây ra sự trao đổi thành viên của một trong các lớp này với lớp khác.

Một loại biến thể thể bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của kháng thể mẹ (ví dụ, kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể của người). Thông thường, (các) biến thể thu được được chọn để phát triển tiếp sẽ có tính chất sinh học được cải thiện so với kháng thể mẹ mà từ đó chúng được tạo ra. Cách thuận lợi để tạo ra các biến thể thể này bao gồm hoàn thiện ái lực bằng cách sử dụng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn. Ngắn gọn, một vài vị trí vùng siêu biến (ví dụ, 6 đến 7 vị trí) được gây đột biến để tạo ra tất cả các đột biến thể axit amin có thể ở mỗi vị trí. Do đó các kháng thể được tạo ra được biểu hiện từ các hạt thể thực khuẩn sợi dưới dạng các thể dung hợp với sản phẩm gen III của M13 được gói trong mỗi hạt. Biến thể được biểu hiện bởi thể thực khuẩn sau đó được sàng lọc về hoạt tính sinh học của chúng (ví dụ, ái lực liên kết) như được nêu trong bản mô tả. Để nhận diện vị trí vùng siêu biến ứng viên để cải biến, kỹ thuật gây đột biến quét alanin có thể được tiến hành để nhận diện các gốc vùng siêu biến tham gia đáng kể vào liên kết kháng nguyên. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, có thể là có lợi khi phân tích cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể

để nhận diện điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc xung quanh là các ứng viên cho đột biến thể theo các kỹ thuật được đưa ra trong bản mô tả. Khi các biến thể này được tạo ra, panen chứa các biến thể được sàng lọc như được nêu trong bản mô tả này và các kháng thể có tính chất vượt trội trong một hoặc nhiều thử nghiệm liên quan có thể được chọn để phát triển tiếp.

Phân tử axit nucleic mã hóa các biến thể trình tự axit amin của kháng thể được tạo ra bởi nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp phân lập từ nguồn tự nhiên (trong trường hợp biến thể trình tự axit amin có trong tự nhiên) hoặc tạo ra bằng kỹ thuật gây đột biến qua trung gian (hoặc định hướng vị trí) oligonucleotit, kỹ thuật gây đột biến PCR, và kỹ thuật gây đột biến cat-xet các dạng biến đổi hoặc không biến đổi đã được tạo ra trước đó của kháng thể này.

Có thể mong muốn đưa một hoặc nhiều biến đổi axit amin vào vùng Fc của polypeptit globulin miễn dịch theo sáng chế, nhờ đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc có thể chứa trình tự vùng Fc của người (ví dụ, vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) chứa các biến đổi axit amin (ví dụ, đột biến thể) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin bao gồm biến đổi của cysteine bản lề.

Theo phần mô tả và kiến thức trong lĩnh vực, được đề xuất là trong một số phương án, kháng thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều biến đổi so với kháng thể tương đương kiểu đại, ví dụ, trong vùng Fc. Tuy nhiên, các kháng thể này sẽ gần như giữ lại cùng các tính chất cần thiết để sử dụng trong việc điều trị so với dạng tương đương kiểu đại của chúng. Ví dụ, được cho là một số biến đổi có thể được tạo ra trong vùng Fc mà sẽ gây ra sự liên kết C1q và/hoặc tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) thay đổi (tức là, tăng hoặc giảm), ví dụ, như được nêu trong WO99/51642. Xem thêm Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); Patent Mỹ số 5,648,260; Patent Mỹ số 5,624,821; và WO94/29351 về các ví dụ khác của biến thể vùng Fc. WO00/42072 (Presta) và WO 2004/056312 (Lowman) mô tả biến thể kháng thể có liên kết với FcR tăng hoặc giảm. Xem thêm, Shields *et al. J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Các kháng thể có thời gian bán thải tăng và liên kết với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) được cải thiện, mà chịu trách nhiệm về việc truyền IgG từ mẹ sang bào thai (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) và Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), được mô tả trong US2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Các kháng thể này chứa vùng Fc

có một hoặc nhiều đột biến thể trong đó mà cải thiện sự liên kết vùng Fc với FcRn. Biến thể polypeptit có trình tự axit amin vùng Fc biến đổi và khả năng liên kết C1q tăng hoặc giảm được mô tả trong Patent Mỹ số 6,194,551B1, WO99/51642. Xem thêm, Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Dẫn xuất kháng thể

Các kháng thể có thể được biến đổi thêm để chứa các gốc không phải protein khác mà là đã biết trong lĩnh vực và dễ dàng sẵn có. Tốt hơn nếu, các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất cho kháng thể là polyme tan trong nước. Ví dụ không giới hạn về polyme tan trong nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymethylxenluloza, dextran, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/maleic anhydrit, axit polyamino (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, propylen glycol homopolyme, polypropylen oxit/etylen oxit co-polyme, polyol được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyl, và hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có các ưu điểm khi sản xuất do tính ổn định của nó trong nước. Polyme này có thể có khối lượng phân tử bất kỳ, và có thể được phân nhánh hoặc không phân nhánh. Số lượng polyme được gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn, chúng có thể là các phân tử giống hoặc khác nhau. Nhìn chung, số lượng và/hoặc kiểu của polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên các xem xét bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần được cải thiện, dù dẫn xuất kháng thể có được sử dụng trong liệu pháp điều trị trong các điều kiện xác định hay không, v.v.

Sàng lọc các kháng thể có tính chất mong muốn

Các kháng thể có thể được phân tích về tính chất vật lý/hóa học và chức năng sinh học của chúng bằng các thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực (một số thử nghiệm này được mô tả trong bản mô tả). Theo một số phương án, các kháng thể được phân tích về bất kỳ một hoặc nhiều tác dụng làm giảm hoặc phong bế liên kết FGF (như FGF1 và/hoặc FGF9), tác dụng làm giảm hoặc phong bế sự hoạt hóa FGFR3, tác dụng làm giảm hoặc phong bế quá trình dẫn truyền tín hiệu phân tử xuôi dòng FGFR3, tác dụng phá vỡ hoặc phong bế liên kết FGFR3 với phối tử (ví dụ, FGF1, FGF9), tác dụng làm giảm hoặc phong bế sự dimer hóa FGFR3, thúc đẩy sự tạo thành FGFR3 monome, sự liên kết với FGFR3 monome, và/hoặc tác dụng điều trị và/hoặc ngăn ngừa khối u, rối loạn tăng sinh

tế bào hoặc ung thư; và/hoặc tác dụng điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn có liên quan đến sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính FGFR3 (như sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính FGFR3 tăng). Theo một số phương án, các kháng thể được sàng lọc về tác dụng hoạt hóa FGFR3 tăng, quá trình dẫn truyền tín hiệu phân tử xuôi dòng FGFR3 tăng, hoạt tính gây chết tế bào theo chương trình, tác dụng điều hòa giảm FGFR3, và chức năng hiệu ứng (ví dụ, hoạt tính ADCC).

Các kháng thể được tinh chế có thể còn được phân tích bằng một loạt thử nghiệm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, giải trình tự đầu cùng N, phân tích axit amin, sắc ký lỏng cao áp loại trừ kích thước không biến tính (HPLC), phương pháp đo quang phổ khối, sắc ký trao đổi ion và phân cắt bằng papain.

Trong một số phương án của sáng chế, các kháng thể được sản xuất ở đây được phân tích về hoạt tính sinh học của chúng. Trong một số phương án, các kháng thể theo sáng chế được kiểm tra về hoạt tính liên kết kháng nguyên của chúng. Thử nghiệm liên kết kháng nguyên mà đã biết trong lĩnh vực và có thể được sử dụng trong bản mô tả bao gồm, không giới hạn ở, thử nghiệm liên kết trực tiếp hoặc cạnh tranh bất kỳ sử dụng các kỹ thuật như thẩm tách western, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme), thử nghiệm miễn dịch “bánh kẹp”, thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, và thử nghiệm miễn dịch protein A. Liên kết kháng nguyên minh họa và thử nghiệm khác được cung cấp dưới đây trong phần Ví dụ.

Nếu kháng thể kháng FGFR3 mà ức chế sự phát triển tế bào là mong muốn, kháng thể ứng viên có thể được kiểm tra trong thử nghiệm *in vitro* và/hoặc *in vivo* mà đo tác dụng ức chế phát triển tế bào. Nếu kháng thể kháng FGFR3 mà có hoặc không thúc đẩy tác dụng gây chết tế bào theo chương trình được mong đợi, kháng thể ứng viên có thể được kiểm tra trong các thử nghiệm mà đo tác dụng gây chết tế bào theo chương trình. Phương pháp kiểm tra sự phát triển và/hoặc sự tăng sinh tế bào ung thư, hoặc xác định tác dụng gây chết tế bào theo chương trình của tế bào ung thư là đã biết trong lĩnh vực và một số phương pháp được nêu và được lấy ví dụ trong bản mô tả. Các phương pháp điển hình xác định sự phát triển và/hoặc sự tăng sinh và/hoặc chết tế bào theo chương trình bao gồm, ví dụ, thử nghiệm kết hợp BrdU, MTT, thử nghiệm kết hợp [3H]-thymidin (ví dụ, thử nghiệm TopCount (PerkinElmer)), thử nghiệm về khả năng sống sót của tế bào (ví dụ, CellTiter-Glo (Promega)), thử nghiệm phân đoạn ADN, thử nghiệm hoạt hóa

caspaza, loại trừ xanh tryptan, thử nghiệm hình thái học chất nhuộm sắc và các thử nghiệm tương tự.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể mà có chức năng hiệu ứng. Theo một số phương án, hoạt tính Fc của kháng thể được xác định. Thử nghiệm về tác dụng gây độc tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được thực hiện để xác nhận tác dụng làm giảm/triệt tiêu hoạt tính CDC và/hoặc ADCC. Ví dụ, các thử nghiệm liên kết thụ thể Fc (FcR) có thể được thực hiện để đảm bảo rằng kháng thể thiếu liên kết FcγR (do đó có thể thiếu hoạt tính ADCC), nhưng vẫn giữ khả năng liên kết FcRn. Tế bào sơ cấp gây ra ADCC, tế bào NK, chỉ biểu hiện FcγRIII, trong khi đó các tế bào đơn nhân biểu hiện FcγRI, FcγRII và FcγRIII. Sự biểu hiện FcR trên tế bào tạo máu được tóm tắt trong bảng 3 trên trang 464 của tài liệu Ravetch và Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Ví dụ về thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử cần quan tâm được nêu trong Patent Mỹ số 5,500,362 hoặc 5,821,337. Thử nghiệm để phát hiện hoạt tính ADCC cũng được lấy ví dụ trong bản mô tả. Tế bào hiệu ứng hữu ích cho thử nghiệm này bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và tế bào giết tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử cần quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, ở mẫu động vật như được nêu trong Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). Thử nghiệm liên kết C1q còn có thể được tiến hành để xác nhận rằng kháng thể không thể liên kết C1q và do đó thiếu hoạt tính CDC. Để đánh giá tác dụng hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC, ví dụ, như được nêu trong Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), có thể được tiến hành. Liên kết FcRn và các phép xác định độ thanh thải /thời gian bán thải *in vivo* còn có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, phương pháp được nêu trong phần Ví dụ.

Nếu kháng thể kháng FGFR3 mà liên kết FGFR3 monome là mong muốn, kháng thể ứng viên có thể được kiểm tra trong các thử nghiệm (như thử nghiệm *in vitro*) mà đo sự liên kết với FGFR3 monome và thúc đẩy sự tạo thành FGFR3 monome. Các thử nghiệm này là đã biết trong lĩnh vực và một số thử nghiệm được mô tả và được lấy ví dụ trong bản mô tả.

Nếu kháng thể kháng FGFR3 mà ức chế sự dimer hóa FGFR3 được mong muốn, kháng thể ứng viên có thể được kiểm tra trong thử nghiệm dimer hóa, ví dụ, như được mô tả và được lấy ví dụ trong bản mô tả.

Theo một số phương án, chức năng chủ vận FGFR3 của kháng thể ứng viên được xác định. Phương pháp để đánh giá chức năng chủ vận hoặc hoạt tính của kháng thể FGFR3 là đã biết trong lĩnh vực và một số phương pháp được nêu và được lấy ví dụ trong bản mô tả.

Theo một số phương án, khả năng kháng thể FGFR3 thúc đẩy sự điều hòa giảm thụ thể FGFR3 được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp được nêu và được lấy ví dụ trong bản mô tả. Theo một phương án, kháng thể FGFR3 được ủ với tế bào thử nghiệm thích hợp, ví dụ, dòng tế bào ung thư bàng quang (ví dụ, RT112), và sau khoảng thời gian thích hợp, dịch dung giải tế bào được thu hoạch và được kiểm tra về tổng các mức FGFR3. Phân tích FACS còn có thể được sử dụng để kiểm tra mức thụ thể FGFR3 bề mặt sau khi ủ với các kháng thể FGFR3 ứng viên.

Vector, tế bào chủ, và phương pháp tái tổ hợp

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể, axit nucleic mã hóa cho nó được phân lập và được gắn xen vào vector có khả năng sao chép để tách dòng tiếp (khuếch đại ADN) hoặc để biểu hiện. ADN mã hóa cho kháng thể được phân lập dễ dàng và được giải trình tự sử dụng quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng đoạn dò oligonucleotit có khả năng liên kết đặc hiệu với các gen mã hóa cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể). Nhiều vector là sẵn có. Việc lựa chọn vector phụ thuộc một phần vào tế bào chủ được sử dụng. Thông thường, tế bào chủ được ưu tiên có nguồn gốc từ tế bào tiền nhân hoặc nhân chuẩn (thường là động vật có vú). Sẽ được hiểu rằng vùng hằng định thuộc isotyp bất kỳ có thể được sử dụng cho mục đích này, bao gồm vùng hằng định IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE, và các vùng hằng định này có thể thu được từ người hoặc loài động vật bất kỳ.

a. Tạo ra các kháng thể bằng cách sử dụng tế bào chủ tiền nhân:

i. Cấu trúc vector

Trình tự polynucleotit mã hóa cho thành phần polypeptit của kháng thể theo sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp chuẩn. Trình tự polynucleotit mong muốn có thể được phân lập và được giải trình tự từ tế bào sản xuất kháng thể như tế bào lai. Theo cách khác, polynucleotit có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng chất tổng hợp nucleotit hoặc kỹ thuật PCR. Khi thu được, các trình tự mã hóa cho polypeptit được gắn xen vào vector tái tổ hợp có khả năng sao chép và biểu hiện polynucleotit khác loại trong vật chủ tiền nhân. Nhiều vector là sẵn có và đã biết trong lĩnh vực có thể sử dụng cho mục đích của sáng chế. Việc lựa chọn vector thích hợp sẽ phụ thuộc chủ yếu

vào kích thước của axit nucleic cần được gắn xen vào vector và tế bào chủ cụ thể cần được biến nạp bằng vector này. Mỗi vector chứa các thành phần khác nhau, tùy thuộc vào chức năng của nó (khuếch đại hoặc biểu hiện polynucleotit khác loại, hoặc cả hai) và tính tương thích của nó với tế bào chủ cụ thể mà nó nằm trong đó. Thành phần vector thường bao gồm, nhưng không giới hạn ở: gốc sao chép, gen đánh dấu chọn lọc, trình tự khởi động, vị trí liên kết ribosom (RBS), trình tự tín hiệu, trình tự gắn xen axit nucleic khác loại và trình tự kết thúc phiên mã.

Nhìn chung, vector plasmid chứa đơn vị sao chép và trình tự kiểm soát mà thu được từ loài thích hợp với tế bào chủ được sử dụng kết hợp với vật chủ này. Vector này thường mang vị trí sao chép, cũng như trình tự đánh dấu mà có khả năng cung cấp lựa chọn kiểu hình trong tế bào đã biến nạp. Ví dụ, *E. coli* thường được biến nạp bằng cách sử dụng pBR322, plasmid thu được từ loài *E. coli*. pBR322 chứa gen mã hóa tính kháng ampicillin (Amp) và tetracyclin (Tet) và do đó tạo ra cách thức dễ dàng để nhận diện tế bào đã được biến nạp. pBR322, dẫn xuất của nó, hoặc plasmid vi khuẩn khác hoặc thể thực khuẩn còn có thể chứa, hoặc được biến đổi để chứa, trình tự khởi động mà có thể được sử dụng bởi vi khuẩn để biểu hiện protein nội sinh. Ví dụ về dẫn xuất pBR322 được sử dụng để biểu hiện các kháng thể cụ thể được mô tả chi tiết trong Carter et al., Patent Mỹ số 5,648,237.

Ngoài ra, vector thể thực khuẩn chứa đơn vị sao chép và trình tự kiểm soát mà thích hợp với vi sinh vật chủ có thể được sử dụng làm vector biến nạp kết hợp với các vật chủ này. Ví dụ, thể thực khuẩn như λ GEM.TM.-11 có thể được sử dụng để tạo ra vector tái tổ hợp mà có thể được sử dụng để biến nạp tế bào chủ nhạy cảm như *E. coli* LE392.

Vector biểu hiện theo sáng chế có thể chứa hai hoặc hơn cặp trình tự khởi động-cistron, mã hóa cho mỗi thành phần polypeptit. Trình tự khởi động là trình tự điều hòa chưa được dịch mã được đặt ngược dòng (5') với cistron mà điều biến sự biểu hiện của nó. Trình tự khởi động của tế bào tiền nhân thường nằm trong hai lớp, cảm ứng và cơ định. Trình tự khởi động cảm ứng được là trình tự khởi động mà khởi động các mức phiên mã tăng của cistron dưới sự kiểm soát của nó đáp lại các thay đổi trong điều kiện môi trường nuôi cấy, ví dụ, sự có mặt hoặc sự vắng mặt của chất dinh dưỡng hoặc thay đổi nhiệt độ.

Số lượng lớn các trình tự khởi động được nhận biết bởi nhiều tế bào chủ tiềm năng khác nhau đã được biết rõ. Trình tự khởi động được chọn có thể được liên kết chức

năng với ADN cistron mã hóa cho chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng bằng cách loại bỏ trình tự khởi động từ ADN nguồn nhờ sự phân cắt bằng enzym giới hạn và gắn trình tự khởi động đã được phân lập vào vectơ theo sáng chế. Cả trình tự khởi động tự nhiên và nhiều trình tự khởi động khác loại đều có thể được sử dụng để điều khiển sự khuếch đại và/hoặc biểu hiện của gen đích. Theo một số phương án, trình tự khởi động khác loại được sử dụng, vì chúng thường cho phép sự phiên mã mức cao hơn và hiệu suất của gen đích được biểu hiện cao hơn so với trình tự khởi động polypeptit đích tự nhiên.

Trình tự khởi động thích hợp để sử dụng với vật chủ tiền nhân bao gồm trình tự khởi động PhoA, hệ trình tự khởi động β -galactamaza và lactoza, hệ trình tự khởi động tryptophan (trp) và trình tự khởi động lai như trình tự khởi động tac hoặc trc. Tuy nhiên, các trình tự khởi động khác mà hoạt động trong vi khuẩn (như các trình tự khởi động vi khuẩn hoặc thể thực khuẩn đã biết) cũng là thích hợp. Trình tự nucleotit của chúng đã được công bố, nhờ đó cho phép người có kiến thức trung bình có thể nối chúng với các cistron mã hóa cho chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đích (Siebenlist et al., (1980) Cell 20: 269) bằng cách sử dụng cầu nối hoặc các adaptor để cung cấp vị trí giới hạn cần thiết bất kỳ.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mỗi xistron trong vectơ tái tổ hợp chứa thành phần trình tự tín hiệu tiết mà điều khiển sự di chuyển của polypeptit đã biểu hiện qua màng. Nhìn chung, trình tự tín hiệu có thể là thành phần của vectơ, hoặc nó có thể là một phần của ADN polypeptit đích mà được gắn xen vào vectơ. Trình tự tín hiệu được chọn cho mục đích của sáng chế nên là trình tự được nhận biết và được xử lý (tức là, được phân cắt bằng peptidaza tín hiệu) bởi tế bào chủ. Đối với tế bào chủ tiền nhân mà không nhận biết và xử lý trình tự tín hiệu tự nhiên đối với polypeptit khác loại, trình tự tín hiệu này được thay thế bởi trình tự tín hiệu tiền nhân được chọn, ví dụ, từ nhóm gồm phosphataza kiềm, penixilinaza, Ipp, hoặc gen khởi đầu độc tố ruột ổn định nhiệt II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA, và MBP. Theo một phương án của sáng chế, trình tự tín hiệu được sử dụng trong cả hai cistron của hệ biểu hiện là trình tự tín hiệu STII hoặc biến thể của chúng.

Theo khía cạnh khác, việc sản xuất globulin miễn dịch theo sáng chế có thể xảy ra trong tế bào chất của tế bào chủ, và do đó không yêu cầu sự có mặt của trình tự tín hiệu tiết trong mỗi cistron. Về mặt này, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng globulin miễn dịch được biểu hiện, được gấp và lắp ráp để tạo thành globulin miễn dịch chức năng trong tế bào chất. Một số chủng chủ (ví dụ, *E. coli* chủng trxB-) tạo ra các điều kiện tế bào chất mà là có lợi

cho việc tạo thành liên kết disulfua, nhờ đó cho phép gấp và lắp thích hợp các tiểu đơn vị protein được biểu hiện. Proba và Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Tế bào chủ tiền nhân thích hợp để biểu hiện các kháng thể theo sáng chế bao gồm Archaeobacteria và Eubacteria, như sinh vật Gram âm hoặc Gram dương. Ví dụ về vi khuẩn hữu dụng bao gồm loài *Escherichia* (ví dụ, *E. coli*), *Bacilli* (ví dụ, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, *Pseudomonas* (ví dụ, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, hoặc *Paracoccus*. Theo một phương án, tế bào Gram âm được sử dụng. Theo một phương án, tế bào *E. coli* được sử dụng làm tế bào chủ theo sáng chế. Ví dụ về chủng *E. coli* bao gồm chủng W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325) và dẫn xuất của chúng, bao gồm chủng 33D3 có genotyp W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT(Δ nmpr-fepE) degP41 kanR (Patent Mỹ số 5,639,635). Các chủng khác và dẫn xuất của chúng, như *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31,537) và *E. coli* RV308(ATCC 31,608) cũng là thích hợp. Các ví dụ này nhằm minh họa chứ không nhằm giới hạn sáng chế. Phương pháp tạo dẫn xuất của vi khuẩn bất kỳ được nêu ở trên có kiểu gen xác định là đã biết trong lĩnh vực và được nêu trong, ví dụ, Bass et al., Protein, 8:309-314 (1990). Thường là cần thiết phải lựa chọn vi khuẩn thích hợp có tính đến khả năng sao chép của các đơn vị sao chép trong tế bào vi khuẩn. Ví dụ, loài *E. coli*, *Serratia*, hoặc *Salmonella* có thể được sử dụng thích hợp làm vật chủ khi các plasmid đã biết như pBR322, pBR325, pACYC177, hoặc pKN410 được sử dụng để cung cấp đơn vị sao chép này. Thông thường, tế bào chủ nên tiết ra lượng enzyme phân giải protein tối thiểu, và chất ức chế proteaza khác có thể được kết hợp theo ý muốn vào môi trường nuôi cấy tế bào.

ii. Sản xuất kháng thể

Tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện được mô tả trên đây và được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được biến đổi thích hợp để cảm ứng trình tự khởi động, lựa chọn thể biến nạp, hoặc khuếch đại các gen mã hóa cho trình tự mong muốn.

Sự biến nạp chỉ việc đưa ADN vào vật chủ tiền nhân sao cho ADN có thể sao chép, dưới dạng yếu tố ngoài nhiễm sắc thể hoặc bằng nhiễm sắc thể nguyên vẹn. Tùy thuộc vào tế bào chủ được sử dụng, sự biến nạp được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ

thuật chuẩn thích hợp với các tế bào này. Việc xử lý bằng canxi sử dụng canxi clorua được sử dụng cho tế bào vi khuẩn mà chứa hàng rào thành tế bào quan trọng. Phương pháp khác để biến nạp sử dụng polyetylen glycol/DMSO. Kỹ thuật khác được sử dụng là xung điện.

Tế bào tiền nhân được sử dụng để sản xuất polypeptit theo sáng chế được nuôi trong môi trường đã biết trong lĩnh vực và thích hợp để nuôi cấy tế bào chủ đã chọn. Ví dụ về môi trường thích hợp bao gồm môi trường canh thang Luria (LB) cộng thêm các yếu tố dưỡng chất bổ sung cần thiết. Theo một số phương án, môi trường này còn chứa chất chọn lọc, được chọn dựa trên cấu trúc của vectơ biểu hiện, để cho phép phát triển chọn lọc tế bào tiền nhân chứa vectơ biểu hiện. Ví dụ, ampicilin được bổ sung vào môi trường để phát triển tế bào biểu hiện gen kháng ampicilin.

Chất bổ sung cần thiết bất kỳ ngoài nguồn cacbon, nitơ, và phosphat vô cơ cũng có thể được bao gồm ở nồng độ thích hợp được đưa vào một mình hoặc dưới dạng hỗn hợp với chất bổ sung hoặc môi trường khác như nguồn nitơ phức hợp. Tùy ý môi trường nuôi cấy có thể chứa một hoặc nhiều chất khử được chọn từ nhóm bao gồm glutathion, xystein, cystamin, thioglycollat, dithioerythritol và dithiothreitol.

Tế bào tiền nhân được nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp. Đối với sự phát triển của *E. coli*, ví dụ, nhiệt độ được ưu tiên nằm trong khoảng từ 20°C đến 39°C, tốt hơn nữa là từ khoảng 25°C đến khoảng 37°C, tốt hơn nữa là ở khoảng 30°C. Độ pH của môi trường có thể là độ pH bất kỳ nằm trong khoảng từ 5 đến 9, phụ thuộc chủ yếu vào sinh vật chủ. Đối với *E. coli*, độ pH tốt hơn là từ khoảng 6,8 đến khoảng 7,4, và tốt hơn nữa là khoảng 7,0.

Nếu trình tự khởi động cảm ứng được sử dụng trong vectơ biểu hiện theo sáng chế, sự biểu hiện protein được cảm ứng trong các điều kiện thích hợp để hoạt hóa trình tự khởi động. Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự khởi động PhoA được sử dụng để kiểm soát sự phiên mã của polypeptit. Theo đó, tế bào chủ đã được biến nạp được nuôi cấy trong môi trường giới hạn phosphat để cảm ứng. Tốt hơn nếu, môi trường giới hạn phosphat là môi trường C.R.A.P (xem, ví dụ, Simmons et al., J. Immunol. Method (2002), 263:133-147). Nhiều chất cảm ứng khác có thể được sử dụng, tùy theo cấu trúc vectơ được dùng, như đã biết trong lĩnh vực.

Theo một phương án, polypeptit được biểu hiện theo sáng chế được tiết vào và được thu hồi từ chất tế bào của tế bào chủ. Việc thu hồi protein thường bao gồm bước

phá vỡ vi sinh vật, thường bằng cách như sốc thẩm thấu, nghiền siêu âm hoặc dung giải. Khi tế bào bị phá vỡ, mảnh vụn tế bào hoặc tế bào nguyên vẹn có thể được loại bỏ bằng cách ly tâm hoặc lọc. Protein có thể được tinh chế thêm, ví dụ, bằng sắc ký nhựa ái lực. Theo cách khác, protein có thể được chuyển vào môi trường nuôi cấy và được phân lập trong đó. Tế bào có thể được loại bỏ từ môi trường nuôi cấy và chất nổi bề mặt của môi trường được lọc và cô để tinh chế tiếp protein được sản sinh. Polypeptit được biểu hiện có thể được phân lập thêm và được xác định bằng cách sử dụng phương pháp đã biết phổ biến như điện di gel polyacrylamit (PAGE) và thử nghiệm thẩm tách Western.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sự sản sinh kháng thể được thực hiện với số lượng lớn bằng quy trình lên men. Các quá trình lên men theo mẻ quy mô lớn là sẵn có để sản xuất protein tái tổ hợp. Các mẻ lên men quy mô lớn có dung tích ít nhất là 1000 lít, tốt hơn là từ khoảng 1000 đến 100 000 lít. Các thiết bị lên men này sử dụng cánh khuấy để phân phối oxy và chất dinh dưỡng, đặc biệt là glucoza (nguồn cacbon/năng lượng được ưu tiên). Phương pháp lên men quy mô nhỏ chỉ chung sự lên men trong thiết bị lên men mà có dung tích không lớn hơn xấp xỉ 100 lít, và có thể thay đổi trong khoảng từ 1 lít đến 100 lít.

Trong quy trình lên men, việc cảm ứng biểu hiện protein thường được bắt đầu sau khi tế bào đã được nuôi trong điều kiện thích hợp đến mật độ mong muốn, ví dụ, OD550 là khoảng từ 180 đến 220, tại giai đoạn đó các tế bào là ở pha ổn định sớm. Nhiều chất cảm ứng có thể được sử dụng, tùy theo cấu trúc vectơ được dùng, như đã biết trong lĩnh vực và được nêu ở trên. Các tế bào có thể nuôi trong các khoảng thời gian ngắn hơn trước khi cảm ứng. Tế bào thường được cảm ứng trong khoảng từ 12 đến 50 giờ, mặc dù thời gian cảm ứng dài hơn hoặc ngắn hơn có thể được sử dụng.

Để cải thiện hiệu suất sản xuất và chất lượng của polypeptit theo sáng chế, các điều kiện lên men khác nhau có thể được thay đổi. Ví dụ, để cải thiện sự lắp ráp và gấp thích hợp các polypeptit kháng thể tiết, vectơ bổ sung biểu hiện quá mức protein chaperone, như protein Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, và/hoặc DsbG) hoặc FkpA (peptidylprolyl cis,trans-isomerase có hoạt tính chaperone) có thể được sử dụng để đồng biến nạp tế bào chủ tiền nhân. Protein chaperone đã được chứng minh là tạo thuận lợi cho việc gấp thích hợp và tính tan của protein khác loại được sản sinh trong tế bào chủ vi khuẩn. Chen et al., (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605; Georgiou et al., Patent Mỹ số 6,083,715; Georgiou et al., Patent Mỹ số 6,027,888; Bothmann và Pluckthun (2000) J.

Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm và Pluckthun, (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al., (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

Để tối thiểu hóa sự phân giải protein của các protein khác loại được biểu hiện (đặc biệt là các protein nhạy với sự phân giải protein này), một số chủng chủ thiếu enzym phân giải protein có thể được sử dụng cho sáng chế. Ví dụ, chủng tế bào chủ có thể được biến đổi để tác động đến (các) đột biến di truyền ở các gen mã hóa cho proteaza vi khuẩn đã biết như Proteaza III, OmpT, DegP, Tsp, Proteaza I, Proteaza Mi, Protease V, Proteaza VI, và hỗn hợp của chúng. Một số chủng thiếu proteaza *E. coli* là sẵn có và được nêu trong, ví dụ, Joly et al., (1998), supra; Georgiou et al., Patent Mỹ số 5,264,365; Georgiou et al., Patent Mỹ số 5,508,192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

Theo một phương án, chủng *E. coli* thiếu enzym phân giải protein và được biến nạp với plasmid biểu hiện quá mức một hoặc nhiều protein chaperone được sử dụng làm tế bào chủ trong hệ biểu hiện theo sáng chế.

iii. Tinh chế kháng thể

Phương pháp tinh chế protein chuẩn đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng. Các quy trình sau là ví dụ về quy trình tinh chế thích hợp: phân đoạn trên cột trao đổi ion hoặc ái lực miễn dịch, kết tủa etanol, HPLC pha đảo, sắc ký trên silica hoặc trên nhựa trao đổi cation như DEAE, sắc ký điểm đẳng điện, SDS-PAGE, kết tủa amoni sulfat, và sử dụng lọc gel, ví dụ, Sephadex G-75.

Theo một khía cạnh, Protein A được cố định trên pha rắn được sử dụng để tinh chế ái lực miễn dịch sản phẩm kháng thể có chiều dài đầy đủ theo sáng chế. Protein A là protein thành tế bào 41kD từ *Staphylococcus aureus* liên kết ái lực cao với vùng Fc của các kháng thể. Lindmark et al., (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. Pha rắn mà Protein A được cố định vào đó tốt hơn là cột chứa bề mặt thủy tinh hoặc silica, tốt hơn nữa là cột thủy tinh có kích thước lỗ được kiểm soát hoặc cột silica. Trong một vài ứng dụng, cột đã được phủ chất phản ứng, như glyxerol, để ngăn ngừa sự kết dính tạp chất không đặc hiệu.

Theo bước thứ nhất của quá trình tinh chế, chế phẩm thu được từ môi trường nuôi cấy tế bào như nêu trên được phủ lên protein A được cố định vào pha rắn để cho phép liên kết đặc hiệu kháng thể cần quan tâm với Protein A. Pha rắn sau đó được rửa để loại bỏ tạp chất liên kết không đặc hiệu với pha rắn. Cuối cùng kháng thể cần quan tâm được thu hồi từ pha rắn bằng cách rửa giải.

b. Tạo ra các kháng thể bằng cách sử dụng tế bào chủ nhân chuẩn:

Các thành phần vector thường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều thành phần sau: trình tự tín hiệu, gốc sao chép, một hoặc nhiều gen đánh dấu, yếu tố tăng cường, trình tự khởi động, và trình tự kết thúc phiên mã.

(i) Thành phần trình tự tín hiệu

Vector để sử dụng trong tế bào chủ nhân chuẩn còn có thể chứa trình tự tín hiệu hoặc polypeptit khác có vị trí phân cắt đặc hiệu ở đầu cùng N của protein trưởng thành hoặc polypeptit cần quan tâm. Trình tự tín hiệu khác loại được chọn tốt hơn nếu là trình tự được nhân diện và được xử lý (tức là, được phân cắt bởi peptidaza tín hiệu) bởi tế bào chủ. Trong sự biểu hiện tế bào động vật có vú, trình tự tín hiệu động vật có vú cũng như trình tự dẫn đầu tiết của virus, ví dụ, tín hiệu gD herpes simplex, là có sẵn.

ADN cho vùng tiền thân này được nối trong khung đọc với ADN mã hóa cho kháng thể này.

(ii) Gốc sao chép

Thông thường, gốc của thành phần sao chép là không cần đối với vector biểu hiện của động vật có vú. Ví dụ, gốc SV40 thường có thể được sử dụng chỉ vì nó chứa trình tự khởi động sớm.

(iii) Lựa chọn thành phần gen

Vector biểu hiện và tách dòng có thể chứa gen chọn lọc, còn được gọi là gen đánh dấu chọn lọc. Gen chọn lọc điển hình mã hóa cho protein mà (a) gây ra tính kháng kháng sinh hoặc các độc tố khác, ví dụ, ampicilin, neomycin, methotrexat, hoặc tetracyclin, (b) bổ sung các thiếu hụt dinh dưỡng thụ động, khi liên quan, hoặc (c) cung cấp chất dinh dưỡng quan trọng không sẵn có từ môi trường phức hợp.

Một ví dụ về sơ đồ lựa chọn sử dụng được chất để kìm hãm sự phát triển của tế bào chủ. Các tế bào được biến nạp thành công với gen khác loài sản sinh ra protein gây ra tính kháng thuốc và do đó vẫn tồn tại chế độ chọn lọc. Ví dụ về phương pháp chọn lọc chiếm ưu thế sử dụng thuốc neomycin, axit mycophenolic và hygromycin.

Ví dụ khác về gen đánh dấu chọn lọc thích hợp cho tế bào động vật có vú là các gen cho phép nhận diện tế bào có khả năng hấp thụ axit nucleic kháng thể, như DHFR, thymidin kinaza, metallothionein-I và -II, tốt hơn là gen metallothionein của động vật linh trưởng, adenosin deaminaza, ornithin decarboxylaza, v.v.

Ví dụ, tế bào được biến nạp với gen lựa chọn DHFR được xác định trước tiên bằng cách nuôi cấy tất cả các thể biến nạp trong môi trường nuôi cấy mà chứa methotrexat (Mtx), chất đối kháng cạnh tranh của DHFR. Tế bào chủ thích hợp khi DHFR kiểu dại được sử dụng là dòng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) thiếu hoạt tính DHFR (ví dụ, ATCC CRL-9096).

Theo cách khác, tế bào chủ (đặc biệt là vật chủ kiểu dại mà chứa DHFR nội sinh) được biến nạp hoặc đồng biến nạp với trình tự ADN mã hóa cho kháng thể, protein DHFR kiểu dại, và gen đánh dấu được chọn lọc khác như aminoglycosit 3'-phosphotransferaza (APH) có thể được chọn bởi sự phát triển tế bào trong môi trường chứa chất chọn lọc cho gen đánh dấu chọn lọc như chất kháng sinh aminoglycosidic, ví dụ, kanamycin, neomycin, hoặc G418. Xem Patent Mỹ số 4,965,199.

(iv) Thành phần trình tự khởi động

Vectơ biểu hiện và tách dòng thường chứa trình tự khởi động mà được nhận diện bởi sinh vật chủ và được liên kết chức năng với polypeptit axit nucleic kháng thể. Trình tự khởi động là đã biết đối với sinh vật nhân chuẩn. Tất cả các gen nhân chuẩn thực sự có vùng giàu AT nằm ở vị trí khoảng từ 25 đến 30 bazơ ngược dòng từ vị trí mà ở đó sự phiên mã được bắt đầu. Trình tự khác tìm thấy từ 70 đến 80 bazơ ngược dòng từ vị trí bắt đầu phiên mã của nhiều gen là vùng CNCAAT trong đó N có thể là nucleotit bất kỳ. Ở đầu 3' của hầu hết các gen nhân chuẩn là trình tự AATAAA mà có thể là tín hiệu để bổ sung đuôi poly A vào đầu 3' của trình tự mã hóa. Tất cả các trình tự này được gắn xen thích hợp vào vectơ biểu hiện nhân chuẩn.

Sự phiên mã polypeptit kháng thể từ vectơ ở tế bào chủ của động vật có vú được kiểm soát, ví dụ, bởi trình tự khởi động thu được từ bộ gen của virus như virus polyoma, virus gây bệnh đậu gà, adenovirus (như Adenovirus 2), virus papilloma ở bò, virus xacom ở loài chim, cytomegalovirus, retrovirus, virus viêm gan B, và Virus Simian 40 (SV40), từ trình tự khởi động của động vật có vú khác loại, ví dụ, trình tự khởi động actin hoặc gen khởi đầu globulin miễn dịch, từ trình tự khởi động sốc nhiệt, miễn là các trình tự khởi động này thích hợp với hệ tế bào chủ.

Trình tự khởi động sớm và muộn của virus SV40 thu được thuận lợi dưới dạng đoạn giới hạn SV40 mà cũng chứa gốc sao chép virus SV40. Trình tự khởi động sớm ngay lập tức của cytomegalovirus ở người thu được thuận lợi dưới dạng đoạn giới hạn HindIII E. Hệ biểu hiện ADN ở vật chủ là động vật có vú sử dụng virus papilloma ở bò

làm vector được mô tả trong Patent Mỹ số 4,419,446. Sự biến đổi của hệ này được mô tả trong Patent Mỹ số 4,601,978. Theo cách khác, đoạn lặp đầu cùng dài của Virut Rous Sarcoma có thể được sử dụng làm trình tự khởi động.

(v) Thành phần yếu tố tăng cường

Sự phiên mã ADN mã hóa cho polypeptit kháng thể theo sáng chế bởi sinh vật nhân chuẩn bậc cao thường được tăng cường bằng cách gắn xen trình tự tăng cường vào vector này. Nhiều trình tự tăng cường hiện nay đã được biết từ gen động vật có vú (globin, elastaza, albumin, α -fetoprotein, và insulin). Tuy nhiên, thông thường, người ta sẽ sử dụng yếu tố tăng cường từ virus tế bào nhân chuẩn. Ví dụ gồm yếu tố tăng cường SV40 ở phía trước của gốc sao chép (cặp bazơ 100-270), gen tăng cường trình tự khởi động sớm cytomegalovirus, gen tăng cường polyoma ở phía trước của gốc sao chép, và gen tăng cường adenovirus. Xem thêm Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) về nguyên tố tăng cường để hoạt hóa trình tự khởi động nhân chuẩn. Gen tăng cường có thể được nối vào vector ở vị trí 5' hoặc 3' với trình tự mã hóa cho polypeptit kháng thể, nhưng tốt hơn là nằm ở vị trí 5' từ trình tự khởi động.

(vi) Thành phần kết thúc phiên mã

Vector biểu hiện được sử dụng trong tế bào chủ nhân chuẩn thường cũng sẽ chứa trình tự cần thiết để kết thúc phiên mã và để ổn định mRNA. Các trình tự này thường là có sẵn từ đầu 5' và, đôi khi là 3', vùng chưa dịch mã của ADN hoặc cADN sinh vật nhân chuẩn hoặc virus. Các vùng này chứa các đoạn nucleotit được sao chép thành các đoạn được polyadenyl hóa trong phần chưa dịch mã của mRNA mã hóa cho kháng thể. Một thành phần kết thúc phiên mã hữu ích là vùng polyadenyl hóa hormon tăng trưởng ở bò. Xem WO94/11026 và vector biểu hiện được mô tả trong đó.

(vii) Chọn lọc và biến nạp tế bào chủ

Tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện ADN trong các vector ở đây bao gồm tế bào nhân chuẩn bậc cao được mô tả ở đây, bao gồm tế bào chủ động vật có xương sống. Sự nhân giống tế bào động vật có xương sống trong môi trường nuôi cấy (môi trường nuôi cấy mô) đã trở thành quy trình thông thường. Ví dụ về dòng tế bào chủ động vật có vú hữu dụng là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bằng SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); dòng thận phôi người (293 hoặc tế bào 293 được tách dòng phụ để phát triển trong môi trường nuôi cấy huyền phù, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); tế bào thận của chuột ham con (BHK, ATCC CCL 10); tế bào buồng trứng chuột ham Trung

Quốc/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); tế bào sertoli của chuột (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); tế bào thận khi (CV1 ATCC CCL 70); tế bào thận khi xanh châu Phi (VERO-76, ATCC CRL-1587); tế bào caxinom cổ tử cung người (HELA, ATCC CCL 2); tế bào thận chó (MDCK, ATCC CCL 34); tế bào gan chuột buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); tế bào phổi người (W138, ATCC CCL 75); tế bào gan người (Hep G2, HB 8065); khối u vú của chuột (MMT 060562, ATCC CCL51); tế bào TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); tế bào MRC 5; tế bào FS4; và dòng tế bào u ung thư gan ở người (Hep G2).

Tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện hoặc tách dòng nêu trên để sản xuất kháng thể và được nuôi cấy trong môi trường dưỡng chất thông thường được biến đổi thích hợp để cảm ứng trình tự khởi động, lựa chọn thể biến nạp, hoặc khuếch đại gen mã hóa cho trình tự mong muốn.

(viii) Nuôi cấy tế bào chủ

Tế bào chủ được sử dụng để sản xuất kháng thể theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong nhiều môi trường. Môi trường có trên thị trường như Ham's F10 (Sigma), Môi trường cần thiết tối thiểu ((Minimal Essential Environment - MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), và Môi trường Eagle được biến đổi Dulbecco ((DMEM), Sigma) là thích hợp để nuôi cấy tế bào chủ. Ngoài ra, môi trường bất kỳ được mô tả trong Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980), Patent Mỹ số 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; hoặc 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; hoặc Patent Mỹ Re. 30,985 đều có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ. Môi trường bất kỳ trong số các môi trường này có thể được bổ sung, nếu cần, hormon và/hoặc các yếu tố tăng trưởng khác (như insulin, transferin, hoặc yếu tố tăng trưởng biểu bì), muối (như natri clorua, canxi, magie, và phosphat), chất đệm (như HEPES), nucleotit (như adenosin và thymidin), thuốc kháng sinh (như thuốc GENTAMYCIN™), nguyên tố vi lượng (được định nghĩa là hợp chất vô cơ thường có mặt ở nồng độ cuối cùng trong khoảng micromol), và glucoza hoặc nguồn năng lượng tương đương. Chất bổ sung cần thiết bất kỳ khác còn có thể được bao gồm ở các nồng độ thích hợp mà sẽ được đã biết bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực. Các điều kiện nuôi cấy, như nhiệt độ, pH, và tương tự, là các điều kiện đã được sử dụng trước đó với tế bào chủ được chọn lọc để biểu hiện, và sẽ là rõ ràng với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực.

(ix) Tinh chế kháng thể

Khi sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp, kháng thể có thể được sản sinh nội bào, hoặc tiết trực tiếp vào môi trường. Nếu kháng thể được sản sinh nội bào, là bước thứ nhất, mảnh dạng hạt, tế bào chủ hoặc các phân đoạn được dung giải, được loại bỏ, ví dụ, bằng cách ly tâm hoặc siêu lọc. Khi kháng thể được tiết vào môi trường, các chất nổi bề mặt từ hệ biểu hiện này thường trước hết được cô đặc sử dụng thiết bị lọc cô đặc protein có trên thị trường, ví dụ, bộ siêu lọc Amicon hoặc Millipore Pellicon. Chất ức chế proteaza như PMSF có thể được bao gồm trong bước bất kỳ trong các bước trước đó để ức chế sự phân giải protein và các thuốc kháng sinh có thể được bao gồm để ngăn ngừa sự phát triển của các tạp chất ngẫu nhiên.

Chế phẩm kháng thể được bào chế từ tế bào có thể được tinh chế bằng cách sử dụng, ví dụ, sắc ký hydroxyapatite, điện di gel, thẩm tách, và sắc ký ái lực, trong đó sắc ký ái lực là kỹ thuật tinh chế được ưu tiên. Tính thích hợp của protein A làm phối tử ái lực phụ thuộc vào loài và isotyp của miền Fc globulin miễn dịch bất kỳ mà có mặt trong kháng thể. Protein A có thể được sử dụng để tinh chế các kháng thể mà dựa trên chuỗi nặng $\gamma 1$, $\gamma 2$, hoặc $\gamma 4$ của người (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Protein G được đề xuất cho tất cả isotyp của chuột và cho $\gamma 3$ của người (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). Chất nền mà phối tử ái lực được gắn vào phần lớn là agarosa, nhưng các chất nền khác là có sẵn. Chất nền ổn định cơ học như thủy tinh có kích thước lỗ đồng đều nhất định hoặc poly(styrene-divinyl)benzen cho phép tốc độ chảy nhanh hơn và thời gian xử lý ngắn hơn so với có thể đạt được với agarosa. Khi kháng thể chứa miền CH3, nhựa Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) là hữu dụng để tinh chế. Các kỹ thuật khác để tinh chế protein như phân đoạn trên cột trao đổi ion, kết tủa ethanol, HPLC pha đảo, sắc ký trên silica, sắc ký trên heparin, sắc ký SEPHAROSE™ trên nhựa trao đổi anion hoặc trao đổi cation (như cột axit polyaspartic), sắc ký điểm đẳng điện, SDS-PAGE, và kết tủa amoni sulfat cũng là có sẵn tùy thuộc vào kháng thể cần được phục hồi.

Sau (các) bước tinh chế sơ bộ bất kỳ, hỗn hợp gồm kháng thể cần quan tâm và tạp chất có thể được đưa vào sắc ký tương tác kỵ nước pH thấp sử dụng đệm rửa giải ở pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, tốt hơn nếu được tiến hành tại nồng độ muối thấp (ví dụ, từ khoảng 0 đến 0,25M muối).

Thể liên hợp miễn dịch

Sáng chế còn đề xuất các thể liên hợp miễn dịch (còn được gọi khác là “thể liên hợp kháng thể-thuốc” hoặc “ADC”), bao gồm kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng FGFR3 nêu trong bản mô tả này được liên hợp với chất gây độc tế bào như chất hóa trị liệu, thuốc, chất ức chế sự phát triển, độc tố (ví dụ, độc tố hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng), hoặc chất đồng vị phóng xạ (tức là, thể liên hợp phóng xạ).

Việc sử dụng thể liên hợp kháng thể-thuốc để phân phối khu trú chất gây độc tế bào hoặc chất kìm hãm tế bào, tức là, thuốc để tiêu diệt hoặc ức chế tế bào khối u trong điều trị ung thư (Syrgos và Epenetos (1999) *AntiCancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz và Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; Patent Mỹ số 4,975,278) cho phép phân phối gắn đích gốc được chất đến khối u, và tích lũy nội bào trong đó, trong đó việc sử dụng toàn thân các dược chất chưa được liên hợp có thể dẫn đến mức độc tính không chấp nhận được đối với tế bào bình thường cũng như tế bào khối u cần được loại bỏ (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,” trong *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506). Hiệu quả tối đa với độc tính tối thiểu nhờ đó đạt được. Cả kháng thể đa dòng và kháng thể đơn dòng đã được báo cáo là hữu dụng trong các chiến lược này (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Thuốc được sử dụng trong các phương pháp này bao gồm daunomycin, doxorubicin, methotrexate, và vindesine (Rowland et al., (1986) *supra*). Các độc tố được sử dụng trong thể liên hợp kháng thể-độc tố bao gồm các độc tố vi khuẩn như độc tố bạch hầu, độc tố thực vật như ricin, độc tố phân tử nhỏ như geldanamycin (Mandler et al (2000) *Jour. of Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maytansinoid (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), và calicheamicin (Lode et al., (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al., (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Các độc tố này có thể gây ra tác dụng gây độc tế bào và kìm hãm tế bào của chúng bằng cơ chế bao gồm liên kết tubulin, liên kết ADN, hoặc ức chế topoisomeraza. Một số thuốc gây độc tế bào có xu hướng không có hoạt tính hoặc ít hoạt tính hơn khi đã được liên hợp với các kháng thể lớn hoặc phối tử thụ thể protein.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) là thể liên hợp kháng thể-chất đồng vị phóng xạ chứa kháng thể đơn dòng kappa IgG1 của chuột kháng kháng nguyên CD20 được tìm thấy trên bề mặt của các tế bào lympho B bình thường và tế bào lympho B ác tính và chất đồng vị phóng xạ ^{111}In hoặc ^{90}Y được liên kết bởi chất liên kết thioure – chất tạo chelat (Wiseman et al., (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al., (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al., (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Mặc dù ZEVALIN có hoạt tính kháng u lympho Hodgkin không phải tế bào B (NHL), việc sử dụng dẫn đến chứng giảm tế bào máu nghiêm trọng và kéo dài ở hầu hết các bệnh nhân. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), thể liên hợp kháng thể được chất bao gồm kháng thể hu CD33 được liên kết với calicheamicin, được chấp thuận vào năm 2000 để điều trị bệnh bạch cầu tủy cấp tính bằng cách tiêm (Drug of Future (2000) 25(7):686; Patent Mỹ số 4,970,198; 5,079,233; 5,585,089; 5,606,040; 5,6937,62; 5,739,116; 5,767,285; 5,773,001). Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.), thể liên hợp kháng thể được chất chứa kháng thể huC242 được liên kết qua cầu nối disulfua SPP với gốc được chất maytansinoid, DM1, đang được đưa vào các thử nghiệm lâm sàng pha II để điều trị các bệnh ung thư mà biểu hiện CanAg, như ruột kết, tụy, dạ dày, và các bệnh ung thư khác. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), thể liên hợp kháng thể được chất chứa kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên màng đặc hiệu tuyến tiền liệt (PSMA) được liên kết với gốc được chất maytansinoid, DM1, đang được phát triển để điều trị tiềm năng khối u tuyến tiền liệt. Peptit auristatin, auristatin E (AE) và monomethylauristatin (MMAE), chất tương tự dolastatin tổng hợp, được liên hợp với các kháng thể đơn dòng kháng cBR96 (đặc hiệu với Lewis Y trên caxinom) và cAC10 (đặc hiệu với CD30 trên bệnh lý huyết học ác tính) (Doronina et al., (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) và đang được phát triển cho mục đích điều trị.

Chất hóa trị liệu hữu dụng để tạo ra các thể liên hợp miễn dịch được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, ở trên). Các độc tố có hoạt tính enzym và các phân đoạn của chúng mà có thể được sử dụng bao gồm độc tố chuỗi A bạch hầu, các phân đoạn có hoạt tính không liên kết của độc tố bạch hầu, ngoại độc tố chuỗi A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), rixin chuỗi A, abrin chuỗi A, modeccin chuỗi A, alpha-sarcin, protein *Aleurites fordii*, protein dianthin, protein *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế

momordica charantia, curcin, crotin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, và tricothecene. Xem, ví dụ, WO 93/21232 được công bố ngày 28/10/1993. Nhiều nuclit phóng xạ là có sẵn để sản xuất các kháng thể liên hợp phóng xạ. Ví dụ bao gồm ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , và ^{186}Re . Các thể liên hợp của kháng thể và chất gây độc tế bào được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều chất tạo cặp protein hai chức như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionat (SPDP), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), este hoạt tính (như disuxinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và hợp chất flo hoạt tính kép (như 1,5-điflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được nêu trong Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic được đánh dấu cacbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat điển hình để liên hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể. Xem WO94/11026.

Các thể liên hợp của kháng thể và một hoặc nhiều độc tố phân tử nhỏ, như calicheamicin, maytansinoid, dolastatin, aurostatin, tricothecene, và CC1065, và dẫn xuất của các độc tố này mà có hoạt tính gây độc, cũng được đề xuất trong bản mô tả.

i. Maytansine và maytansinoid

Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể (có chiều dài đầy đủ hoặc các đoạn) theo sáng chế được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử maytansinoid.

Maytansinoid là chất ức chế sự phân bào có cơ sở mà tác dụng bằng cách ức chế quá trình polyme hóa tubulin. Maytansine được phân lập đầu tiên từ cây bụi Đông Phi *Maytenus serrata* (Patent Mỹ số 3,896,111). Sau đó, phát hiện ra rằng một số vi khuẩn cũng sản xuất maytansinoid, như maytansinol và C-3 maytansinol este (Patent Mỹ số 4,151,042). Maytansinol tổng hợp và dẫn xuất và chất tương tự của chúng được nêu, ví dụ, trong Patent Mỹ số 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; và 4,371,533.

Các gốc dược chất maytansinoid là các gốc dược chất hấp dẫn trong số các thể liên hợp kháng thể dược chất vì chúng: (i) khá dễ để điều chế bằng cách lên men hoặc

biến đổi hóa học, tạo dẫn xuất của sản phẩm lên men, (ii) dễ dàng tạo dẫn xuất với nhóm chức thích hợp để liên hợp qua cầu nối không disulfua với các kháng thể, (iii) ổn định trong huyết tương, và (iv) có tác dụng kháng nhiều dòng tế bào khối u.

Các thể liên hợp miễn dịch chứa maytansinoid, phương pháp sản xuất chúng, và sử dụng chúng để điều trị được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 5,208,020, 5,416,064 và Patent châu Âu 0 425 235 B1. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) mô tả các thể liên hợp miễn dịch chứa maytansinoid được ký hiệu là DM1 được liên kết với kháng thể đơn dòng C242 kháng bệnh ung thư đại trực tràng ở người. Thể liên hợp được phát hiện ra là gây độc tế bào cao đối với tế bào ung thư ruột kết được nuôi cấy, và thể hiện hoạt tính kháng khối u trong thử nghiệm phát triển khối u *in vivo*. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) mô tả các thể liên hợp miễn dịch trong đó maytansinoid được liên hợp qua cầu nối disulfua với kháng thể A7 ở chuột liên kết với kháng nguyên trên dòng tế bào ung thư ruột kết ở người, hoặc với kháng thể đơn dòng TA.1 ở chuột khác mà liên kết HER-2/gen ung thư vú. Tác dụng gây độc tế bào của thể liên hợp TA.1-maytansinoid được kiểm tra *in vitro* trên dòng tế bào ung thư vú người SK-BR-3, mà biểu hiện 3×10^5 kháng nguyên bề mặt HER-2 cho mỗi tế bào. Thể liên hợp được chất thu được mức tác dụng gây độc tế bào tương tự với được chất maytansinoid tự do, mà có thể được làm tăng bằng cách làm tăng số lượng phân tử maytansinoid cho mỗi phân tử kháng thể. Thể liên hợp A7-maytansinoid thể hiện tác dụng gây độc tế bào toàn thân thấp ở các con chuột.

Thể liên hợp kháng thể-maytansinoid được điều chế bằng cách liên kết hóa học kháng thể với phân tử maytansinoid mà không làm giảm đáng kể hoạt tính sinh học của kháng thể hoặc phân tử maytansinoid. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,208,020. Trung bình từ 3 đến 4 phân tử maytansinoid được liên hợp cho mỗi phân tử kháng thể thể hiện hiệu quả trong việc làm tăng tác dụng gây độc tế bào của tế bào đích mà không gây ảnh hưởng bất lợi đến chức năng hoặc độ tan của kháng thể, mặc dù ngay cả một phân tử độc tố/kháng thể sẽ được mong đợi là làm tăng tác dụng gây độc tế bào so với sử dụng kháng thể trần. Các maytansinoid là đã biết trong lĩnh vực và có thể được tổng hợp bằng các kỹ thuật đã biết hoặc được phân lập từ nguồn tự nhiên. Maytansinoid thích hợp được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 5,208,020 và trong các patent và các công bố không phải patent khác được đề cập đến trong bản mô tả. Các maytansinoid được ưu tiên, maytansinol và

chất tương tự maytansinol được biến đổi ở vòng thơm hoặc ở các vị trí khác của phân tử maytansinol, như các maytansinol este khác.

Có nhiều nhóm liên kết đã biết trong lĩnh vực để sản xuất thể liên hợp kháng thể-maytansinoid, bao gồm, ví dụ, các nhóm được nêu trong Patent Mỹ số 5,208,020 hoặc Patent châu Âu 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), và đơn Sáng chế Mỹ số 10/960,602, nộp ngày 8/10/2004. Thể liên hợp kháng thể-maytansinoid chứa thành phần cầu nối SMCC có thể được điều chế như được nêu trong đơn Sáng chế Mỹ số 10/960,602, nộp ngày 8/10/2004. Nhóm cầu nối bao gồm nhóm disulfua, nhóm thioete, nhóm không bền với axit, nhóm nhạy với ánh sáng, nhóm không bền với peptidaza, hoặc nhóm không bền với esteraza, như được mô tả trong các patent được xác định ở trên, các nhóm disulfua và nhóm thioete được ưu tiên hơn. Nhóm cầu nối khác được nêu và được lấy ví dụ trong bản mô tả.

Các thể liên hợp của kháng thể và maytansinoid có thể được sản xuất bằng cách sử dụng nhiều chất tạo cặp protein hai chức như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức của imidoeste (như đimetyl adipimidat HCl), este hoạt tính (như đisuxinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và hợp chất flo hoạt tính kép (như 1,5-điflo-2,4-dinitrobenzen). Chất tạo cặp được đặc biệt ưu tiên bao gồm N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) và N-suxinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoat (SPP) để tạo ra cầu nối disulfua.

Chất cầu nối có thể gắn vào phân tử maytansinoid ở nhiều vị trí khác nhau, tùy thuộc vào kiểu cầu nối. Ví dụ, cầu nối este có thể được tạo thành bằng phản ứng với nhóm hydrohydroxyl sử dụng các kỹ thuật tạo cặp thông thường. Phản ứng có thể xảy ra ở vị trí C-3 có nhóm hydrohydroxyl, vị trí C-14 được biến đổi với hydroxymetyl, vị trí C-15 được biến đổi với nhóm hydrohydroxyl, và vị trí C-20 có nhóm hydrohydroxyl. Theo phương án ưu tiên, cầu nối được tạo thành ở vị trí C-3 của maytansinol hoặc chất tương tự maytansinol.

ii. *Auristatin và dolastatin*

Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể theo sáng chế đã liên hợp với dolastatin hoặc chất tương tự dolastatin chứa peptit và dẫn xuất, auristatin (Patent Mỹ số 5,635,483 và 5,780,588). Dolastatin và auristatin đã được chỉ ra là cản trở động học vi ống, sự thủy phân GTP, và phân chia nhân và tế bào (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents và Chemother.* 45(12):3580-3584) và có hoạt tính kháng ung thư (Patent Mỹ số 5,663,149) và kháng nấm (Pettit et al., (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). Gốc dược chất dolastatin hoặc auristatin có thể được gắn vào kháng thể qua đầu cùng N (amino) hoặc đầu cùng C (carboxyl) của gốc dược chất chứa peptit (WO 02/088172).

Các phương án về auristatin điển hình bao gồm các gốc dược chất monomethylauristatin DE và DF được liên kết đầu cùng N, được nêu trong “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands”, nộp ngày 5/11/2004.

Thông thường, các gốc dược chất dựa trên peptit có thể được điều chế bằng cách tạo thành liên kết peptit giữa hai hoặc nhiều axit amin và/hoặc các đoạn peptit. Các liên kết peptit này có thể được điều chế, ví dụ, theo phương pháp tổng hợp pha lỏng (xem E. Schröder và K. Lübke, “The Peptide,” quyển 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press) mà là đã biết trong lĩnh vực hóa học peptit. Các gốc dược chất auristatin/dolastatin có thể được điều chế theo phương pháp của: Patent Mỹ số 5,635,483 và 5,780,588; Pettit et al., (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al., (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al., *Synthesis*, 1996, 719-725; và Pettit et al., (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863. Xem thêm Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784; “Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands,” đơn Mỹ số 10/983,340, nộp ngày 5/11/2004 (bộc lộ, ví dụ, cầu nối và phương pháp điều chế hợp chất monomethylvalin như MMAE và MMAF đã liên hợp với cầu nối).

iii. Calicheamicin

Theo các phương án khác, thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể theo sáng chế được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử calicheamicin. Họ calicheamicin gồm các kháng sinh có khả năng sản sinh các đoạn đứt ADN sợi kép ở các nồng độ dưới picomol. Để điều chế các thể liên hợp của họ calicheamicin, xem Patent Mỹ số 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, và 5,877,296 (tất cả của American Cyanamid Company). Các chất tương tự cấu trúc của calicheamicin có thể

được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-axetyl- γ_1^I , PSAG và θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) và các patent Mỹ đã nêu ở trên của American Cyanamid). Dược chất chống khối u khác mà kháng thể có thể được liên hợp là QFA mà là antifolat. Cả calicheamicin và QFA đều có vị trí tác dụng nội bào và không dễ dàng xuyên qua màng huyết tương. Do đó, sự hấp thụ tế bào của các chất này nhờ nội bào hóa qua trung gian kháng thể làm tăng đáng kể tác dụng gây độc tế bào của chúng.

iv. Chất gây độc tế bào khác

Các chất kháng khối u khác mà có thể đã được tiếp hợp với các kháng thể theo sáng chế bao gồm BCNU, streptozocin, vincristine và 5-fluorouraxil, họ các chất này đã biết chung là phức hợp LL-E33288 được mô tả trong Patent Mỹ số 5,053,394 và 5,770,710, cũng như esperamicin (Patent Mỹ số 5,877,296).

Các độc tố hoạt tính enzym và các đoạn của chúng mà có thể được sử dụng bao gồm chuỗi A bạch hầu, các phân đoạn hoạt tính không liên kết của độc tố bạch hầu, ngoại độc tố chuỗi A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), rixin chuỗi A, abrin chuỗi A, modeccin chuỗi A, alpha-sarcin, protein Aleurites fordii, protein dianthin, protein *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curcin, crotin, chất ức chế saponaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin và tricothecene. Xem, ví dụ, WO 93/21232 công bố ngày 28/10/1993.

Sáng chế còn đề xuất thể liên hợp miễn dịch được tạo thành giữa kháng thể và hợp chất có hoạt tính gây tan nhân (ví dụ, ribonucleaza hoặc ADN endonucleaza như deoxyribonucleaza; DNaza).

Để phá hủy chọn lọc khối u, kháng thể có thể chứa nguyên tử có hoạt tính phóng xạ cao. Nhiều chất đồng vị phóng xạ là có sẵn để sản xuất các kháng thể liên hợp phóng xạ. Ví dụ bao gồm At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} và chất đồng vị hoạt tính phóng xạ chứa Lu. Khi thể liên hợp được sử dụng để phát hiện, nó có thể chứa nguyên tử hoạt tính phóng xạ cho các nghiên cứu ghi biểu đồ nhấp nháy, ví dụ ^{99m}Tc hoặc I^{123} , hoặc nhãn quay cho phương pháp chụp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn được biết là chụp cộng hưởng từ, mri), như iot-123, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nito-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Nhãn phóng xạ hoặc các nhãn khác có thể được kết hợp trong thể liên hợp theo cách đã biết. Ví dụ, peptit có thể được sinh tổng hợp hoặc có thể được tổng hợp bằng cách tổng hợp axit amin hóa học sử dụng tiền chất axit amin thích hợp bao gồm, ví dụ, flo-19 thay cho hydro. Các nhãn như ^{99m}Tc hoặc I^{123} , Re^{186} , Re^{188} và In^{111} có thể nối qua gốc cystein trong peptit. Ytri-90 có thể được nối qua gốc lysin. Phương pháp IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) có thể được sử dụng để kết hợp iot-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) mô tả chi tiết các phương pháp khác.

Các thể liên hợp của kháng thể và chất gây độc tế bào có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều chất tạo cặp protein hai chức như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), este hoạt tính (như disuxinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và hợp chất flo hoạt tính kép (như 1,5-diflo-2,4-đinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được mô tả trong Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic (MX-DTPA) được đánh dấu cacbon-14 là chất tạo chelat điển hình để liên hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể. Xem WO94/11026. Cầu nối có thể là "cầu nối cắt được" tạo thuận lợi để giải phóng dược chất gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, cầu nối không bền với axit, cầu nối không bền với peptidaza, cầu nối không bền với ánh sáng, cầu nối dimetyl hoặc cầu nối chứa disulfua (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); Patent Mỹ số 5,208,020) có thể được sử dụng.

Hợp chất theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ADC được điều chế bằng chất phản ứng liên kết ngang: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfone)benzoate) mà đã có trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Xem các trang 467-498, 2003-2004 Applications Handbook và Catalog.

v. Điều chế các thể liên hợp kháng thể dược chất

Trong các thể liên hợp kháng thể dược chất (ADC) theo sáng chế, kháng thể (Ab) được liên hợp với một hoặc nhiều gốc dược chất (D), ví dụ khoảng từ 1 đến 20 gốc dược chất cho mỗi kháng thể, qua cầu nối (L). ADC có công thức I có thể được điều chế bằng một vài con đường, sử dụng phản ứng hóa học hữu cơ, các điều kiện, và chất phản ứng đã biết với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực, bao gồm: (1) phản ứng của nhóm ái nhân của kháng thể với chất phản ứng liên kết hóa trị hai, để tạo thành Ab-L, qua liên kết cộng hóa trị, sau đó là phản ứng với gốc dược chất D; và (2) phản ứng của nhóm ái nhân của gốc dược chất với chất phản ứng liên kết hóa trị hai, để tạo thành D-L, qua liên kết cộng hóa trị, sau đó là phản ứng với nhóm ái nhân của kháng thể. Phương pháp khác để điều chế ADC được nêu trong bản mô tả này.



Cầu nối có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần cầu nối. Thành phần cầu nối điển hình bao gồm 6-maleimidocaproyl ("MC"), maleimidopropanoyl ("MP"), valin-citrullin ("val-cit"), alanin-phenylalanin ("ala-phe"), p-aminobenzyloxycarbonyl ("PAB"), N-suxinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoat ("SPP"), N-suxinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) xyclohexan-1 carboxylat ("SMCC"), và N-suxinimidyl (4-iodo-axetyl) aminobenzoat ("SIAB"). Thành phần cầu nối khác là đã biết trong lĩnh vực và một số thành phần này được nêu trong bản mô tả này. Xem thêm "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", nộp ngày 5/11/2004.

Theo một số phương án, cầu nối có thể chứa các gốc axit amin. Thành phần cầu nối axit amin điển hình bao gồm dipeptit, tripeptit, tetrapeptit hoặc pentapeptit. Ví dụ về dipeptit bao gồm: valin-citrullin (vc hoặc val-cit), alanin-phenylalanin (af hoặc ala-phe). Ví dụ về tripeptit gồm: glyxin-valin-citrullin (gly-val-cit) và glyxin-glyxin-glyxin (gly-gly-gly). Các gốc axit amin mà chứa thành phần cầu nối axit amin bao gồm các gốc có trong tự nhiên, cũng như các axit amin không quan trọng và các chất tương tự axit amin không có trong tự nhiên, như citrullin. Thành phần cầu nối axit amin có thể được thiết kế và tối ưu hóa ở tính chọn lọc của chúng để phân cắt được bằng enzym bởi các enzym cụ thể, ví dụ, proteaza liên kết khối u, cathepsin B, C và D, hoặc proteaza plasmin.

Nhóm ái nhân trên các kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở: (i) nhóm amin đầu cùng N, (ii) nhóm amin chuỗi bên, ví dụ lysin, (iii) nhóm thiol chuỗi bên, ví dụ cystein, và (iv) nhóm hydrohydroxyl đường hoặc nhóm amino trong đó kháng thể được glycosyl hóa. Nhóm amin, thiol, và hydrohydroxyl là ái nhân và có khả năng phản ứng để

tạo thành liên kết cộng hóa trị với nhóm ái điện tử trên các gốc cầu nối và chất phản ứng liên kết bao gồm: (i) este hoạt tính như NHS este, HOBt este, haloformat, và axit halogenua; (ii) alkyl và benzyl halogenua như haloaxetamit; (iii) nhóm aldehyt, keton, carboxyl, và maleimit. Một số kháng thể có các disulfua liên chuỗi khử được, tức là cầu xystein. Các kháng thể có thể được làm cho có khả năng liên hợp với chất phản ứng liên kết bằng cách xử lý với chất khử như DTT (dithiothreitol). Mỗi cầu xystein do đó sẽ tạo thành, về lý thuyết, hai nhóm ái nhân thiol có tính phản ứng. Các nhóm ái nhân khác có thể được đưa vào các kháng thể nhờ phản ứng của lysin với 2-iminothiolan (chất phản ứng Traut's) dẫn đến sự chuyển hóa amin thành thiol. Nhóm thiol phản ứng có thể được đưa vào kháng thể bằng cách đưa vào, hai, ba, bốn, hoặc nhiều gốc xystein (ví dụ, tạo ra kháng thể đột biến gồm một hoặc nhiều gốc axit amin xystein không tự nhiên).

Các thể liên hợp kháng thể được chất theo sáng chế còn có thể được tạo ra bằng cách biến đổi kháng thể để đưa vào các gốc ái điện tử, mà có thể phản ứng với nhóm ái nhân trên chất phản ứng liên kết hoặc dược chất. Đường của các kháng thể được glycosyl hóa có thể được oxy hóa, ví dụ, bằng chất phản ứng oxy hóa periodat, để tạo thành nhóm aldehyt hoặc keton mà có thể phản ứng với nhóm amin của chất phản ứng liên kết hoặc các gốc dược chất. Nhóm bazơ imin Schiff thu được có thể tạo thành cầu nối ổn định, hoặc có thể được khử, ví dụ, bằng chất phản ứng borohydrua để tạo thành cầu nối amin ổn định. Theo một phương án, phản ứng của phần hydrat cacbon của kháng thể được glycosyl hóa với glactoxa oxidaza hoặc natri meta-periodat có thể tạo ra nhóm cacbonyl (aldehyt và keton) trong protein mà có thể phản ứng với nhóm thích hợp trên dược chất (Hermanson, Bioconjugate Techniques). Theo phương án khác, protein chứa các gốc serin hoặc threonin đầu cùng N có thể phản ứng với natri meta-periodat, dẫn đến việc sản sinh aldehyt ở vị trí của axit amin thứ nhất (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; Patent Mỹ số 5,362,852). Aldehyt này có thể được phản ứng với gốc dược chất hoặc nhóm liên kết ái nhân.

Tương tự, nhóm ái nhân trên gốc dược chất bao gồm, nhưng không giới hạn ở: nhóm amin, thiol, hydrohydroxyl, hydrazua, oxim, hydrazin, thiosemicarbazon, hydrazin carboxylat, và arylhydrazit có khả năng phản ứng để tạo thành các liên kết cộng hóa trị với nhóm ái điện tử trên các gốc cầu nối và chất phản ứng liên kết bao gồm: (i) este hoạt tính như NHS este, HOBt este, haloformat, và axit halogenua; (ii) alkyl và benzyl halogenua như haloaxetamit; (iii) nhóm aldehyt, keton, carboxyl, và maleimit.

Theo cách khác, protein dung hợp chứa kháng thể và chất gây độc tế bào có thể được tạo ra, ví dụ, bằng kỹ thuật tái tổ hợp hoặc tổng hợp peptit. Chiều dài của ADN có thể chứa vùng tương ứng mã hóa cho hai phần của thể liên hợp nằm liền kề nhau hoặc được tách riêng bởi vùng mã hóa cho peptit cầu nối mà không phá vỡ các tính chất mong muốn của thể liên hợp.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể có thể được liên hợp với “thụ thể” (như streptavidin) để sử dụng trong việc gắn đích sơ bộ khối u trong đó thể liên hợp kháng thể-thụ thể được sử dụng cho cá thể, sau đó loại bỏ thể liên hợp chưa được liên kết khỏi vòng tuần hoàn bằng cách sử dụng chất thanh thải và sau đó sử dụng “phối tử” (ví dụ, avidin) mà đã được liên hợp với chất gây độc tế bào (ví dụ, nucleotit phóng xạ).

Phương pháp sử dụng các kháng thể kháng FGFR3

Sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể FGFR3 làm một phần của phác đồ điều trị cụ thể nhằm đích để gây ra tác dụng có lợi từ hoạt tính của dược chất này. Sáng chế đặc biệt hữu dụng để điều trị bệnh ung thư bao gồm các loại khác nhau ở các giai đoạn khác nhau.

Thuật ngữ ung thư bao gồm tập hợp các rối loạn tăng sinh, bao gồm nhưng không giới hạn ở sự phát triển tiền ung thư, khối u lành tính, và khối u ác tính. Khối u lành tính vẫn được khu trú ở vị trí ban đầu và không có khả năng thâm, xâm nhập, hoặc di căn đến vị trí xa. Khối u ác tính sẽ xâm nhập và hủy hoại các mô khác xung quanh chúng. Chúng còn có thể đạt được khả năng thoát ra khỏi vị trí ban đầu và lan tới các phần khác của cơ thể (di căn), thường qua dòng máu hoặc qua hệ lympho mà các hạch lympho nằm trong đó. Khối u nguyên phát được phân loại theo loại mô từ đó chúng xuất hiện; khối u di căn được phân loại theo kiểu mô mà từ đó thu được tế bào ung thư. Theo thời gian, tế bào của khối u ác tính trở nên bất thường hơn và có vẻ ít giống với tế bào bình thường hơn. Sự thay đổi bề ngoài này của tế bào ung thư được gọi là cấp độ khối u, và tế bào ung thư được mô tả là được biệt hóa rõ (cấp thấp), biệt hóa vừa, biệt hóa thấp, hoặc không được biệt hóa (cấp cao). Tế bào được biệt hóa rõ xuất hiện khá bình thường và giống tế bào bình thường mà chúng có nguồn gốc từ đó. Các tế bào không được biệt hóa là các tế bào đã trở nên quá bất thường đến mức không thể xác định được nguồn gốc của các tế bào này.

Hệ thống chia giai đoạn ung thư mô tả ung thư đã lan tràn đến mức nào về mặt giải phẫu và cố gắng để xếp các bệnh nhân có chẩn đoán và điều trị tương tự vào cùng

một nhóm chia giai đoạn. Một vài xét nghiệm có thể được tiến hành để giúp chia giai đoạn ung thư bao gồm các xét nghiệm sinh thiết và chụp chiếu như X quang vùng ngực, nhũ ảnh, quét xương, quét CT, và quét MRI. Xét nghiệm máu và đánh giá lâm sàng còn được sử dụng để đánh giá sức khỏe toàn diện của bệnh nhân và phát hiện xem ung thư có lan tới các cơ quan nhất định hay không.

Để phân giai đoạn ung thư, Ủy ban phối hợp về ung thư Hoa Kỳ (American Joint Committee on Cancer) đầu tiên đặt ung thư, cụ thể là các khối u rắn, vào hệ phân loại theo chữ cái sử dụng hệ phân loại TNM. Bệnh ung thư được ký hiệu bằng chữ cái T (kích thước khối u), N (hạch có thể sờ được), và/hoặc M (di căn). T1, T2, T3, và T4 mô tả kích thước tăng dần của tổn thương nguyên phát; N0, N1, N2, N3 chỉ sự tham gia của hạch ngày càng tăng; và M0 và M1 phản ánh sự vắng mặt hoặc có mặt các bệnh di căn ở xa.

Trong phương pháp chia giai đoạn thứ hai, còn được biết là Phân nhóm giai đoạn chung (Overall Stage Grouping) hoặc chia giai đoạn theo số La mã (Roman Numeral Staging), bệnh ung thư được chia thành các giai đoạn từ 0 đến IV, kết hợp kích thước của thương tổn nguyên phát cũng như sự có mặt của sự lan hạch và di căn ở xa. Trong hệ thống này, các trường hợp được nhóm lại thành bốn giai đoạn được biểu thị bằng số La mã từ I đến IV, hoặc được phân loại là “tái phát”. Với một số bệnh ung thư, giai đoạn 0 được gọi là “tại chỗ” hoặc “Tis,” như caxinom ống mật tại chỗ hoặc caxinom nhiều thùy nhỏ tại chỗ với ung thư vú. U tuyến cấp độ cao còn có thể được phân loại là giai đoạn 0. Nhìn chung, ung thư giai đoạn I là ung thư được khoanh vùng nhỏ mà thường có thể chữa khỏi, trong khi đó giai đoạn IV thường thể hiện bệnh ung thư không mổ được hoặc là ung thư di căn. Ung thư giai đoạn II và III thường tiến triển tại chỗ và/hoặc thể hiện sự liên quan đến hạch lympho tại chỗ. Nhìn chung, số của giai đoạn càng cao thể hiện bệnh càng mở rộng hơn, bao gồm kích thước khối u lớn hơn và/hoặc sự lan rộng của ung thư đến các hạch lympho gần đó và/hoặc cơ quan nằm liền kề với khối u nguyên phát. Các giai đoạn này được xác định một cách chính xác, nhưng định nghĩa này là khác với mỗi loại ung thư và là đã biết với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực.

Nhiều cơ quan đăng ký ung thư, như NCI’s Surveillance, Epidemiology, và End Results Program (SEER), sử dụng phương pháp phân giai đoạn sơ lược. Hệ thống này được sử dụng cho tất cả các loại ung thư. Nó nhóm các ca bệnh ung thư thành năm nhóm chính:

Tại chỗ là ung thư giai đoạn đầu chỉ có mặt trong lớp tế bào trong đó nó bắt đầu.

Được khoanh vùng là ung thư được giới hạn trong cơ quan trong đó nó bắt đầu, mà không có dấu hiệu lan ra.

Có tính chất vùng là ung thư lan ra xa vị trí ban đầu (nguyên phát) đến các hạch lympho hoặc cơ quan và mô gần đó.

Có tính chất xa là ung thư lan từ vị trí nguyên phát đến cơ quan ở xa hoặc hạch lympho ở xa.

Không xác định được dùng để mô tả trường hợp không có đủ thông tin để chỉ ra giai đoạn.

Ngoài ra, phổ biến là bệnh ung thư quay trở lại nhiều tháng hoặc nhiều năm sau khi khối u nguyên phát đã được loại bỏ. Ung thư mà xuất hiện lại sau khi toàn bộ khối u nhìn thấy đã được trừ diệt, được gọi là bệnh tái phát. Bệnh mà xuất hiện lại trong vùng khối u nguyên phát là bệnh tái phát tại chỗ, và bệnh mà xuất hiện lại dưới dạng di căn được gọi là bệnh tái phát xa.

Khối u có thể là khối u rắn hoặc khối u mô không rắn hoặc mềm. Ví dụ về khối u mô mềm bao gồm bệnh bạch cầu (ví dụ, bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính ở người lớn, bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính tế bào B trưởng thành, bệnh bạch cầu lympho bào mãn tính, bệnh bạch cầu tiền lympho, hoặc bệnh bạch cầu tế bào tủy) hoặc u bạch huyết (ví dụ, u bạch huyết không Hodgkin, u bạch huyết tế bào T ở da, hoặc bệnh Hodgkin). Khối u rắn bao gồm bệnh ung thư bất kỳ của mô cơ thể ngoài máu, tủy xương, hoặc hệ lympho. Các khối u rắn có thể còn được chia tiếp thành khối u có nguồn gốc tế bào biểu mô và khối u có nguồn gốc không phải tế bào biểu mô. Ví dụ về các khối u rắn tế bào biểu mô bao gồm khối u đường tiêu hóa, ruột kết, vú, tuyến tiền liệt, phổi, thận, gan, tụy, buồng trứng, đầu và cổ, khoang miệng, dạ dày, tá tràng, ruột non, ruột già, hậu môn, túi mật, mô dưới, mũi hầu, da, tử cung, cơ quan sinh dục nam, cơ quan đường tiết niệu, bàng quang, và da. Các khối u rắn có nguồn gốc không phải biểu mô gồm sarcoma, khối u não, và khối u xương. Các ví dụ khác về khối u được mô tả trong phần định nghĩa.

Theo một số phương án, bệnh nhân ở đây được đưa đi làm các xét nghiệm chẩn đoán ví dụ, trước và/hoặc trong và/hoặc sau khi điều trị. Thông thường, xét nghiệm chẩn đoán được thực hiện, mẫu có thể thu được từ bệnh nhân cần điều trị. Với đối tượng bị

ung thư, mẫu này có thể là mẫu khối u, hoặc mẫu sinh học khác, như dịch sinh học, bao gồm, nhưng không giới hạn, máu, nước tiểu, nước bọt, dịch cổ trướng, hoặc dẫn xuất như huyết thanh máu và huyết tương máu, và dạng tương tự.

Mẫu sinh học trong bản mô tả có thể là mẫu được cố định, *ví dụ* mẫu được cố định formalin, mẫu được nhúng paraffin (FFPE), hoặc mẫu đông lạnh.

Nhiều phương pháp khác nhau để xác định sự biểu hiện của mRNA hoặc protein bao gồm, nhưng không giới hạn ở, lập profil biểu hiện gen, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) bao gồm PCR thời gian thực định lượng (qRT-PCR), phân tích vi dây, phân tích tuần tự sự biểu hiện gen (SAGE), MassARRAY, phân tích sự biểu hiện gen bằng cách giải trình tự tín hiệu song song hàng loạt (Gene Expression Analysis by Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS)), phân tích proteomics, hóa mô miễn dịch (IHC), v.v. Tốt hơn nếu mRNA được định lượng. Phân tích mRNA tốt hơn nếu được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), hoặc bằng phân tích vi dây. Khi PCR được sử dụng, dạng được ưu tiên của PCR là PCR thời gian thực định lượng (qRT-PCR). Theo một phương án, sự biểu hiện một hoặc nhiều gen đã được lưu ý ở trên được cho là biểu hiện dương tính nếu nó ở mức trung bình hoặc ở trên, *ví dụ* so với các mẫu khác của cùng loại khối u. Mức biểu hiện trung bình có thể được xác định gần như là đồng thời với việc xác định sự biểu hiện gen, hoặc có thể đã được xác định trước đó.

Các bước của quy trình điển hình để lập profil biểu hiện gen sử dụng mô được nhúng paraffin, được cố định, làm nguồn ARN, bao gồm phân lập mRNA, tinh chế, kéo dài và khuếch đại đoạn mRNA được đưa ra trong các bài báo đã được công bố khác nhau (ví dụ: Godfrey *et al.* *J. Molec. Diagnostics* 2: 84-91 (2000); Specht *et al.*, *Am. J. Pathol.* 158: 419-29 (2001)). Một cách ngắn gọn, quy trình điển hình bắt đầu với việc cắt các phần dày khoảng 10 microgam của mẫu mô khối u được nhúng paraffin. Sau đó ARN được chiết, và protein và ADN được loại bỏ. Sau khi phân tích nồng độ ARN, bước sửa chữa và/hoặc khuếch đại ARN có thể được đưa vào, nếu cần, và ARN được phiên mã ngược sử dụng trình tự khởi động đặc hiệu gen sau đó là PCR. Cuối cùng, các số liệu được phân tích để xác định (các) lựa chọn điều trị tốt nhất sẵn có với bệnh nhân trên cơ sở mô hình biểu hiện gen đặc trưng được xác định trong mẫu khối u được xét nghiệm.

Việc phát hiện sự biểu hiện gen hoặc protein có thể được xác định trực tiếp hoặc gián tiếp.

Một người có thể xác định sự biểu hiện hoặc hoán vị hoặc khuếch đại FGFR3 trong bệnh ung thư (trực tiếp hoặc gián tiếp). Nhiều thử nghiệm chẩn đoán/tiên lượng là có sẵn cho việc xác định này. Theo một phương án, sự biểu hiện quá mức FGFR3 có thể được phân tích bằng IHC. Các phần cắt mô được nhúng parafin từ sinh thiết khối u có thể được đưa vào thử nghiệm IHC và làm cho phù hợp với tiêu chuẩn cường độ nhuộm protein FGFR3 như sau:

Điểm 0 không có sự bắt màu nào được quan sát thấy hoặc sự nhuộm màng được quan sát thấy trong ít hơn 10% tế bào khối u.

Điểm 1+ phát hiện được sự nhuộm màng có thể nhận thấy mờ/vừa đủ trong hơn 10% của tế bào khối u. Tế bào này chỉ được nhuộm ở một phần màng của chúng.

Điểm 2+ quan sát thấy sự nhuộm màng hoàn toàn từ mức độ nhẹ đến vừa phải ở hơn 10% tế bào khối u.

Điểm 3+ quan sát thấy sự nhuộm màng hoàn toàn từ mức độ vừa phải đến mạnh ở hơn 10% tế bào khối u.

Theo một số phương án, các khối u có điểm 0 hoặc 1+ đối với phương pháp đánh giá sự biểu hiện quá mức FGFR3 có thể được xác định là không biểu hiện quá mức FGFR3, trong khi đó các khối u có điểm 2+ hoặc 3+ có thể được xác định là biểu hiện quá mức FGFR3.

Theo một số phương án, khối u biểu hiện quá mức FGFR3 có thể được đánh giá bằng điểm hóa mô miễn dịch tương ứng với số lượng bản sao phân tử FGFR3 được biểu hiện cho mỗi tế bào, và có thể được xác định bằng phương pháp hóa sinh:

0 = 0-90 bản sao/tế bào,

1+ = ít nhất khoảng 100 bản sao /tế bào,

2+ = ít nhất khoảng 1000 bản sao /tế bào,

3+ = ít nhất khoảng 10 000 bản sao /tế bào.

Theo cách khác, hoặc ngoài ra, thử nghiệm FISH có thể được tiến hành trên mô khối u được nhúng parafin, được cố định formalin để xác định sự có mặt và/hoặc mức độ (nếu có) của sự khuếch đại hoặc hoán vị FGFR3 trong khối u.

Sự hoạt hóa FGFR3 có thể được xác định trực tiếp (ví dụ, bằng thử nghiệm phospho-ELISA, hoặc các phương pháp khác để phát hiện thụ thể được phosphoryl hóa) hoặc gián tiếp (ví dụ, bằng cách phát hiện thành phần con đường dẫn truyền tín hiệu xuôi

dòng đã hoạt hóa, phát hiện dime thụ thể (ví dụ, homodime, heterodime), phát hiện profin biểu hiện gen và dạng tương tự.

Tương tự, FGFR3 cơ định và/hoặc FGFR3 độc lập phối tử hoặc phụ thuộc phối tử có thể được phát hiện trực tiếp hoặc gián tiếp (ví dụ, bằng cách phát hiện các đột biến thụ thể tương quan với hoạt tính cơ định, bằng cách phát hiện sự khuếch đại thụ thể tương quan với hoạt tính cơ định và tương tự).

Phương pháp để phát hiện các đột biến axit nucleic là đã biết trong lĩnh vực. Thông thường, mặc dù không nhất thiết, axit nucleic đích trong mẫu được khuếch đại để tạo ra lượng nguyên liệu mong muốn để xác định đột biến có mặt hay không. Kỹ thuật khuếch đại là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, sản phẩm được khuếch đại có thể có hoặc có thể không bao gồm toàn bộ các trình tự axit nucleic mã hóa protein cần quan tâm, miễn là sản phẩm được khuếch đại chứa vị trí trình tự axit amin/ axit nucleic cụ thể trong đó nghi ngờ có đột biến.

Theo một ví dụ, sự có mặt của đột biến có thể được xác định bằng cách cho axit nucleic từ mẫu tiếp xúc với đoạn dò axit nucleic có khả năng lai đặc hiệu với axit nucleic mã hóa cho axit nucleic đã được gây đột biến, và phát hiện sự lai. Theo một phương án, đoạn dò được đánh dấu phát hiện được, ví dụ bằng chất đồng vị phóng xạ (^3H , ^{32}P , ^{33}P v.v.), chất phát huỳnh quang (rôđamin, sự phát huỳnh quang v.v.) hoặc chất tạo màu. Theo một số phương án, đoạn dò là oligome đối nghĩa, ví dụ PNA, morpholino-phosphoramidat, LNA hoặc 2'-alkoxyalkoxy. Đoạn dò có thể nằm trong khoảng từ 8 nucleotit đến 100 nucleotit, hoặc khoảng từ 10 đến 75, hoặc khoảng từ 15 đến 50, hoặc khoảng từ 20 đến 30. Theo khía cạnh khác, đoạn dò axit nucleic theo sáng chế được tạo ra trong bộ kit để nhận diện các đột biến FGFR3 trong mẫu, kit này chứa oligonucleotit mà lai đặc hiệu với hoặc nằm liền kề với vị trí của đột biến trong axit nucleic mã hóa cho FGFR3. Bộ kit có thể còn chứa hướng dẫn sử dụng để điều trị cho bệnh nhân mang khối u mà chứa các đột biến FGFR3 có chất đối kháng FGFR3 dựa trên kết quả từ thử nghiệm lai sử dụng bộ kit.

Các đột biến còn có thể được phát hiện bằng cách so sánh sự dịch chuyển điện di của axit nucleic được khuếch đại với sự dịch chuyển điện di của axit nucleic tương ứng mã hóa cho FGFR3 kiểu dại. Khác biệt về sự dịch chuyển này chỉ ra sự có mặt của đột biến trong trình tự axit nucleic được khuếch đại. Sự dịch chuyển điện di có thể được xác định bằng kỹ thuật phân tách phân tử thích hợp bất kỳ, ví dụ trên gel polyacrylamit.

Axit nucleic còn có thể được phân tích để phát hiện các đột biến bằng cách sử dụng phương pháp phát hiện đột biến bằng enzym (Enzymatic Mutation Detection - EMD) (Del Tito et al, Clinical Chemistry 44:731-739, 1998). EMD sử dụng resolvaza T₄ endonucleaza VII thể thực khuẩn, mà quét dọc theo ADN sợi kép cho đến khi nó phát hiện và cắt đoạn biến dạng cấu trúc gây ra bởi sự bất cặp sai các cặp bazơ do các biến đổi axit nucleic như các đột biến điểm, các đột biến gắn xen và đột biến mất đoạn. Sự phát hiện hai đoạn ngắn được tạo thành bởi sự phân cắt resolvaza, ví dụ bằng điện di gel, chỉ ra sự có mặt của đột biến. Các lợi ích của phương pháp EMD là một quy trình duy nhất để nhận diện các đột biến điểm, các đột biến mất đoạn, và đột biến gắn xen được thử nghiệm trực tiếp từ phản ứng khuếch đại, loại trừ nhu cầu tinh chế mẫu, rút ngắn thời gian lai, và làm tăng tỷ lệ tín hiệu-độ nhiễu. Mẫu hỗn hợp chứa lượng dư đến 20 lần của axit nucleic bình thường và các đoạn có kích thước lên đến 4 kb có thể được thử nghiệm. Tuy nhiên, phương pháp quét EMD không nhận diện được các thay đổi bazơ cụ thể mà xuất hiện trong mẫu dương tính với đột biến, do đó thường cần các quy trình giải trình tự khác để nhận diện đột biến cụ thể nếu cần. Enzym CEL I có thể được sử dụng tương tự với resolvaza T₄ endonucleaza VII, như được chứng minh trong Patent Mỹ số 5,869,245.

Bộ kit đơn giản khác để phát hiện các đột biến là que thử lai ngược tương tự với Haemochromatosis StripAssay™ (Viennalabs <http://www.bamburghmarrsh.com/pdf/4220.pdf>) để phát hiện nhiều đột biến trong gen HFE, TFR2 và FPN1 gây rối loạn thừa sắt. Thử nghiệm này được dựa trên việc lai đặc hiệu trình tự sau khi khuếch đại bằng PCR. Đối với các thử nghiệm đột biến đơn, hệ thống phát hiện dựa trên đĩa giếng có thể được sử dụng, trong khi đó đối với các thử nghiệm nhiều đột biến, các que thử có thể được sử dụng làm “dây macro”. Bộ kit có thể bao gồm chất phản ứng sử dụng được ngay để chuẩn bị mẫu, khuếch đại và phát hiện đột biến. Các quy trình khuếch đại đa thành phần đem lại sự thuận tiện và cho phép kiểm tra mẫu có thể tích rất hạn chế. Bằng cách sử dụng dạng StripAssay đơn giản, kiểm tra 20 và nhiều đột biến có thể được hoàn thành trong ít hơn năm giờ mà không cần thiết bị đắt tiền. ADN được phân lập từ mẫu và axit nucleic đích được khuếch đại *in vitro* (ví dụ, bằng PCR) và được đánh dấu bằng biotin, thường là trong một phản ứng khuếch đại duy nhất (“nhiều thành phần”). Sản phẩm khuếch đại sau đó được lai chọn lọc với đoạn dò oligonucleotit (kiểu đại và đặc hiệu đột biến) được cố định trên nền rắn như que thử trong đó đoạn dò được cố định dưới dạng các đường hoặc dải song song. Các đơn vị sao chép

được biotin hóa đã liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng streptavidin- phosphatase kiềm và cơ chất màu. Thử nghiệm này có thể phát hiện tất cả hoặc nhóm con bất kỳ của các đột biến theo sáng chế. Về dải đoạn dò đột biến cụ thể, một trong số ba mô hình truyền tín hiệu có thể là: (i) dải chỉ cho đoạn dò kiểu đại mà chỉ ra trình tự axit nucleic bình thường, (ii) dải cho cả đoạn dò kiểu đại và đoạn dò đột biến mà chỉ ra kiểu gen dị hợp tử, và (iii) dải chỉ cho đoạn dò đột biến chỉ ra kiểu gen đột biến đồng hợp tử. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện các đột biến theo sáng chế bao gồm bước phân lập và/hoặc khuếch đại trình tự axit nucleic FGFR3 đích từ mẫu, sao cho sản phẩm khuếch đại chứa phối tử, cho sản phẩm khuếch đại tiếp xúc với đoạn dò chứa đối tác liên kết phát hiện được với phối tử này và đoạn dò có khả năng lai đặc hiệu với đột biến theo sáng chế, và sau đó phát hiện sự lai của đoạn dò với sản phẩm khuếch đại. Theo một phương án, phối tử là biotin và đối tác liên kết chứa avidin hoặc streptavidin. Theo một phương án, đối tác liên kết chứa streptavidin-kiềm mà phát hiện được bằng cơ chất màu. Theo một phương án, đoạn dò được cố định, ví dụ, trên que thử trong đó đoạn dò bổ sung cho các đột biến khác nhau được tách riêng khỏi nhau. Theo cách khác, axit nucleic được khuếch đại được đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ, trong trường hợp đó đoạn dò không cần chứa nhãn phát hiện được.

Các biến đổi của gen kiểu đại bao gồm tất cả các dạng của các đột biến như đột biến gắn xen, đảo ngược, đột biến mất đoạn, và/hoặc các đột biến điểm. Theo một phương án, các đột biến là đột biến soma. Các đột biến soma là các đột biến chỉ xuất hiện trong một số mô, ví dụ, trong mô khối u, và không được kế thừa trong dòng mầm. Các đột biến dòng mầm có thể được tìm thấy trong mô bất kỳ của cơ thể.

Mẫu chứa axit nucleic đích có thể thu được bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, và thích hợp cho loại và vị trí cụ thể của khối u. Phương pháp sinh thiết mô thường được sử dụng để thu được mẫu đại diện của mô khối u. Theo cách khác, tế bào khối u có thể thu được gián tiếp ở dạng của mô/dịch mà là đã biết hoặc được cho là chứa tế bào khối u cần quan tâm. Ví dụ, mẫu thương tổn ung thư phổi có thể thu được bằng cách cắt bỏ, soi phế quản, chọc hút bằng kim nhỏ, chải phế quản, hoặc từ nước bọt, dịch màng phổi hoặc máu. Gen đột biến hoặc sản phẩm gen có thể được phát hiện từ khối u hoặc từ mẫu cơ thể khác như nước tiểu, nước bọt hoặc huyết thanh. Các kỹ thuật tương tự được thảo luận trên đây để phát hiện gen đích đột biến hoặc sản phẩm gen trong mẫu khối u có thể được áp dụng cho các mẫu của cơ thể khác. Tế bào ung thư được bóc ra

khối khối u và xuất hiện trong các mẫu cơ thể này. Bằng cách sàng lọc các mẫu cơ thể này, chẩn đoán sớm đơn giản có thể đạt được đối với bệnh như ung thư. Ngoài ra, tiến triển của liệu pháp điều trị có thể được theo dõi dễ dàng bằng cách kiểm tra các mẫu cơ thể này đối với gen đích đột biến hoặc sản phẩm gen.

Phương pháp làm giàu chế phẩm mô đối với tế bào khối u là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, mô có thể được phân lập từ các lát cắt paraffin hoặc lát cắt đông lạnh. Tế bào ung thư còn có thể được tách ra khỏi tế bào bình thường bằng phương pháp đo tế bào theo dòng hoặc phương pháp vi phẫu bắt giữ laze. Các kỹ thuật này, cũng như các kỹ thuật khác để tách khối u ra khỏi tế bào bình thường, là đã biết trong lĩnh vực. Nếu mô khối u bị lẫn nhiều tế bào bình thường, việc phát hiện các đột biến có thể là khó hơn, mặc dù kỹ thuật để giảm thiểu sự nhiễm tạp và/hoặc kết quả dương tính/âm tính sai là đã biết, một số kỹ thuật đó được nêu trong bản mô tả dưới đây. Ví dụ, mẫu còn có thể được đánh giá về sự có mặt của chất đánh dấu sinh học (gồm đột biến) được biết là kết hợp với tế bào khối u cần quan tâm nhưng không phải tế bào bình thường tương ứng, hoặc ngược lại.

Việc phát hiện các đột biến điểm trong axit nucleic đích có thể được thực hiện bằng cách tách dòng phân tử các axit nucleic đích và giải trình tự các axit nucleic này bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực. Theo cách khác, các kỹ thuật khuếch đại như phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) có thể được sử dụng để khuếch đại trình tự axit nucleic đích trực tiếp từ chế phẩm ADN hệ gen từ mô khối u. Trình tự axit nucleic của trình tự khuếch đại sau đó có thể được xác định và các đột biến được nhận diện từ đó. Kỹ thuật khuếch đại là đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, phản ứng chuỗi polymeaza như được nêu trong Saiki et al., Science 239:487, 1988; Patent Mỹ số 4,683,203 và 4,683,195.

Cần lưu ý rằng việc thiết kế và lựa chọn các đoạn mồi thích hợp là kỹ thuật đã được xây dựng trong lĩnh vực.

Phản ứng chuỗi ligaza, mà đã biết trong lĩnh vực, còn có thể được sử dụng để khuếch đại trình tự axit nucleic đích. Xem, ví dụ, Wu et al., Genomes, Vol. 4, pp. 560-569 (1989). Ngoài ra, kỹ thuật được biết là PCR đặc hiệu alen cũng có thể được sử dụng. Xem, ví dụ, Ruano và Kidd, Nucleic Acids Research, Vol. 17, p. 8392, 1989. Theo kỹ thuật này, các đoạn mồi được sử dụng mà lai, ở đầu 3' của chúng, với đột biến axit nucleic đích cụ thể. Nếu đột biến cụ thể này không có mặt, sản phẩm khuếch đại không

được quan sát thấy. Hệ thống Amplification Refractory Mutation System (ARMS) cũng có thể được sử dụng, như được mô tả trong công bố đơn sáng chế châu Âu số 0332435, và trong Newton et al., *Nucleic Acids Research*, Vol. 17, p.7, 1989. Các đột biến gắn xen và đột biến mất đoạn của gen cũng có thể được phát hiện bằng cách tách dòng, giải trình tự và khuếch đại. Ngoài ra, đoạn dò đa hình có chiều dài đoạn giới hạn (RFLP) cho gen hoặc gen đánh dấu xung quanh có thể được sử dụng để tính điểm sự biến đổi alen hoặc đột biến gắn xen trong đoạn đa hình. Phân tích đa hình cấu hình sợi đơn (Single stranded conformation polymorphic - SSCP) còn có thể được sử dụng để phát hiện các biến thể thay đổi bazơ của alen. Xem, ví dụ Orita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 86, pp. 2766-2770, 1989, và *Genomics*, Vol. 5, pp. 874-879, 1989. Các kỹ thuật khác để phát hiện các đột biến gắn xen và các đột biến mất đoạn như đã biết trong lĩnh vực cũng có thể được sử dụng.

Sự biến đổi gen kiểu đại còn có thể được phát hiện trên cơ sở sự biến đổi sản phẩm biểu hiện kiểu đại của gen này. Sản phẩm biểu hiện này bao gồm cả mRNA cũng như sản phẩm protein. Các đột biến điểm có thể được phát hiện bằng cách khuếch đại và giải trình tự mRNA hoặc nhờ việc tách dòng phân tử cADN được tạo ra từ mRNA. Trình tự của cADN đã tách dòng có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật giải trình tự ADN đã biết trong lĩnh vực. cADN cũng có thể được giải trình tự thông qua phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).

Các bắt cặp sai là hai sợi axit nucleic lai mà không bổ sung 100%. Việc không có tính bổ sung toàn bộ có thể là do các đột biến mất đoạn, đột biến gắn xen, đảo, đột biến thể hoặc các đột biến dịch khung. Phương pháp phát hiện bắt cặp sai có thể được sử dụng để phát hiện các đột biến điểm trong axit nucleic đích. Mặc dù các kỹ thuật này có thể là ít nhạy hơn kỹ thuật giải trình tự, nhưng chúng đơn giản hơn để thực hiện trên số lượng lớn mẫu mô. Ví dụ về kỹ thuật cắt bắt cặp sai là phương pháp bảo vệ RNaza, mà được mô tả chi tiết trong Winter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 82, p. 7575, 1985, và Meyers et al., *Science*, Vol. 230, p. 1242, 1985. Ví dụ, phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm việc sử dụng đoạn dò ARN được đánh dấu mà là bổ sung với axit nucleic đích kiểu đại của người. Đoạn dò ARN và axit nucleic đích thu được từ mẫu mô được gắn mỗi (lai) cùng nhau và được cắt tiếp bằng enzym RNaza A mà có thể phát hiện một số bắt cặp sai trong cấu trúc ARN kép. Nếu bắt cặp sai được phát hiện bởi RNaza A, nó cắt ở vị trí của bắt cặp sai này. Do đó, khi chế phẩm ARN đã gắn mỗi được phân tách trên chất nền

gel điện di, nếu bắt cặp sai được phát hiện và được phân cắt bởi RNaza A, sản phẩm ARN sẽ được nhìn thấy là ngắn hơn ARN kép có chiều dài đầy đủ cho đoạn dò ARN và mARN hoặc ADN. Đoạn dò ARN không cần có độ dài đầy đủ của axit nucleic đích mARN hoặc gen, mà có thể là một phần của axit nucleic đích, với điều kiện là nó bao gồm vị trí được nghi ngờ là được gây đột biến. Nếu đoạn dò ARN chỉ chứa một đoạn của mARN axit nucleic đích hoặc gen, có thể mong muốn sử dụng nhiều đoạn dò này để sàng lọc toàn bộ trình tự đích axit nucleic về các bắt cặp sai nếu muốn.

Theo cách tương tự, đoạn dò ADN có thể được sử dụng để phát hiện bắt cặp sai, ví dụ nhờ phân cắt enzym hoặc hóa học. Xem, ví dụ, Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 4397, 1988; và Shenk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 72, p. 989, 1975. Theo cách khác, bắt cặp sai có thể được phát hiện bởi các thay đổi ở tính di động điện di của các sợi đôi bắt cặp sai so với các sợi đôi bắt cặp đúng. Xem, ví dụ, Cariello, Human Genetics, Vol. 42, p. 726, 1988. Với đoạn dò ARN hoặc đoạn dò ADN, mARN axit nucleic đích hoặc ADN mà có thể chứa đột biến có thể được khuếch đại trước khi lai. Các thay đổi trong ADN axit nucleic đích cũng có thể được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp lai Southern, đặc biệt là nếu các thay đổi này là các sắp xếp lại toàn bộ, như các đột biến mất đoạn và đột biến gắn xen.

Trình tự ADN axit nucleic đích mà đã được khuếch đại còn có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng đoạn dò đặc hiệu alen. Các đoạn dò này là các oligome axit nucleic, mà mỗi đoạn này chứa vùng gen axit nucleic đích mang đột biến đã biết. Ví dụ, một oligome có thể dài khoảng 30 nucleotit, tương ứng với một phần của trình tự gen đích. Bằng cách sử dụng bộ đoạn dò đặc hiệu alen, sản phẩm khuếch đại axit nucleic đích có thể được sàng lọc để nhận diện sự có mặt của đột biến đã xác định trước đó trong gen đích. Việc lai các đoạn dò đặc hiệu alen với trình tự axit nucleic đích đã khuếch đại có thể được tiến hành, ví dụ, trên thiết bị lọc nylon. Việc lai với đoạn dò cụ thể trong các điều kiện lai nghiêm ngặt chỉ ra sự có mặt của một đột biến trong mô khối u giống nhau như trong đoạn dò đặc hiệu alen.

Sự biến đổi gen đích kiểu đại cũng có thể được phát hiện bằng cách sàng lọc các biến đổi của protein kiểu đại tương ứng. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng phản ứng miễn dịch với sản phẩm gen đích có thể được sử dụng để sàng lọc mô, ví dụ kháng thể mà đã biết là liên kết với vị trí đột biến cụ thể của sản phẩm gen này (protein). Ví dụ, kháng thể được sử dụng có thể là kháng thể liên kết với exon đã bị mất hoặc liên kết với epitop cấu

hình chứa một phần đã bị mất của protein đích. Việc thiếu kháng nguyên cùng nguồn sẽ chỉ ra đột biến. Các kháng thể đặc hiệu với sản phẩm của alen đột biến cũng có thể được sử dụng để phát hiện sản phẩm gen đột biến. Các kháng thể có thể được xác định từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn. Các thử nghiệm miễn dịch này có thể được thực hiện ở dạng thuận lợi bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Các thử nghiệm này bao gồm thâm tách Western, thử nghiệm hóa mô miễn dịch và thử nghiệm ELISA. Phương pháp bất kỳ để phát hiện protein biến đổi có thể được sử dụng để phát hiện sự biến đổi của gen đích kiểu đại.

Cặp đoạn môi là hữu dụng để xác định trình tự nucleotit của axit nucleic đích bằng cách sử dụng kỹ thuật khuếch đại axit nucleic như phản ứng chuỗi polymeraza. Các cặp đoạn môi ADN sợi đơn có thể được gắn môi với trình tự nằm trong hoặc xung quanh trình tự axit nucleic đích để môi quá trình khuếch đại trình tự đích. Các đoạn môi đặc hiệu alen cũng có thể được sử dụng. Các đoạn môi này chỉ gắn môi với trình tự đích đột biến cụ thể, và do đó sẽ chỉ khuếch đại sản phẩm khi có mặt trình tự đích đột biến làm khuôn. Để tạo thuận lợi cho việc tách dòng tiếp các trình tự đã được khuếch đại, các đoạn môi có thể có trình tự vị trí enzym giới hạn được gắn vào đầu cùng của chúng. Các enzym và vị trí này là đã biết trong lĩnh vực. Chính các đoạn môi có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực. Thông thường, các đoạn môi có thể được tạo ra bằng cách sử dụng máy tổng hợp oligonucleotit có trên thị trường. Việc thiết kế các đoạn môi cụ thể là đã biết với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực.

Đoạn dò axit nucleic là hữu dụng cho nhiều mục đích. Chúng có thể được sử dụng trong phương pháp lai Southern với ADN bộ gen và trong phương pháp bảo vệ RNaza để phát hiện các đột biến điểm đã nêu ở trên. Đoạn dò có thể được sử dụng để phát hiện sản phẩm khuếch đại axit nucleic đích. Chúng còn có thể được sử dụng để phát hiện các bắt cặp sai với gen hoặc mRNA kiểu đại sử dụng các kỹ thuật khác. Bắt cặp sai có thể được phát hiện bằng cách sử dụng enzym (ví dụ, S1 nucleaza), hóa chất (ví dụ, hydroxylamin hoặc osmi tetroxit và piperidin), hoặc các thay đổi về tính di động điện di của các thể lai bị bắt cặp sai so với các thể lai được bắt cặp toàn bộ. Các kỹ thuật này là đã biết trong lĩnh vực. Xem Novack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, p. 586, 1986. Thông thường, các đoạn dò bổ sung cho trình tự ở bên ngoài miền kinaza. Toàn bộ bộ đoạn dò axit nucleic có thể được sử dụng để tạo ra bộ kit phát hiện các đột

biến trong axit nucleic đích. Bộ kit này cho phép lai với vùng lớn của trình tự đích cần quan tâm. Đoạn dò có thể gồi lên nhau hoặc liên tiếp.

Nếu đoạn dò ARN được sử dụng để phát hiện bắt cặp sai với mARN, nó thường bổ sung với mARN của gen đích. Đoạn dò ARN do đó là đoạn dò đối nghĩa ở chỗ nó không mã hóa cho sản phẩm gen tương ứng vì nó bổ sung cho sợi có nghĩa. Đoạn dò ARN thường sẽ được đánh dấu bằng nguyên liệu có hoạt tính phóng xạ, nguyên liệu đo màu, hoặc nguyên liệu đo huỳnh quang, mà có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Nếu đoạn dò ARN được sử dụng để phát hiện bắt cặp sai với ADN, nó có thể có tính phân cực, có nghĩa hoặc đối nghĩa. Tương tự, đoạn dò ADN cũng có thể được sử dụng để phát hiện bắt cặp sai.

Trong một số ví dụ, bệnh ung thư có hoặc không biểu hiện quá mức FGFR3. Sự biểu hiện quá mức thụ thể có thể được xác định trong thử nghiệm chẩn đoán hoặc tiên lượng bằng cách đánh giá mức tăng của protein thụ thể có mặt trên bề mặt của tế bào (ví dụ thông qua thử nghiệm hóa mô miễn dịch; IHC). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, có thể xác định hàm lượng của axit nucleic mã hóa thụ thể trong tế bào, ví dụ thông qua phương pháp lai phát huỳnh quang tại chỗ (FISH; xem WO98/45479 được công bố tháng 10/1998), tách southern, hoặc kỹ thuật phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), như PCR định lượng thời gian thực (RT-PCR). Ngoài các thử nghiệm trên, nhiều thử nghiệm in vivo là sẵn có với người thực hành có chuyên môn. Ví dụ, một người có thể cho tế bào trong cơ thể bệnh nhân tiếp xúc với kháng thể mà được đánh dấu tùy ý bằng nhãn phát hiện được, ví dụ chất đồng vị hoạt động phóng xạ, và sự liên kết kháng thể với tế bào ở bệnh nhân có thể được đánh giá, ví dụ bằng cách quét ngoài đối với hoạt tính phóng xạ hoặc bằng cách phân tích mẫu sinh thiết được lấy từ bệnh nhân đã tiếp xúc với kháng thể này trước đó.

Chất hóa trị liệu

Các liệu pháp kết hợp có thể còn chứa một hoặc nhiều chất hóa trị liệu. Việc sử dụng kết hợp bao gồm đồng sử dụng hoặc sử dụng đồng thời, bằng cách sử dụng các chế phẩm riêng rẽ hoặc một dược phẩm, và sử dụng liên tục theo thứ tự, trong đó tốt hơn nếu có khoảng thời gian khi đó cả hai (hoặc tất cả) các hoạt chất đồng thời gây ra hoạt tính sinh học của chúng.

Chất hóa trị liệu, nếu được dùng, thường được sử dụng ở liều lượng đã biết, hoặc được làm giảm tùy ý do tác dụng kết hợp của dược chất hoặc tác dụng phụ bất lợi do việc

sử dụng chất hóa trị liệu chống chuyển hóa. Dạng bào chế và lịch sử dụng liều cho các chất hóa trị liệu này có thể được sử dụng theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất hoặc như được xác định theo kinh nghiệm bởi người có chuyên môn.

Nhiều chất hóa trị liệu khác nhau có thể được kết hợp được bộc lộ trong bản mô tả.

Theo một số phương án, chất hóa trị liệu cần kết hợp được chọn từ nhóm bao gồm lenalidomide (REVLIMID), chất ức chế proteasome (như bortezomib (VELCADE) và PS342), bora taxoid (bao gồm docetaxel và paclitaxel), vinca (như vinorelbine hoặc vinblastine), hợp chất platin (như carboplatin hoặc cisplatin), chất ức chế aromataza (như letrozole, anastrozole, hoặc exemestane), chất kháng estrogen (ví dụ fulvestrant hoặc tamoxifen), etoposide, thiotepa, xyclophosphamid, pemetrexed, methotrexat, doxorubicin liposom, doxorubicin liposom được peg hóa, capecitabine, gemcitabine, melthalin, doxorubicin, vincristine, chất ức chế COX-2 (ví dụ, celecoxib), hoặc steroid (ví dụ, dexamethasone và prednisone). Theo một số phương án (ví dụ, phương án bao gồm phương pháp điều trị đa u tủy t(4;14)+, dexamethasone và lenalidomide, hoặc dexamethasone, hoặc bortezomib, hoặc vincristine, doxorubicin và dexamethason, hoặc thalidomide và dexamethasone, hoặc doxorubicin liposom, vincristine và dexamethasone, hoặc lenalidomide và dexamethasone, hoặc bortezomib và dexamethasone, hoặc bortezomib, doxorubicin, và dexamethasone được kết hợp. Theo một số phương án (ví dụ, phương án bao gồm ung thư bàng quang), gemcitabine và cisplatin, hoặc taxane (ví dụ, paclitaxel, docetaxel), hoặc pemetrexed, hoặc methotrexate, vinblastine, doxorubicin và cisplatin, hoặc carboplatin, hoặc mitomycin C kết hợp với 5-Fluorouracil, hoặc cisplatin, hoặc cisplatin và 5-Fluorouracil được kết hợp.

Chế phẩm, liều và sử dụng

Dược chất được sử dụng trong sáng chế sẽ được bào chế, định liều, và được sử dụng theo cách phù hợp với thực hành thuốc tốt. Các yếu tố để xem xét trong trường hợp này bao gồm rối loạn cụ thể đang được điều trị, đối tượng cụ thể đang được điều trị, tình trạng lâm sàng của bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn, vị trí phân phối chất này, phương pháp sử dụng, lịch sử dụng, tương tác dược chất-dược chất của chất cần được kết hợp, và các yếu tố khác đã biết với bác sĩ.

Dược phẩm được bào chế bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực bằng cách trộn thành phần hoạt tính có độ tinh khiết mong muốn với chất mang

được chấp nhận về mặt sinh lý, tá dược hoặc chất làm ổn định (Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). Chất mang chấp nhận được, bao gồm nước muối, hoặc dung dịch đệm như phosphat, xitrat và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic; polypeptit khối lượng phân tử thấp (ít hơn khoảng mười gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin hoặc globulin miễn dịch; polymer ưa nước như polyvinylpyrrolidon, axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, arginin hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc dextrin; chất tạo chelat như EDTA; rượu đường như mannitol hoặc sorbitol; các đối ion tạo muối như natri; và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như TWEENTM, PLURONICSTM, hoặc PEG.

Tùy chọn, nhưng tốt hơn nếu, chế phẩm này chứa muối được dụng, tốt hơn nếu là natri clorua, và tốt hơn nếu ở khoảng nồng độ sinh lý. Tùy chọn, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa chất bảo quản được dụng. Theo một số phương án, nồng độ chất bảo quản nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,0%, thường là theo thể tích. Chất bảo quản thích hợp bao gồm các chất đã biết trong lĩnh vực dược. Rượu benzylic, phenol, m-cresol, metylparaben, và propylparaben là chất bảo quản được ưu tiên. Tùy chọn, chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm chất hoạt động bề mặt được dụng ở nồng độ là 0,005 đến 0,02%.

Chế phẩm trong bản mô tả còn có thể chứa nhiều hơn một hoạt chất, nếu cần, cho chỉ định cụ thể đang được điều trị, tốt hơn nếu các chất này có hoạt tính bổ sung mà không ảnh hưởng bất lợi đến nhau. Các phân tử này có mặt thích hợp ở dạng hỗn hợp với lượng hữu hiệu cho mục đích được dự kiến.

Thành phần hoạt tính còn có thể được bọc trong viên vi nang được điều chế, ví dụ, bằng kỹ thuật giọt tụ hoặc bằng phương pháp polyme hóa bề mặt chung, ví dụ, viên vi nang hydroxymetylxenluloza hoặc gelatin và viên vi nang poly-(metylmetylacrylat), tương ứng, trong hệ phân phối dược chất keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, các hạt nano và nang nano) hoặc trong nhũ tương hạt lớn. Các kỹ thuật này được nêu trong Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

Chế phẩm giải phóng duy trì có thể được bào chế. Ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm chất nền bán thấm chứa polyme rắn kỵ nước chứa kháng thể, chất nền này ở dạng vật thể được tạo hình, ví dụ, màng, hoặc viên vi nang. Ví dụ về chất

nền giải phóng duy trì bao gồm polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyethyl-metacrylat), hoặc poly(vinylalcohol)), polylactit (Patent Mỹ số 3,773,919), copolyme của axit L-glutamic và γ etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không phân hủy được, copolyme axit lactic - axit glycolic phân hủy được như LUPRON DEPOT™ (hạt vi cầu tiêm được tạo bởi copolyme axit lactic - axit glycolic và leuprolide axetat), và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric. Trong khi các polyme như etylen-vinyl axetat và axit lactic - axit glycolic cho phép giải phóng phân tử trong trên 100 ngày, một số hydrogel giải phóng protein trong khoảng thời gian ngắn hơn. Khi các kháng thể được bao nang vẫn ở trong cơ thể trong thời gian dài, chúng có thể biến tính hoặc kết tụ lại do tiếp xúc với độ ẩm ở 37°C, dẫn đến sự mất hoạt tính sinh học và có thể thay đổi khả năng gây miễn dịch. Các chiến lược hợp lý có thể được tính đến để làm ổn định tùy thuộc vào cơ chế có liên quan. Ví dụ, nếu cơ chế kết tụ được phát hiện là sự tạo thành liên kết S-S liên phân tử nhờ sự trao đổi thio-disulfua, sự ổn định có thể đạt được bằng cách biến đổi các gốc sulfhydryl, làm đông khô từ dung dịch axit, kiểm soát hàm ẩm, sử dụng chất phụ gia thích hợp, và phát triển các chế phẩm chất nền polyme đặc hiệu.

Dược chất theo sáng chế được sử dụng cho người bệnh, theo phương pháp đã biết, như sử dụng trong tĩnh mạch dưới dạng truyền tĩnh mạch nhanh hoặc bằng cách truyền liên tục trong một khoảng thời gian, bằng đường trong cơ, trong màng bụng, trong não tủy, dưới da, trong khớp, trong hoạt dịch, nội tủy mạc, đường miệng, tại chỗ, hoặc xông. Chiến lược *ex vivo* cũng có thể được sử dụng cho ứng dụng điều trị. Chiến lược *ex vivo* gồm bước chuyển nhiễm hoặc tải nạp các tế bào thu được từ đối tượng có polynucleotit mã hóa cho chất đối kháng FGFR3. Tế bào đã được chuyển nhiễm hoặc tải nạp sau đó được đưa trở lại đối tượng. Các tế bào này có thể là tế bào bất kỳ thuộc nhiều loại bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào tạo máu (ví dụ, tế bào tủy xương, đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, tế bào tua, tế bào T, hoặc tế bào B), nguyên bào sợi, tế bào biểu mô, tế bào nội mô, tế bào sừng, hoặc tế bào cơ.

Ví dụ, nếu chất đối kháng FGFR3 là kháng thể, kháng thể này được sử dụng bằng phương pháp thích hợp bất kỳ, bao gồm sử dụng ngoài đường tiêu hóa, dưới da, trong màng bụng, trong phổi, và trong mũi, và, nếu cần đối với việc điều trị ức chế miễn dịch khu trú, sử dụng trong thương tổn. Truyền ngoài đường tiêu hóa bao gồm sử dụng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong khớp, trong màng bụng, hoặc dưới da. Ngoài ra, kháng thể được sử dụng thích hợp bằng cách truyền theo xung, cụ thể là với các liều kháng thể

giảm. Tốt hơn nếu sử dụng liều bằng cách tiêm, tốt nhất nếu là tiêm trong tĩnh mạch hoặc dưới da, phụ thuộc một phần vào việc sử dụng là trong thời gian ngắn hay kéo dài.

Trong ví dụ khác, chất đối kháng FGFR3 được sử dụng khu trú, ví dụ, bằng cách tiêm trực tiếp, khi rối loạn hoặc vị trí của khối u cho phép, và việc tiêm có thể được lặp lại định kỳ. Chất đối kháng FGFR3 còn có thể được phân phối toàn thân cho đối tượng hoặc trực tiếp cho tế bào khối u, ví dụ, cho khối u hoặc nền khối u sau khi cắt bỏ phẫu thuật khối u, lần lượt để ngăn ngừa hoặc làm giảm sự tái phát cục bộ hoặc di căn.

Việc sử dụng các dược chất ở dạng kết hợp thường được tiến hành trong khoảng thời gian xác định (thường theo phút, giờ, ngày hoặc tuần tùy thuộc vào hỗn hợp được chọn). Liều pháp kết hợp được dự định bao gồm sử dụng các dược chất này theo cách lần lượt, nghĩa là trong đó mỗi dược chất được sử dụng ở thời điểm khác nhau, cũng như sử dụng các dược chất này, hoặc ít nhất hai trong số các dược chất này, theo cách gần như là đồng thời.

Dược chất có thể được sử dụng bằng cùng một đường hoặc bằng các đường khác nhau. Ví dụ, kháng thể kháng FGFR3 trong liệu pháp kết hợp có thể được sử dụng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch trong khi chất hóa trị liệu trong liệu pháp kết hợp này có thể được sử dụng qua đường miệng. Theo cách khác, ví dụ, cả hai dược chất có thể được sử dụng qua đường miệng, hoặc cả hai dược chất có thể được sử dụng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch, tùy thuộc vào dược chất cụ thể. Thứ tự trong đó dược chất được sử dụng cũng thay đổi tùy thuộc vào chất cụ thể.

Tùy thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg mỗi dược chất là liều ứng viên ban đầu để sử dụng cho bệnh nhân, dù, ví dụ, bằng một lần sử dụng hoặc nhiều lần sử dụng riêng biệt, hoặc bằng cách truyền liên tục. Liều hàng ngày cụ thể có thể nằm trong khoảng từ 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg hoặc hơn, tùy thuộc vào các yếu tố nêu trên. Đối với các lần sử dụng lặp lại trong một vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị được duy trì cho đến khi bệnh ung thư được điều trị, như được xác định bằng các phương pháp nêu trên. Tuy nhiên, các phác đồ liều khác có thể là hữu dụng.

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể FGFR3 bằng liệu pháp gen. Xem, ví dụ, WO96/07321 được công bố ngày 14/3/996 về việc sử dụng liệu pháp gen để tạo ra các kháng thể nội bào.

Sản phẩm của quá trình sản xuất

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sản phẩm của quá trình sản xuất chứa nguyên liệu hữu dụng để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn nêu trên được tạo ra. Sản phẩm của quá trình sản xuất chứa đồ bao gói và nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng nằm trên hoặc đi kèm đồ bao gói. Đồ bao gói thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ nhỏ, xy lanh, v.v. đồ bao gói có thể được tạo thành từ nhiều vật liệu như thủy tinh hoặc nhựa. Đồ bao gói chứa chế phẩm mà tự nó hoặc khi được kết hợp với (các) chế phẩm khác có tác dụng để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh và có thể có lỗ nạp vô trùng (ví dụ, đồ bao gói có thể là túi dung dịch trong tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nút xuyên qua được bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm này là kháng thể theo sáng chế. Nhãn hoặc giấy hướng dẫn sử dụng chỉ ra rằng chế phẩm này được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh được chọn, như ung thư. Ngoài ra, sản phẩm của quá trình sản xuất có thể chứa (a) ô bao gói thứ nhất có chế phẩm chứa trong đó, trong đó chế phẩm này chứa kháng thể theo sáng chế; và (b) đồ bao gói thứ hai có chế phẩm chứa trong đó, trong đó chế phẩm này còn chứa chất gây độc tế bào. Sản phẩm của quá trình sản xuất theo phương án này của sáng chế có thể còn chứa giấy hướng dẫn sử dụng chỉ ra rằng chế phẩm kháng thể thứ nhất và thứ hai có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh cụ thể, ví dụ, bệnh ung thư. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, sản phẩm của quá trình sản xuất có thể còn bao gồm đồ bao gói thứ hai (hoặc thứ ba) chứa chất đệm được dùng, như nước kim khuẩn để tiêm (BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác được mong muốn từ quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các chất đệm, chất pha loãng, bộ lọc, kim tiêm, và xy lanh.

Dưới đây là ví dụ về phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Được hiểu rằng các phương án khác có thể được thực hiện, dựa trên mô tả chung được nêu ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu và phương pháp

Dòng tế bào và môi trường nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào RT4 thu được từ Bộ sưu tập nuôi cấy tế bào kiểu Mỹ. Dòng tế bào RT112, OPM2 và Ba/F3 được mua từ German Collection of Microorganism and Cell Cultures (DSMZ, (Đức)). Dòng tế bào đa u tủy KMS11 được tạo ra thành công bởi Dr. Takemi Otsuki ở Trường Y Kawasaki (Nhật). Dòng tế bào ung thư bàng quang TCC-97-

7 là quà tặng từ Dr. Margaret Knowles ở Bệnh viện Đại học St James (Leeds, UK). Dòng tế bào UMUC-14 thu được từ Dr. H.B. Grossman (hiện ở Trường đại học Texas M.D. Anderson Cancer Center, TX). Các tế bào được nuôi bằng môi trường RPMI được bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS) (Sigma), 100 U/ml penixilin, 0,1 mg/ml streptomycin và L-glutamin trong điều kiện là 5% CO₂ ở 37°C.

Các nghiên cứu đime hóa FGFR3^{S249C}

Các tế bào UMUC-14 được nuôi trong môi trường không chứa xystein, được xử lý bằng R3Mab hoặc DTNB trong 3 giờ, và dịch dung giải tế bào được đưa vào phân tích thẩm tách miễn dịch trong điều kiện khử hoặc không khử. Đối với các nghiên cứu đime hóa *in vitro*, FGFR3-IIIb^{S249C} (các gốc 143-374) được tách dòng vào vector pAcGP67A và được biểu hiện trong tế bào T.ni Pro. Protein tái tổ hợp được tinh chế qua cột Ni-NTA sau đó là cột Superdex S200. FGFR3^{S249C} dạng đime được rửa giải trong 25 mM Tris (pH=7,5) và 300 mM NaCl. R3Mab (1 µM) được ủ với đime FGFR3^{S249C} (0,1 µM) ở 37°C trong các điều kiện sau: 100 mM KH₂PO₄ (pH = 7,5), 25 µM DTT, 1 mM EDTA và 0,75 mg/ml BSA. Các phần phân ước của phản ứng được lấy ở các thời điểm được chỉ định và phản ứng được làm dừng bằng cách bổ sung đệm mẫu không chứa β-mercaptoetanol. Đime-monome được phân tích bằng thẩm tách miễn dịch.

Các nghiên cứu về ghép ngoại lai

Tất cả các nghiên cứu được thông qua bởi Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm của Genentech (Genentech's Institutional Animal Care and Use Committee). Chuột cái nu/nu hoặc chuột suy giảm miễn dịch kết hợp nghiêm trọng CB17 (SCID), 6 đến 8 tuần tuổi, được mua từ Charles River Laboratory (Hollister, CA). Chuột cái trụi lông thiếu tuyến ức thu được từ Viện ung thư quốc gia – Trung tâm ung thư Frederick. Chuột được nuôi trong điều kiện không có mầm bệnh đặc hiệu. Tế bào ổn định RT112 shARN (7 x10⁶), RT112 (7 x10⁶), Ba/F3-FGFR3^{S249C} (5 x10⁶), OPM2 (15 x10⁶), hoặc tế bào KMS11 (20 x10⁶) được cấy dưới da vào sườn của chuột ở thể tích là 0,2 ml trong HBSS/matrigel (1:1 theo thể tích, BD Biosciences). Tế bào UMUC-14 (5 x10⁶) được cấy không cần matrigel. Khối u được đo hai lần mỗi tuần bằng cách sử dụng thước kẹp, và thể tích khối u được tính toán sử dụng công thức: $V=0,5a \times b^2$, trong đó a và b lần lượt là chiều dài và chiều rộng của khối u. Khi thể tích trung bình của khối u đạt tới khoảng từ 150 đến 200 mm³, chuột được chia ngẫu nhiên vào nhóm mười con và được điều trị hai

lần mỗi tuần bằng cách tiêm trong màng bụng (i.p) R3Mab (0,3-50 mg/kg), hoặc IgG1 đối chứng của người được pha loãng trong HBSS. Động vật đối chứng chỉ được dùng tá được lỏng (HBSS).

Số liệu thống kê

Số liệu tập hợp được biểu di dưới dạng trung bình $\pm$ SEM. Kiểm định *t Student* không bắt cặp (2 đuôi) được sử dụng để so sánh giữa hai nhóm. Giá trị $P < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê trong tất cả các thử nghiệm.

Tạo ra tế bào ổn định FGFR3 shARN

Ba FGFR3 shARN độc lập được tách dòng vào vectơ pHUSH như được mô tả trong (1). Trình tự đối với các FGFR3 shARN được sử dụng trong các nghiên cứu là như sau: shARN2: 5'-GATCCCCGCATCAAGCTGCGGCATCATTCAAGAGATGATGCCGCAGCTTGATGCTTTTTTGGAAA (SEQ ID NO:192); shARN4: 5'-GATCCCCTGCACAACCTCGACTACTATTCAAGAGATAGTAGTCGAGGTTGTGCATTTTTTGGAAA-3' (SEQ ID NO:193); shARN6: 5'-GATCCCCAACCTCGACTACTACAAGATTCAAGAGATCTTGTAGTAGTCGAGGTTTTTTTTTGGAAA-3' (SEQ ID NO:194). Tất cả các cấu trúc được xác nhận bằng cách giải trình tự. shARN kiểm soát EGFP đã được mô tả trong các nghiên cứu trước đây của chúng tôi (50). Retrovirus chứa shARN được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm tế bào bao gói GP2-293 (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) với các cấu trúc VSV-G (Clontech Laboratories) và pHUSH-FGFR3 shARN, và các chất nổi bề mặt của virus được thu hoạch 72 giờ sau khi chuyển nhiễm, và được làm sạch mảnh vụn tế bào bằng cách ly tâm cho thử nghiệm tải nạp.

Tế bào RT112 được nuôi trong môi trường RPMI 1640 chứa FBS không chứa tetracyclin (Clontech Laboratories), và được tải nạp với chất nổi bề mặt retrovirus khi có mặt 4 μ g/ml polybrene. 72 giờ sau khi gây nhiễm, 2 μ g/ml puromycin (Clontech Laboratories) được bổ sung vào môi trường để chọn lọc dòng biểu hiện shARN ổn định. Các tế bào ổn định được phân lập, được xử lý với 0,1 hoặc 1 μ g/ml doxycyclin (Clontech Laboratories) trong 4 ngày, và tác dụng làm giảm biểu hiện của protein FGFR3 cảm ứng được được đánh giá bằng phân tích thẩm tách Western. Các phân tích chu trình tế bào được thực hiện như được nêu trong (51).

Lựa chọn các kháng thể thực khuẩn đặc hiệu với FGFR3

Thư viện kháng thể thực khuẩn của người có tính đa dạng tổng hợp trong vùng quyết định bổ sung (H1, H2, H3, L3), bắt chước tính đa dạng tự nhiên của nguồn IgG người được sử dụng để sàng lọc. Các mảnh Fab được biểu hiện hóa trị hai trên bề mặt của các hạt thể thực khuẩn M13 (52). IgD2-D3 được gắn His của FGFR3-IIIb và IIIc người được sử dụng làm kháng nguyên. Đĩa miễn dịch 96 giếng MaxiSorp (Nunc) được phủ qua đêm ở 4°C với protein FGFR3-IIIb-His hoặc protein FGFR3-IIIC-His (10 µg/ml) và được phong bế trong 1 giờ bằng đệm PBST (PBS với 0,05% Tween 20) được bổ sung 1% BSA. Thư viện kháng thể thực khuẩn được bổ sung và được ủ qua đêm ở nhiệt độ trong phòng (RT). Các đĩa được rửa bằng đệm PBST và thể thực khuẩn đã liên kết được rửa giải bằng 50mM HCl và 500 mM NaCl trong 30 phút và được trung hòa bằng thể tích tương đương của 1M bazơ Tris. Thể thực khuẩn đã thu hồi được khuếch đại trong tế bào xanh XL-1 của E.coli. Trong các vòng lựa chọn tiếp theo, thời gian ủ các kháng thể thực khuẩn được giảm xuống 2 giờ và tính nghiêm ngặt của quá trình rửa đĩa được tăng dần (53). Các kháng thể thực khuẩn đơn nhất và đặc hiệu mà liên kết với cả hai đồng dạng IIIb và IIIc của FGFR3 được xác định bằng ELISA thể thực khuẩn và giải trình tự ADN. Trong số 400 dòng được sàng lọc, bốn dòng được chọn để định dạng lại thành các IgG có chiều dài đầy đủ bằng cách tách dòng các vùng VL và VH của các dòng đơn lẻ vào vector LPG3 và LPG4, tương ứng, được biểu hiện tạm thời ở tế bào động vật có vú, và được tinh chế bằng cột protein A (54). Dòng 184.6 được chọn để hoàn thiện ái lực.

Để hoàn thiện ái lực, phagemid biểu hiện Fab hóa trị một trên bề mặt của thể thực khuẩn M13 (52) đóng vai trò là khuôn thư viện để ghép miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và chuỗi nặng (VH) của Ab thể thực khuẩn. Codon kết thúc được đưa vào trong CDR-L3. Chiến lược ngẫu nhiên mềm được làm cho phù hợp để hoàn thiện ái lực như được mô tả (53). Hai hỗn hợp khác nhau của vùng CDR, H1/H2/L3, H3/L3, hoặc L1/L2/L3 được chọn để ngẫu nhiên. Để lựa chọn các dòng hoàn thiện ái lực, thư viện thể thực khuẩn được phân loại dựa trên protein FGFR3 IIIb hoặc IIIc-His, được đưa vào phân loại đĩa cho vòng thứ nhất và sau đó là bốn vòng phân loại pha dung dịch như được mô tả (52). Sau năm vòng sàng lọc, ELISA thể thực khuẩn cạnh tranh điểm đơn thông lượng cao được sử dụng để sàng lọc nhanh các dòng ái lực cao như được mô tả (55). Các dòng có tỷ số thấp của độ hấp thụ ở 450 nm khi có mặt 10nM FGFR3-His so với độ hấp thụ khi vắng mặt FGFR3-His được chọn để phân tích tiếp.

Các dòng 184.6.1, 184.6.21, 184.6.49, 184.6.51, 184.6.58, 184.6.62 và 184.6.92 làm giảm đáng kể khả năng sống sót của dòng tế bào Ba/F3-FGFR3-IIIb, Ba/F3-FGFR3-IIIc và Ba/F3-FGFR3-S249C, và dòng 184.6.52 làm giảm đáng kể khả năng sống sót của dòng tế bào Ba/F3-FGFR3-S249C. Hoạt tính ức chế tăng cao hơn khoảng từ 50 lần (dòng 184.6.52) đến 100 lần (các dòng 184.6.1, 184.6.21, 184.6.49, 184.6.51, 184.6.58, 184.6.62 và 184.6.92) so với dòng bố mẹ 184.6, tùy thuộc vào dòng tế bào được thử nghiệm. Động học liên kết của các dòng 184.6.1, 184.6.58, và 184.6.62 với FGFR3-IIIb và FGFR3-IIIc được xác định bằng cách sử dụng BIAcore như sau:

	FGFR3-IIIb KD (M)	FGFR3-IIIc KD (M)
184.6	3,80E-08	1,10E-07
184.6.1	2,64E-10	1,44E-09
184.6.58	1,90E-10	8,80E-10
184.6.62	1,20E-10	2,24E-09

Các dòng 184.6.1, 184.6.58, và 184.6.62 còn cho thấy khả năng ức chế sự dẫn truyền tín hiệu xuôi dòng FGFR3 tăng trong tế bào Ba/F3-FGFR3, tế bào RT112 và tế bào OPM2.

Dòng 184.6.1 được chọn. Biến đổi trình tự, N54S, được đưa vào HVR H2 ở gốc 54, để cải thiện khả năng sản xuất, tạo ra dòng 184.6.1N54S. Các dòng 184.6.1 và 184.6.1N54S thể hiện động học liên kết tương đương (được xác định trong thử nghiệm Biacore) và hoạt tính tương đương trong thử nghiệm về khả năng sống sót của tế bào Ba/F3. Các biến thể HVR H2 khác được tạo ra: N54S được đưa vào dòng 184.6.58, và N54G, N54A, hoặc N54Q được đưa vào dòng 184.6.1 và 184.6.58. Các dòng này thể hiện hoạt tính tương đương trong thử nghiệm về khả năng sống sót của tế bào Ba/F3 so với dòng bố mẹ 184.6.1 hoặc 184.6.58.

Biến đổi trình tự khác, D30E, được đưa vào HVR L1 của dòng 184.6.1N54S, tạo ra dòng 184.6.1NSD30E. Dòng 184.6.1NSD30E và dòng 184.6.1N54S thể hiện động năng liên kết tương đương và hoạt tính tương đương trong thử nghiệm về khả năng sống sót của tế bào BA/F3 so với dòng bố mẹ 184.6.1 hoặc 184.6.58.

Trong bản mô tả này, “R3 Mab” chỉ dòng kháng thể kháng FGFR3 184.6.1N54S, 184.6.1, hoặc 184.6. Dòng 184.6.1N54S được sử dụng trong các Fig. và thử nghiệm liên

quan đến “R3Mab”, ngoại trừ trong thử nghiệm dẫn đến các kết quả được thể hiện trong các Fig sau (trong đó kháng thể được sử dụng được thể hiện trong dấu ngoặc đơn): Fig. 9B (dòng 184.6.1), 10 (dòng 184.6), 11A và B (dòng 184.6), 13 (dòng 184.6.1), 14A (dòng 184.6.1), 14B, G, và H (dòng 184.6), 19 (dòng 184.6.1), và 22B và C (dòng 184.6.1).

Phân tích BIAcore/cộng hưởng plasmon bề mặt (SRP) để xác định ái lực liên kết kháng thể

Ái lực liên kết của R3Mab với FGFR3 được xác định bằng BIAcore/SRP sử dụng thiết bị BIAcore™-3000 như đã mô tả (52) với các biến đổi sau. R3Mab được phủ trực tiếp trên chip cảm biến sinh học CM5 để thu được xấp xỉ 400 đơn vị đáp ứng (RU). Đối với phép đo động học, các dung dịch pha loãng liên tiếp 2 lần của protein FGFR3-IIIb hoặc IIIc-His (bắt đầu từ 67 nM) được tiêm vào trong đệm PBST ở 25°C với tốc độ dòng là 30 µl/phút. Tốc độ kết hợp (K_{on} , mỗi mol/s) và tốc độ phân ly (K_{off} , mỗi giây) được tính toán bằng cách sử dụng mô hình liên kết Langmuir một-một đơn giản (Phần mềm đánh giá BIAcore phiên bản 3.2). Hằng số phân ly cân bằng (K_d , mỗi mol) được tính bằng tỷ lệ K_{off} / K_{on} .

Ái lực liên kết của các kháng thể lai của chuột với FGFR3 được xác định bằng BIAcore/SRP như sau. FGFR3-IIIb hoặc IIIc của người được ghép lên ba tế bào dòng khác nhau (FC), FC2, FC3 và FC4, của chip cảm biến BIACORE™ CM5 để thu được đơn vị đáp ứng (RU) là khoảng 50 RU. Sự cố định đạt được bằng cách tạo cặp ngẫu nhiên qua các nhóm amino sử dụng quy trình được cung cấp bởi nhà sản xuất. Đồ thị đáp ứng theo thời gian được ghi lại cho liên kết của IgG của chuột kháng FGFR3 thu được từ tế bào lai hoặc mảnh Fab với các bề mặt này ở 25°C bằng cách tiêm một loạt dung dịch nằm trong khoảng từ 250nM đến 0,48nM với các số gia là 2 lần ở tốc độ dòng 30µl/phút. Giữa mỗi lần tiêm, 10mM Glyxin-HCl pH=1,7 đóng vai trò là chất đệm để tái tạo chip cảm biến. Tín hiệu từ tế bào tham chiếu (FC1) được trừ đi từ đồ thị đáp ứng theo thời gian quan sát được ở FC2, FC3 và FC4. Hằng số động học được tính bằng cách khớp hồi quy không tuyến tính số liệu theo mô hình liên kết Langmuir 1:1 sử dụng phần mềm đánh giá BIAcore (phiên bản 3.2) được cung cấp bởi nhà sản xuất.

Các nghiên cứu liên kết ELISA

cADN mã hóa miền ngoại bào (ECD) của FGFR1-IIIb, IIIc, FGFR2-IIIb và IIIc, FGFR3-IIIb và IIIc, và FGFR4 người được tách dòng vào vector gốc pRK để tạo ra protein thể khảm FGFR người-Fc người. Protein tái tổ hợp được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm tạm thời tế bào buồng trứng chuột hàng Trung Quốc (CHO) và được tinh chế bằng sắc ký ái lực protein A. Để kiểm tra liên kết của các kháng thể với FGFR của người, đĩa 96 giếng Maxisorp (Nunc) được phủ qua đêm ở 4°C với 50 μ l 2 μ g/ml protein thể khảm FGFR ECD-Fc người. Sau khi phong bế bằng nước muối được đệm phosphat (PBS)/3% BSA, kháng thể FGFR3 được bổ sung và được ủ ở RT trong 2 giờ. Kháng thể FGFR3 liên kết đặc hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng Fab kháng người liên hợp HRP và cơ chất tạo màu TMB peroxidaza (KPL, Gaithersburg, MD).

Để kiểm tra tác dụng của các kháng thể đối với FGFR3 trên tương tác FGF/FGFR3, protein khảm FGFR3-Fc được bắt giữ trên đĩa Maxisorp được phủ với kháng thể đặc hiệu mảnh Fc γ globulin miễn dịch kháng người (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Sau khi rửa, lượng tăng dần của kháng thể FGFR3 được bổ sung vào đĩa và được ủ trong 30 phút. Sau đó, FGF1 hoặc FGF9 và heparin được bổ sung vào để ủ ở RT trong 2 giờ. Các đĩa được rửa và được ủ trong 1 giờ với kháng thể đa dòng đặc hiệu FGF1 được biotin hóa (BAF232) hoặc kháng thể FGF9 được biotin hóa (BAF273, R&D Systems), sau đó phát hiện bằng streptavidin-HRP và TMB.

Tạo ra tế bào ổn định Ba/F3-FGFR3

cADN mã hóa cho FGFR3 IIIb hoặc IIIc người có chiều dài đầy đủ của người được tách dòng vào vector pQCXIP (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) để tạo ra pQCXIP-FGFR3-IIIb hoặc IIIc. Các đột biến cụ thể, tức là, R248C, S249C, G372C, Y375C và K652E, được đưa vào cADN nhờ QuickChange (Stratagen, La Jolla, CA). Để tạo ra tế bào ổn định Ba/F3 biểu hiện FGFR3 kiểu dại hoặc thể đột biến, các cấu trúc pQCXIP-FGFR3 khác nhau được đồng chuyển nhiễm vào tế bào gói GP2-293 với plasmit VSV-G (Clontech Laboratories). Sau khi chọn lọc bằng 2 μ g/ml puromyxin trong hai tuần, tế bào biểu hiện FGFR3 kiểu dại hoặc đột biến được nhuộm với mAb kháng FGFR3 người liên hợp Phycoerythrin (FAB766P, R&D Systems), và được chọn bằng cách phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS) đối với thử nghiệm chức năng. Đối với thử nghiệm tăng sinh tế bào trong đĩa vi phẩm 96 giếng, mật độ tế bào sau đây

được sử dụng: Đối với tế bào biểu hiện FGFR3-IIIb kiểu dại và FGFR3-K652E: 5000 tế bào/giếng; đối với phần còn lại: 10000 tế bào/giếng. Tế bào được gieo trong môi trường RPMI 1640 được bổ sung 10% huyết thanh thai bò, 10 ng/ml FGF1 + 10 µg/ml heparin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). R3Mab được bổ sung ở nồng độ đã chỉ ra và các kháng thể FGFR3 lai của chuột được bổ sung ở 2000 đến 0,49 ng/ml (trong các dung dịch pha loãng từng bậc bốn lần) trong thử nghiệm FGFR3-IIIb và 5000 đến 1,2 ng/ml (trong các dung dịch pha loãng từng bậc bốn lần) trong thử nghiệm FGFR3-IIIc. Sau khi ủ trong 72 giờ, khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI).

Thử nghiệm tăng sinh tế bào

Đối với các thử nghiệm tăng sinh đối với tế bào RT112, RT4 và TCC-97-7, 3000 tế bào/giếng được gieo vào đĩa vi phẩm 96 giếng và được cho phép kết dính qua đêm. Sau đó môi trường sau đó được thay bằng môi trường huyết thanh thấp (0,5% FBS) với đối chứng hoặc R3Mab ở các nồng độ chỉ định. Sau 4 ngày ủ, bổ sung 1µCi [Metyl-³H] thymidin (PerkinElmer, Waltham, MA) vào mỗi giếng, và ủ thêm 16 giờ nữa. Tế bào được chuyển đến UniFilter sử dụng Packard Filtermate Harvester, và [³H]-thymidin được đưa vào ADN hệ gen của tế bào phát triển được đo bằng cách sử dụng TopCount (PerkinElmer). Theo một số trường hợp, khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng CellTiter-Glo (Promega) sau khi ủ với các kháng thể trong 4 ngày. Các giá trị được biểu diễn dưới dạng trung bình +/- SE của bộ bốn.

Thử nghiệm về sự phát triển dòng

Tác động của R3Mab đến khả năng tạo dòng của tế bào được đánh giá theo quy trình đã được mô tả trước đó (50). Nói một cách ngắn gọn, 400 tế bào UMUC-14 được gieo trên đĩa 6 giếng trong môi trường DMEM được bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò để cho phép kết dính qua đêm. Sau đó, R3Mab hoặc kháng thể đối chứng được pha loãng trong 0,1% môi trường BSA được bổ sung đến nồng độ cuối cùng là 10 µg/ml. Thử nghiệm tương đương của một mình môi trường 0,1% BSA (Mock) được sử dụng làm đối chứng khác. Tế bào được ủ trong khoảng 12 ngày cho đến khi tế bào trong nhóm đối chứng tạo thành khuẩn lạc đủ lớn. Các khuẩn lạc được nhuộm bằng 0,5% tím tinh thể, và số lượng và kích thước của khuẩn lạc được định lượng bằng cách sử dụng GelCount

(Oxford, UK). Số lượng khuẩn lạc có đường kính lớn hơn 120 μm được biểu diễn dưới dạng trung bình $\pm$ SEM ($n=12$).

Kết tủa miễn dịch và phân tích thẩm tách miễn dịch

Để nghiên cứu tác dụng của các kháng thể đối với sự dẫn truyền tín hiệu FGFR3, tế bào bị bỏ đói trong môi trường không chứa huyết thanh qua đêm trước khi bắt đầu điều trị. Tế bào được ủ với các kháng thể đã được pha loãng trong 0,1% BSA (w/v), môi trường RPMI 1640, hoặc chỉ với môi trường 0,1% BSA (Mock). Sau 3 giờ ở 37°C, FGF1 (nồng độ cuối cùng là 15 ng/ml) và heparin (nồng độ cuối cùng là 5-10 $\mu\text{g/ml}$) được thêm vào nửa số mẫu. Thể tích tương đương của một mình heparin được thêm vào nửa số mẫu còn lại làm đối chứng. Tiếp tục ủ trong mười phút. Chất nổi bề mặt được loại bỏ bằng cách hút, và tế bào được rửa bằng PBS lạnh băng, sau đó được dung giải trong đệm RIPA (Upstate, Charlottesville, VA) đã được bổ sung 1 mM natri orthovanadat và hỗn hợp chất ức chế proteaza hoàn chỉnh (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Dịch dung giải được làm sạch các nguyên liệu không hòa tan bằng cách ly tâm.

FGFR3 được kết tủa miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng của thỏ (sc-123, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) và được phân tích bằng điện di natri dodecyl-polyacrylamit gel (SDS-PAGE) và thẩm tách Western. FGFR3 được phosphoryl hóa được đánh giá với kháng thể đơn dòng kháng phospho-tyrosin (4G10, Upstate). FGFR3 toàn phần được dò bằng kháng thể đơn dòng kháng FGFR3 (sc-13121, Santa Cruz Biotechnology). Phosphoryl hóa và việc hoạt hóa con đường truyền tín hiệu FGFR3 được dò bằng cách sử dụng các kháng thể sau đây: kháng thể kháng FGFR^{Y653/654}, kháng FRS2 α ^{Y196}, kháng phospho-p44/42 MAPK^{T202/Y204}, kháng toàn bộ p44/42 MAPK và kháng AKT^{S473} thu được từ Cell Signaling Technology (Davers, MA); và kháng toàn bộ FRS2 α (sc-8318) được mua từ Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Các vết được quan sát bằng cách sử dụng cơ chất phát quang hóa học (ECL Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Lập bản đồ epitop kháng thể

Để xác định epitop của R3Mab, 13 peptit gộp lên nhau, mỗi peptit dài 15 axit amin, được tổng hợp để bao gồm miền ngoại bào của FGFR3 người từ các gốc 138 đến 310. Peptit được biotin hóa ở đầu cùng C, và được bắt giữ trên đĩa streptavidin (Pierce, Rockford, IL) qua đêm. Sau khi phong bế bằng PBS/3% BSA, các đĩa được ủ với R3Mab

và được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG người được liên hợp HRP (Jackson ImmunoResearch) và chất nền sinh màu TMB peroxidaza (KPL, Gaithersburg, MD).

Các kháng thể lai kháng FGFR3 người ở chuột 1G6, 6G1, và 15B2 được thử nghiệm trong thử nghiệm ELISA để nhận diện các epitop liên kết của chúng. 1G6, 6G1 và 15B2 liên kết với IgD2-IgD3 FGFR3 người (cả hai đồng dạng IIIb và IIIc), trong khi đó 5B8 chỉ liên kết với IgD2-IgD3 của FGFR3-IIIb người. Trong thử nghiệm cạnh tranh, 1G6, 6G1 và 15B2 cạnh tranh với nhau để liên kết với FGFR3 người, gợi ý rằng 1G6, 6G1 và 15B2 có các epitop gối lên nhau. Không có kháng thể lai nào cạnh tranh với kháng thể thực khuẩn 184.6, gợi ý rằng các kháng thể lai có (các) epitop khác với 184.6.

Điều chế và tách dòng phân tử các kháng thể kháng FGFR3 chuột 1G6, 6G1, và 15B2

Chuột BALB/c được gây miễn dịch 12 lần với 2,0 μ g FGFR3-IIIb (thể khảm rhFGFR3 (IIIb)/Fc, từ R&D Systems, catalog # 1264-FR, lô # CYH025011, hoặc với 2,0 μ g FGFR3-IIIc (thể khảm rhFGFR3 (IIIc)/Fc, từ R&D Systems, catalog # 766-FR, lô # CWZ055041, được tạo huyền phù lại trong chất phụ trợ monophosphoryl lipid A/trehaloza dicorynomycolat (Corixa, Hamilton, MT) vào mỗi gan bàn chân sau hai lần mỗi tuần. Ba ngày sau khi tiêm nhắc lại lần cuối, hạch lympho vùng kheo được dung hợp với dòng tế bào u tủy chuột P3X63Ag.U.1, nhờ kỹ thuật hàn điện tử (Hybrimmune, Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, Maryland). Tế bào lai đã dung hợp được chọn từ hạch thuộc vùng kheo chưa được dung hợp hoặc tế bào u tủy sử dụng phương pháp lựa chọn hypoxanthin-aminopterin-thymidin (HAT) trong Môi trường D từ bộ kit chọn lọc tế bào lai ClonaCell® (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada). Chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy ban đầu được sàng lọc về khả năng liên kết của nó với FGFR3-IIIb và FGFR3-IIIc bằng ELISA, và các tế bào lai cần quan tâm được sàng lọc tiếp về khả năng nhuộm bởi FACS trên tế bào FGFR3-IIIb Ba/F đã được chuyển nhiễm và Ba/F đối chứng, cũng như hoạt tính phong bế kháng thể. Sau đó các tế bào lai được chọn được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn.

Toàn bộ ARN được chiết từ tế bào lai sản xuất ra kháng thể đơn dòng kháng FGFR3 người của chuột 1G6 và 15B2, sử dụng bộ kit RNeasy Mini (Qiagen, Germany).

Miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được khuếch đại sử dụng RT-PCR với các đoạn mồi thoái hóa sau:

1G6:

chuỗi nhẹ (LC) xuôi: 5'-GTCAGATATCGTKCTSACMCARTCTCCWGC-3' (SEQ ID NO:195)

Chuỗi nặng (HC) xuôi:

5'-GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCA RCARTCTGG-3' (SEQ ID NO:196)

6G1:

chuỗi nhẹ (LC) xuôi: 5'-GTCAGATATCGTGCTGACMCARTCTCC-3' (SEQ ID NO:197)

Chuỗi nặng (HC) xuôi: 5'-GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCA RCARTCTGG-3' (SEQ ID NO:198)

15B2:

chuỗi nhẹ (LC) xuôi: 5'-GTACGATATCCAGATGACMCARTCTCC-3' (SEQ ID NO:199)

Chuỗi nặng (HC) xuôi: 5'-GATCGACGTACGCTGAGATCCARYTGCA RCARTCTGG-3' (SEQ ID NO:200)

Đoạn mồi đảo chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đối với cả ba dòng là như sau:

Mồi đảo chuỗi nhẹ: 5'-TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC-3' (SEQ ID NO:201)

Mồi đảo chuỗi nặng: 5'-ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT-3' (SEQ ID NO:202).

Các đoạn mồi xuôi là đặc hiệu với trình tự axit amin đầu cùng N của vùng VL và VH. Các đoạn mồi đảo LC và HC được thiết kế để gắn mỗi lần lượt với vùng trong miền hằng định chuỗi nhẹ (CL) và miền hằng định chuỗi nặng (CH1) mà được bảo toàn cao giữa các loài.

VL khuếch đại được tách dòng vào vector biểu hiện tế bào động vật có vú pRK (Shields et al, (2000) J. Biol. Chem. 276:659) chứa miền hằng định kappa ở người. VH khuếch đại được gắn xen vào vector biểu hiện tế bào động vật có vú pRK mã hóa cho

miền hằng định IgG1 có chiều dài đầy đủ của người. Trình tự của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xác định bằng cách sử dụng phương pháp thông thường.

Sự kết tinh, xác định cấu trúc và tinh chế

FGFR3-IIIb ECD người (các gốc 143-374) được tách dòng vào vector pAcGP67A (BD Bioscience, San Jose, CA), được sản sinh trong tế bào T.ni Pro và được tinh chế bằng cách sử dụng cột Ni-NTA sau đó là sắc ký loại cỡ. R3Mab Fab được biểu hiện trong *E.coli* và được tinh chế lần lượt trên cột ái lực protein G, cột SP sepharose và cột Superdex 75. Phức hợp Fab-FGFR3 được tạo ra bằng cách ủ Fab với lượng dư của FGFR3 ECD, và phức hợp sau đó được khử glycosyl và được tinh chế trên cột định cỡ Superdex-200 trong 20 mM TrisCl pH 7,5 và 200 mM đệm NaCl. Các phân đoạn chứa phức hợp được tập hợp và được cô đến 20 mg/ml và được sử dụng trong các thử nghiệm kết tinh. Các tinh thể được sử dụng để xác định cấu trúc được nuôi ở 4°C từ các điều kiện sau: 0,1 M natri cacodylat pH = 6,5, 40% MPD và 5% PEG8000 bằng cách sử dụng phương pháp khuếch tán hơi. Các số liệu được xử lý bằng cách sử dụng HKL2000 và Scalepack (56). Cấu trúc này được hòa tan kèm theo thay thế phân tử sử dụng chương trình Phaser (57) và các tọa độ là 1RY3 (FGFR3) và 1N8Z (Fab-fragment). Mô hình được hoàn thành bằng cách sử dụng chương trình Coot (58) và cấu trúc được tinh chế đến R/R_{free} là 20,4%/24,3% với chương trình Refmac (59). Các tọa độ và yếu tố cấu trúc được gửi vào ngân hàng dữ liệu protein với mã truy cập 3GRW và còn được nêu trong USSN 61/163,222, nộp ngày 25/3/2009.

Thử nghiệm ADCC

PBMC người được phân lập bằng phương pháp ly tâm gradien ống Ficoll máu được heparin hóa, và ADCC được đo bằng cách sử dụng dòng tế bào đa u tủy OPM2 hoặc KMS11 hoặc dòng tế bào ung thư bàng quang RT112 hoặc UMUC-14 làm đích và PBMC làm tế bào hiệu ứng ở tỷ lệ đích : tế bào hiệu ứng là 1:100. Tế bào đích (10 000 tế bào/giếng) được xử lý bằng R3Mab hoặc bằng IgG1 người đối chứng trong 4 giờ ở 37°C. Tác dụng gây độc tế bào được xác định bằng cách đo sự giải phóng LDH bằng cách sử dụng Thử nghiệm về tính nguyên vẹn màng đồng nhất CytoTox-ONE (CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất (Promega, Madison, WI). Kết quả được thể hiện bằng tỷ lệ phần trăm dung giải tế bào cụ thể sử dụng công thức: Tác dụng gây độc tế bào (%) = [(Sự dung giải thử nghiệm – sự

dung giải tự phát thử nghiệm)/ (dung giải đích tối đa – dung giải đích tự phát)] x 100, trong đó sự dung giải tự phát là sự dung giải tế bào không đặc hiệu khi vắng mặt kháng thể, và sự dung giải đích tối đa được cảm ứng bởi 1% Triton X-100.

Kết quả

Sự giảm biểu hiện shARN cảm ứng được của FGFR3 làm suy yếu sự phát triển bệnh ung thư bàng quang in vivo

Mở đầu việc đánh giá tầm quan trọng của FGFR3 đối với sự phát triển khối u bàng quang in vivo, chúng tôi kiểm tra tác dụng của sự giảm biểu hiện FGFR3 in vitro. Một vài ARN can thiệp nhỏ (si) FGFR3 điều hòa giảm hiệu quả FGFR3 trong dòng tế bào ung thư bàng quang biểu hiện FGFR3 WT (RT112, RT4, SW780) hoặc FGFR3 đột biến (UMUC-14 đột biến, S249C). Sự giảm biểu hiện FGFR3 ở cả bốn dòng tế bào ức chế rõ rệt sự tăng sinh trong môi trường nuôi cấy (Fig.15). Tiếp theo, chúng tôi tạo ra dòng tế bào RT112 ổn định biểu hiện shARN FGFR3 cảm ứng được bằng doxycycline. Việc cảm ứng ba shARN FGFR3 độc lập bởi doxycycline làm giảm sự biểu hiện FGFR3, trong khi đó việc cảm ứng shARN đối chứng gắn đích EGFP không có tác dụng (Fig.7A). Khi vắng mặt FGF ngoại sinh, việc điều trị bằng doxycycline làm giảm sự kết hợp [³H]-thymidin bởi các tế bào biểu hiện các shARN FGFR3 khác nhau, nhưng không biểu hiện shARN đối chứng (Fig.7B), xác nhận rằng sự giảm biểu hiện FGFR3 ức chế sự tăng sinh. Phân tích thêm sự phát triển theo hàm mũ của tế bào RT112 cho thấy rằng sự giảm biểu hiện FGFR3 trong 72 giờ điều trị với doxycycline làm giảm đáng kể và đặc hiệu tỷ lệ phần trăm tế bào trong pha S và G2 của chu trình tế bào, với sự tăng đồng thời tế bào trong pha G1 (Fig.7C). Tác dụng tương tự được quan sát thấy với hai shARN FGFR3 khác (Fig.16A). Không phát hiện được số lượng đáng kể tế bào có hàm lượng ADN dưới lưỡng bội, cho thấy không có sự thay đổi về mức độ chết tế bào theo chương trình. Do đó, tác dụng ức chế của sự giảm biểu hiện FGFR3 đối với sự tăng sinh tế bào RT112 chủ yếu là do sự tiến triển chu trình tế bào suy yếu.

Tiếp theo chúng tôi đánh giá tác dụng của việc làm giảm biểu hiện FGFR3 đến sự phát triển của mô ghép ngoại lai khối u RT112 đã được xác lập trước ở các con chuột. Việc làm giảm biểu hiện FGFR3 ức chế về cơ bản và đặc hiệu sự phát triển khối u (Fig.7D, ô trên cùng và Fig.16B). Phân tích mẫu khối u ngày 45 xác nhận sự giảm biểu hiện FGFR3 hiệu quả khi cảm ứng bằng doxycycline shARN FGFR3 so với shARN đối

chứng (Fig.7D, ô dưới cùng). Các kết quả này chứng minh rằng FGFR3 là quan trọng cả in vitro và in vivo đối với sự phát triển của tế bào ung thư bàng quang RT112.

Tạo ra kháng thể đơn dòng kháng FGFR3 phong bế

Để kiểm tra thêm tầm quan trọng của FGFR3 trong sự phát triển khối u và để khai thác tiềm năng của thụ thể này làm đích điều trị, tác giả sáng chế phát triển kháng thể đơn dòng đối kháng kháng FGFR3 (được gọi là R3Mab) sử dụng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn. Tác giả sáng chế chọn kháng thể cụ thể này dựa trên khả năng của nó trong việc phong bế cả sự liên kết và đime hóa phối tử bởi FGFR3, và khả năng độc nhất của nó trong việc ức chế không chỉ WT FGFR3 mà còn các thể đột biến liên quan đến ung thư phổ biến nhất của thụ thể này (xem dưới đây). R3Mab gắn đích miền IgD2 và IgD3 ngoại bào của FGFR3, mà là cần thiết và đủ để liên kết FGF (4). R3Mab liên kết với cả hai đồng dạng IIIb và IIIc của FGFR3 ở người, nhưng cho thấy không có liên kết phát hiện được với FGFR1, FGFR2 hoặc FGFR4 (Fig.8A). Phân tích Biacore thể hiện rằng R3Mab có ái lực biểu kiến tương tự với FGFR3-IIIc của chuột, khỉ cynomolgus và người (số liệu không được thể hiện). Ái lực của R3Mab với FGFR3 người được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Ái lực của R3Mab với FGFR3 người được xác định bằng phân tích BIAcore.

FGFR3 ECD người	R3 Mab được giữ trên chip		
	kon/(1/Ms)	koff(1/s)	Kd(M)
IIIb	1,80E + 06	2,00E-04	1,11E-10
IIIc	9,10E + 04	3,20E-04	3,52E-09

Tiếp theo tác giả sáng chế kiểm tra khả năng R3Mab trong việc phong bế liên kết của FGFR3 với FGF1 và FGF9. R3Mab ức chế mạnh sự liên kết FGF1 với FGFR3-IIIb và -IIIc, với một nửa nồng độ ức chế tối đa (IC₅₀) lần lượt là 0,3 nM và 1,7 nM, (Fig.8B,C). Tương tự, R3Mab phong bế hiệu quả FGF9 liên kết với FGFR3-IIIb và -IIIc, với IC₅₀ lần lượt là 1,1 nM và 1,3 nM, (Fig.8D,E).

R3Mab ức chế WT FGFR3 và biến thể đột biến liên quan đến ung thư phổ biến nhất của nó

Để kiểm tra xem R3Mab có ức chế sự tăng sinh tế bào được điều khiển bởi WT hoặc FGFR3 đột biến hay không, tác giả sáng chế dựa trên thuận lợi từ việc quan sát thấy là sự biểu hiện FGFR3 lạc vị trí trong tế bào pro-B chuột Ba/F3 gây ra sự sống sót và tăng sinh phụ thuộc FGF1, độc lập interleukin (IL)-3 (29). Khi vắng mặt FGF1 và IL-3, tế bào Ba/F3 biểu hiện ổn định WT FGFR3 không có khả năng sống, trong khi FGF1 làm tăng đáng kể sự tăng sinh của chúng (Fig.9A). R3Mab phong bế đặc hiệu sự tăng sinh tế bào Ba/F3-FGFR3 được kích thích bởi FGF1 theo cách phụ thuộc liều (Fig.9A). Tiếp theo tác giả sáng chế đánh giá ảnh hưởng của R3Mab đến sự dẫn truyền tín hiệu FGFR3 trong các tế bào này. FGF1 cảm ứng sự phosphoryl hóa và hoạt hóa FGFR3 và việc hoạt hóa đồng thời p44/42 MAPK, trong khi R3Mab ức chế hiệu quả sự hoạt hóa cả hai phân tử (Fig.9B).

Trong ung thư bàng quang, các đột biến hoạt hóa soma trong cụm FGFR3 bên trong vùng liên kết giữa IgD2 và IgD3, miền kề màng ngoại bào, hoặc miền kinaza (Fig.9C). Đột biến thể sai nghĩa ngoại bào thường xuyên dẫn đến cystein không bắt cặp, dẫn đến sự dime hóa độc lập phối tử của FGFR3. Các đột biến này gây ra mức hoạt hóa FGFR3 cơ định khác nhau đáng kể, có thể là do tác động khác nhau đến sự định hướng của miền kinaza tế bào chất (30, 31). Các đột biến thường xuyên nhất là S249C, Y375C, R248C, G372C, và K652E, mà cùng chiếm 98% trong số tất cả các đột biến FGFR3 trong ung thư bàng quang (32). Tác giả sáng chế suy luận rằng được chất tối ưu cần phong bế không chỉ protein WT FGFR3, mà được biểu hiện quá mức trong một số bệnh ung thư, mà còn cả các thể đột biến FGFR3 liên quan đến khối u phổ biến nhất. Để đánh giá thêm R3Mab, tác giả sáng chế tạo ra dòng tế bào Ba/F3 biểu hiện ổn định mỗi trong số năm biến thể đột biến FGFR3 phổ biến nhất. Tất cả các đột biến được biểu hiện ở mức độ tương tự nhau ở bề mặt tế bào, và đột biến cystein được dime hóa tự phát mà không cần phối tử (số liệu không được thể hiện). Dòng tế bào biểu hiện các đột biến cystein khác nhau thể hiện đáp ứng phát triển thay đổi với FGF1, phù hợp với các phát hiện trước đây (30, 31). Như được báo cáo trước đó (33), tế bào biểu hiện FGFR3^{R248C} biểu hiện sự tăng sinh cơ định, độc lập phối tử, và không đáp ứng với FGF1 (Fig.9D). Tương tự, đột biến thường xuyên nhất, FGFR3^{S249C}, gây ra sự tăng sinh ra độc lập phối tử (Fig.9E).

Đáng chú ý là, R3Mab ức chế sự tăng sinh cơ định được điều khiển bởi mỗi đột biến (Fig.9 D,E). Tế bào biểu hiện các đột biến miền kề màng FGFR3^{G372C} (Fig.9F) hoặc FGFR3^{Y375C} (Fig.9G) cần FGF1 cho sự tăng sinh, và sự phát triển của chúng bị phong bế hoàn toàn bởi R3Mab. Tế bào biểu hiện FGFR3^{K652E} cho thấy sự tăng sinh độc lập phối tử yếu và sự phát triển đáng kể trong đáp ứng với FGF1 (33). R3Mab không tác động đến hoạt tính nền yếu của FGFR3^{K652E} (số liệu không được thể hiện), nhưng gần như loại bỏ sự tăng sinh được cảm ứng bởi phối tử do đột biến này (Fig.9H). Do đó, R3Mab có khả năng độc nhất ức chế cả FGFR3 WT và đột biến liên quan đến ung thư phổ biến của FGFR3. Ngoài ra, R3Mab không biểu hiện hoạt tính chủ vận phát hiện được.

Với nỗ lực riêng, tác giả sáng chế tạo ra và phân tích nhiều kháng thể lai kháng FGFR3 người ở chuột. Không kháng thể nào trong số các kháng thể lai này có thể ức chế tất cả các đột biến liên quan đến ung thư của FGFR3 mà tác giả sáng chế đã kiểm tra (Fig.17), chúng cũng không có chung các epitop gối chồng với R3Mab.

Ngoài ra, tất cả các các kháng thể lai đều thể hiện hoạt tính chủ vận, kích thích mạnh sự tăng sinh của đột biến FGFR3 liên quan đến ung thư R248C và S249C, và thể hiện tác dụng kích thích sự tăng sinh của các đột biến Y375C và G370C. Các kháng thể lai thể hiện mức đối kháng và chủ vận khác nhau, tùy thuộc vào đột biến FGFR3 được kiểm tra, như sau:

	1G6	6G1	15B2
FGFR3-IIIb kiểu dại	ức chế	ức chế	ức chế
FGFR3-IIIb R248C	Kích thích 2 lần	Kích thích 4-5 lần	Kích thích 3-4 lần
FGFR3-IIIb S249C	Kích thích 2 lần	Kích thích 4-5 lần	Kích thích 4-5 lần
FGFR3-IIIb Y375C	Kích thích 1,2-1,5 lần	Kích thích 1,2-1,5 lần	Kích thích 1,2-1,5 lần
FGFR3-IIIb K652E	ức chế 50%	ức chế 60-70%	ức chế
FGFR3-IIIC	ức chế	ức chế	ức chế
FGFR3-IIIC G370C	không tác dụng	ức chế 20-30%	ức chế 10-20-%

Do đó, các kháng thể lai thể hiện các tác dụng khác nhau không thể dự đoán được đối với sự tăng sinh tế bào của các tế bào Ba/F3 được điều khiển bởi các đột biến FGFR3 khác nhau.

Phân tích các kháng thể lai kháng FGFR3 người của chuột

Các kháng thể lai kháng FGFR3 người của chuột được phân tích thêm như sau:

(1) Trong thử nghiệm để kiểm tra khả năng của các kháng thể lai ở chuột kháng FGFR3 trong việc ức chế FGF1 liên kết với đồng dạng FGFR3-IIIb và IIIc người, các kháng thể 1G6, 6G1 và 15B2 có thể phong bế liên kết FGF1 với đồng dạng FGFR3-IIIb và IIIc người theo cách phụ thuộc liều. Khi kiểm tra qua khoảng nồng độ kháng thể trong khoảng từ 2000 đến 0,49 ng/ml, các kháng thể 1G6, 6G1 và 15B2 phong bế FGF1 liên kết với FGFR3-IIIb với giá trị IC₅₀ là 0,69, 0,87 và 0,72 nM. Khi kiểm tra qua khoảng nồng độ kháng thể trong khoảng từ 5000 đến 1,2 ng/ml, các kháng thể 1G6, 6G1 và 15B2 phong bế FGF1 liên kết với FGFR3-IIIc với giá trị IC₅₀ lần lượt là 0,57, 3,4 và 0,7 nM.

(2) Trong thử nghiệm để kiểm tra khả năng của các kháng thể lai của chuột kháng FGFR3 trong việc ức chế FGF9 liên kết với đồng dạng FGFR3-IIIb và IIIc người, các kháng thể 1G6, 6G1 và 15B2 phong bế hiệu quả liên kết FGF1 với đồng dạng FGFR3-IIIb và IIIc người theo cách phụ thuộc liều. Khi kiểm tra qua khoảng nồng độ kháng thể trong khoảng từ 2000 đến 0,49 ng/ml, các kháng thể 1G6, 6G1 và 15B2 phong bế FGF9 liên kết với FGFR3-IIIb với giá trị IC₅₀ lần lượt là 0,13, 0,16, và 0,07 nM. Khi kiểm tra qua khoảng nồng độ kháng thể trong khoảng từ 5000 đến 1,2 ng/ml, các kháng thể 1G6, 6G1 và 15B2 phong bế FGF9 liên kết với FGFR3-IIIc với giá trị IC₅₀ lần lượt là 0,13, 0,11, và 0,07 nM.

(3) Ái lực liên kết của các kháng thể lai của chuột kháng FGFR3 có chiều dài đầy đủ 1G6, 6G1 và 15B2 được xác định bằng cách sử dụng phân tích BIAcore. Kết quả của phân tích này được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3.

Kháng thể	FGFR3-IIIB			FGFR3-IIIC		
	<i>kon</i> (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	<i>koff</i> (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	Kd (nM)	<i>kon</i> (10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	<i>koff</i> (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	Kd (nM)
1G6 mIgG	2,2	3,1	1,4	2,2	2,8	1,3

6G1 mIgG	2,7	3,8	1,4	2,6	3,2	1,2
15B2 mIgG	4,1	29	7,1	3,5	39	11,1

(4) Trong thử nghiệm để kiểm tra khả năng của các kháng thể lai của chuột kháng FGFR3 trong việc ức chế sự tăng sinh tế bào Ba/F3 được điều khiển bởi FGFR3-IIIb hoặc IIIc người, các kháng thể 1G6, 6G1 và 15B2 có thể phong bế sự tăng sinh tế bào Ba/F3 được điều khiển bởi FGFR3-IIIb hoặc IIIc người theo cách phụ thuộc liều. Khi kiểm tra qua khoảng nồng độ kháng thể trong khoảng từ 0,01 đến 100 ug/ml, các kháng thể 1G6, 6G1 và 15B2 phong bế sự tăng sinh tế bào Ba/F3 được điều khiển bởi FGFR3-IIIb với giá trị IC50 lần lượt là 3-5 nM, 3 nM, và 6-8 nM, và phong bế sự tăng sinh tế bào Ba/F3 được điều khiển bởi FGFR3-IIIc với giá trị IC50 lần lượt là 10-35 nM, 24 nM, và 60 nM.

(5) Trong thử nghiệm để kiểm tra khả năng của các kháng thể lai của chuột kháng FGFR3 trong việc ức chế sự dẫn truyền tín hiệu được cảm ứng bởi FGF1 trong tế bào Ba/F3 biểu hiện FGFR3-IIIb người, các kháng thể 1G6, 6G1 và 15B2 có khả năng phong bế sự dẫn truyền tín hiệu được cảm ứng bởi FGF1 trong tế bào Ba/F3 biểu hiện FGFR3-IIIb người theo cách phụ thuộc liều khi kiểm tra qua khoảng nồng độ kháng thể trong khoảng từ 0,25 đến 6,75 ug/ml. 25 ng/ml FGF1 được sử dụng trong thử nghiệm này. Khi vắng mặt FGF1, việc điều trị kháng thể không có tác dụng đối với sự hoạt hóa FGFR3.

(6) Trong thử nghiệm để kiểm tra khả năng của các kháng thể lai của chuột kháng FGFR3 trong việc ức chế sự dẫn truyền tín hiệu được cảm ứng bởi FGF1 trong tế bào Ba/F3 biểu hiện FGFR3-IIIc người, các kháng thể 1G6, 6G1 và 15B2 có khả năng phong bế sự dẫn truyền tín hiệu được cảm ứng bởi FGF1 trong tế bào Ba/F3 biểu hiện FGFR3-IIIc người theo cách phụ thuộc liều khi kiểm tra qua khoảng nồng độ kháng thể trong khoảng từ 0,25 đến 6,75 ug/ml. 25 ng/ml FGF1 được sử dụng trong thử nghiệm này. Khi vắng mặt FGF1, việc điều trị kháng thể không có tác dụng đối với sự hoạt hóa FGFR3.

Cơ sở cấu trúc cho sự tương tác của R3Mab với FGFR3

Để có được cái nhìn về cách thức R3Mab tương tác với FGFR3, chúng tôi tổng hợp ô gồm 13 peptit xếp chồng kéo dài vùng IgD2 và D3 FGFR3-IIIb và kiểm tra sự liên kết của chúng với R3Mab. Peptit 3 (các gốc 164-178) và 11 (các gốc 269-283) thể hiện liên kết đặc hiệu với R3Mab, với peptit 3 có tương tác mạnh hơn (Fig.10A), chỉ ra rằng các vùng tương ứng trên FGFR3 là quan trọng để nhận diện bởi R3Mab. Các nghiên cứu

tinh thể học trước đó của FGFR1 trong phức hợp với FGF2 xác định các gốc thụ thể quan trọng tham gia vào sự liên kết trực tiếp với FGF và heparin cũng như trong việc đime hóa thụ thể (34). Sự sắp xếp thẳng hàng peptit 3 và 11 FGFR3 với các vị trí quan trọng về mặt chức năng trong FGFR1 cho thấy rằng các peptit này bao gồm các gốc FGFR1 tương ứng thiết yếu cho sự liên kết trực tiếp FGF2, đime hóa thụ thể, cũng như tương tác với heparin (Fig.10B). Các số liệu này thể hiện rằng epitop của R3Mab trên FGFR3 chồng lên các gốc thụ thể tham gia vào sự kết hợp phối tử và tương tác thụ thể-thụ thể.

Tiếp theo tác giả sáng chế kết tinh phức hợp giữa mảnh Fab của R3Mab và vùng IgD2-D3 ngoại bào của FGFR3-IIIb người, và xác định cấu trúc tia X ở độ phân giải 2,1Å (Fig.10 C, D; bảng 4). Trong phức hợp này, xấp xỉ 1400 Å² và 1500 Å² của diện tích bề mặt có thể tiếp xúc với dung môi được vùi lần lượt trên FGFR3 và Fab. Khoảng 80% của bề mặt chung bị vùi gồm IgD2, trong khi phần còn lại kế thừa cầu nối và vùng IgD3. Ở phía Fab của phức hợp, khoảng 40% của bề mặt chung bị vùi bao gồm vùng quyết định bổ sung (CDR)-H3, 20% CDR-H2, 20% CDR-L2, và các đóng góp nhỏ là từ các CDR và các gốc khung khác. Lưu ý là, axit amin (AA) từ CDR-H3 tạo thành hai chuỗi β , mà kéo dài tấm β của IgD2 (Fig.10D). Fab tương tác với AA mà tạo nên vị trí liên kết FGF của FGFR3 cũng như các gốc mà tạo thành bề mặt chung đime hóa thụ thể, như được xác định trước đó trong các phức hợp FGF:FGFR đime khác nhau (ví dụ, PDB mã 1CVS, (34); và Fig.10C, các vùng màu ghi/gạch chéo và màu ghi sẫm). Các bề mặt chung tương tác được xác định bằng tinh thể học là hoàn toàn phù hợp với các số liệu dựa trên peptit (Fig.18 A, B). Các kết quả này cùng cho thấy cách R3Mab ức chế liên kết phối tử, và còn cho thấy rằng liên kết R3Mab với FGFR3 có thể ngăn ngừa sự đime hóa thụ thể. Các axit amin FGFR3 mà tiếp xúc với R3Mab được thể hiện trong bảng 5. Các tọa độ tinh thể học cho cấu trúc này được gửi vào ngân hàng dữ liệu Protein với mã truy cập 3GRW.

Bảng 4: tổng kết phân tích tinh thể học

<u>Tập hợp dữ liệu</u>	FGFR3-IIIb: R3Mab Fab
Nhóm đối xứng	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Thông số tế bào	a=58,5, b=99,3, c=143,7
Độ phân giải (Å)	25-2,1
R _{sym} ^a	0,098 (0,663) ^b
Số lượng quan sát	288498
Phản xạ đơn nhất	49851

Mức độ hoàn thành 99,9 (100,0)^b
(%)

Tinh chế

Độ phân giải (Å)	20-2,1
Số lượng phản xạ	46714
R ^c cuối, R _{free} (F>0)	0,187, 0,224
Số lượng nguyên tử không phải H	5270
Số lượng axit amin	650
Sulfat	1
Đường	1
Nguyên tử dung môi	274
Liên kết Rmsd (Å)	0,011
Góc Rmsd (°)	1,4

^a $R_{\text{sym}} = \Sigma |I - \langle I \rangle| / \Sigma I$. $\langle I \rangle$ là cường độ trung bình của các quan sát liên quan đến tính đối xứng của phản xạ đơn nhất.

^b Số trong dấu ngoặc đơn chỉ lớp độ phân giải cao nhất.

^c $R = \Sigma |F_o - F_c| / \Sigma F_o$. R_{tự do} được tính là R, nhưng với 5% số phản xạ được loại khỏi toàn bộ tinh chế.

Bảng 5: Các gốc trong FGFR3 mà tiếp xúc với R3Mab

Gốc bề mặt được vùi của gốc trong bề mặt chung

 THR 154 0,10

ARG 155 16,50

ARG 158 105,40

MET 159 6,00

LYS 161 52,50

LYS 162 1,70

LEU 163 12,30

LEU 164 55,10

ALA 165 10,10

VAL 166 10,60

PRO 167 45,50

ALA 168 22,60

ALA 169 63,60

ASN 170 75,40

THR 171 83,00

VAL 172 1,70

ARG 173 91,70

PHE 174 1,50

ARG 175 95,60

PRO 177 15,90

GLY 202 2,10

LYS 205 63,40

ARG 207 67,60

GLN 210 31,60

SER 212 0,40
 VAL 214 26,40
 GLU 216 48,90
 SER 217 1,80
 TYR 241 15,90
 LEU 246 3,10
 GLU 247 1,80
 ARG 248 46,90
 TYR 278 32,20
 SER 279 1,80
 ASP 280 19,80
 ALA 281 3,00
 GLN 282 24,80
 PRO 283 0,50
 SER 314 1,20
 GLU 315 82,60
 SER 316 33,20
 VAL 317 56,60
 GLU 318 51,50

Tác giả sáng chế đã so sánh cấu trúc R3Mab-FGFR3 với cấu trúc đã công bố trước đó của FGFR3-IIIc trong phức hợp với FGF1 (4, 35) (Fig.10E, 10F). Sự chồng chập của các phức hợp kháng thể-thụ thể và phối tử-thụ thể cho thấy rằng không có các khác biệt về cấu hình trong các miền thụ thể đơn lẻ, trừ vùng mà phân biệt FGFR3-IIIc với FGFR3-IIIb; tuy nhiên, sự định hướng của IgD3 so với IgD2 khác nhau nhiều (Fig.10E, màu trắng và màu ghi; Fig.10F, màu trắng và ghi gạch). Do vị trí tương đối của IgD2 và IgD3 là quan trọng đối với sự liên kết phối tử, cấu hình thay thế được tiếp nhận bởi IgD3 khi liên kết R3Mab có thể tạo ra cơ chế bổ sung để ngăn chặn tương tác phối tử với FGFR3.

R3Mab ức chế WT nội sinh và FGFR3 đột biến trong tế bào ung thư bàng quang

Để đánh giá xem R3Mab có thể ức chế chức năng FGFR3 trong tế bào ung thư bàng quang hay không, trước tiên tác giả sáng chế kiểm tra dòng tế bào RT112 và RT4, mà biểu hiện WT FGFR3. R3Mab ức chế mạnh sự kết hợp [³H]-thymidin bởi tế bào RT112 (Fig.11A) và gây ra tác dụng ức chế đáng kể sự tăng sinh tế bào RT4, mặc dù nhẹ hơn (Fig.19A). Để kiểm tra tác dụng của R3Mab đối với sự hoạt hóa FGFR3, chúng tôi kiểm tra sự phosphoryl hóa FGFR3 trong tế bào RT112. Phù hợp với các kết quả trong tế bào Ba/F3-FGFR3 (Fig.9B), R3Mab làm suy yếu đáng kể sự phosphoryl hóa FGFR3 được cảm ứng bởi FGF1 (Fig.11B). Tiếp theo tác giả sáng chế kiểm tra sự phosphoryl hóa của FRS2 α , AKT, và p44/42 MAPK, ba chất trung gian xuôi dòng của quá trình dẫn truyền tín hiệu FGFR3. FGF1 hoạt hóa mạnh các phân tử này trong tế bào RT112, trong khi R3Mab làm giảm đáng kể sự hoạt hóa này (Fig.11B). Tương tự, R3Mab ức chế sự phosphoryl hóa FGFR3 và MAPK được cảm ứng bởi FGF1 trong tế bào RT4 (Fig.19B).

Tiếp theo chúng tôi kiểm tra xem R3Mab có thể ức chế sự hoạt hóa FGFR3 đột biến nội sinh trong tế bào ung thư bàng quang người hay không. S249C là đột biến FGFR3 phổ biến nhất trong ung thư bàng quang (Fig.9C). Hai dòng tế bào có sẵn, UMUC-14 và TCC-97-7, mang alen FGFR3^{S249C} đột biến (Ref. 36 và số liệu không được thể hiện). Mặc dù R3Mab không tác động đến sự phát triển theo số mũ của tế bào UMUC-14 trong môi trường nuôi cấy (số liệu không được thể hiện), nó làm giảm đáng kể sự phát triển dòng của các tế bào này (Fig.11C). Cụ thể là, R3Mab làm giảm số lượng khuẩn lạc có đường kính lớn hơn 120 μ m xấp xỉ 77% so với kháng thể đối chứng (Fig.11D). Ngoài ra, R3Mab ức chế sự kết hợp [³H]-thymidin bởi tế bào TCC-97-7 trong môi trường nuôi cấy (Fig.19C).

Đột biến S249C được báo cáo là gây ra sự hoạt hóa FGFR3 độc lập phối tử (26, 30). Quả thật, FGFR3^{S249C} được phosphoryl hóa cơ định bất kể có xử lý FGF1 trong tế bào UMUC-14 và tế bào TCC-97-7 hay không, trong khi R3Mab làm giảm sự phosphoryl hóa cơ định của FGFR3^{S249C} so với kháng thể đối chứng ở cả hai dòng tế bào (Fig. 11E, 19D).

R3Mab ức chế sự tạo thành dime bởi FGFR3^{S249C}

Khả năng R3Mab ức chế sự dẫn truyền tín hiệu FGFR3^{S249C} cơ định và sự tăng sinh trong tế bào ung thư bàng quang là bất ngờ, cân nhắc rằng đột biến này có thể trái

qua sự dime hóa độc lập phối tử, được liên kết disulfua (26, 30). Để khảo sát cách R3Mab ức chế FGFR3^{S249C}, chúng tôi kiểm tra tác dụng của R3Mab đối với trạng thái oligome của đột biến này trong tế bào UMUC-14. Trong điều kiện khử, FGFR3^{S249C} di chuyển như một dải đơn ~97 kDa, phù hợp với kích thước monome (Fig.12A). Trong điều kiện không khử, trong tế bào được điều trị bằng kháng thể đối chứng, một đoạn lớn của FGFR3^{S249C} xuất hiện dưới dạng dải ~200 kDa, bất kể việc bổ sung FGF1, chỉ ra trạng thái dime hóa cơ định (Fig.12A). Việc xử lý R3Mab gần như làm giảm lượng dime, đồng thời làm tăng các monome (Fig.12A). Phù hợp là, R3Mab làm giảm mức FGFR3^{S249C} dime trong tế bào TCC-97-7 không quan tâm đến việc có xử lý FGF1 hay không (Fig.19E).

R3Mab làm giảm mức dime FGFR3^{S249C} trong tế bào ung thư bàng quang như thế nào? Một cách giải thích có khả năng là nó có thể phá vỡ dime FGFR3^{S249C} nhờ sự nội nhập FGFR3 được cảm ứng bởi kháng thể và vận chuyển qua các thể nhân hoặc lysosom. Tác giả sáng chế đã kiểm tra khả năng này bằng can thiệp được học vào sự nhập bào. Tuy nhiên, R3Mab làm giảm lượng dime trong tế bào UMUC-14 đã được điều trị bằng nhiều chất ức chế nhập bào khác nhau, dù có sự phong bế đáng kể quá trình nội nhập FGFR3^{S249C} (Fig.20 A, B). Do đó, việc phá vỡ dime bằng R3Mab độc lập với sự nhập bào. Một cách giải thích có khả năng khác là FGFR3^{S249C} tế bào có thể tồn tại ở trạng thái cân bằng động học monome-dime; theo đó, liên kết R3Mab với FGFR3^{S249C} dạng monome có thể ngăn sự tạo thành dime và nhờ đó chuyển trạng thái cân bằng về phía trạng thái monome. Để kiểm tra khả năng này, tác giả sáng chế sử dụng chất không thấm tế bào axit 5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic (DTNB), mà phản ứng chọn lọc với và phong bế nhóm sulfhydryl tự do của các cystein không bắt cặp (37). Việc xử lý tế bào UMUC-14 với DTNB dẫn đến sự tích lũy monome FGFR3^{S249C} làm giảm dime (Fig.12B), chỉ ra rằng FGFR3^{S249C} tồn tại ở trạng thái cân bằng động học giữa monome và dime.

Để kiểm tra xem R3Mab có ảnh hưởng đến trạng thái cân bằng này hay không, tác giả sáng chế tạo ra protein tái tổ hợp hòa tan chứa miền IgD2-D3 của FGFR3^{S249C} và phân lập dime bằng sắc ký loại trừ kích cỡ. Tác giả sáng chế ủ dime với đệm hoặc các kháng thể khi có mặt nồng độ rất thấp của chất khử (25 μ M DTT), và phân tích trạng thái oligome hóa của thụ thể bằng SDS-PAGE trong điều kiện không khử. R3Mab làm tăng đáng kể sự xuất hiện của dải ~25 kDa đại diện cho FGFR3^{S249C} monome và làm giảm dime ~50 kDa, so với các đối chứng giả hoặc đối chứng kháng thể (Fig.12C); quả thật,

sau 2 giờ sự giảm đime gần như hoàn toàn hơn khi có mặt R3Mab. Các kết quả này thể hiện rằng R3Mab dịch chuyển trạng thái cân bằng giữa trạng thái monome và đime của FGFR3^{S249C} về phía monome.

R3Mab không thúc đẩy sự điều hòa giảm FGFR3

Chúng tôi kiểm tra tác dụng của R3Mab (dòng 184.6.1) và các kháng thể lai kháng FGFR3 đối với sự điều hòa giảm FGFR3 bằng cách phân tích sự nội nhập FGFR3 và sự thoái hóa tế bào được xử lý bằng kháng thể FGFR3. Dòng tế bào ung thư bàng quang biểu hiện FGFR3 kiểu đại (RT112) hoặc FGFR3 đột biến (S249C trong TCC97-7) được xử lý bằng R3Mab hoặc các kháng thể lai 1G6 hoặc 6G1 trong 4 đến 24 giờ, sau đó dịch dung giải tế bào được thu hoạch cho phân tích thẩm tách western tổng các mức FGFR3. Việc xử lý với R3Mab không làm giảm mức FGFR3, trong khi việc xử lý với các mab tế bào lai 1G6 và 6G1 làm giảm đáng kể mức FGFR3. Các kết quả này cho thấy rằng R3Mab không thúc đẩy sự điều hòa giảm FGFR3 trong khi các mab 1G6 và 6G1 thúc đẩy sự nội nhập và điều hòa giảm thụ thể FGFR3. Trong thử nghiệm riêng, mức FGFR3 bề mặt được kiểm tra sử dụng phân tích FACS. Sau 24 giờ điều trị R3Mab (dòng 184.6.1) cho tế bào UMUC-14 (chứa đột biến FGFR3 S249C), mức FGFR3 bề mặt tế bào tăng nhẹ. Các kết quả này chứng minh rằng việc xử lý bằng R3Mab không thúc đẩy sự điều hòa giảm FGFR3.

R3Mab ức chế sự phát triển và dẫn truyền tín hiệu FGFR3 trong nhiều mô hình khối u

Tiếp theo, tác giả sáng chế kiểm tra tác dụng của R3Mab đối với sự phát triển của tế bào ung thư bàng quang in vivo. Tác giả sáng chế đã tiêm tế bào RT112 vào chuột nu/nu (mà biểu hiện WT FGFR3), cho phép khối u phát triển đến thể tích trung bình là ~150 mm³, và cho các con vật dùng liều hai lần một tuần với tá dược lỏng hoặc R3Mab. So với đối chứng tá dược lỏng, ở ngày 27, việc xử lý R3Mab ở 5 hoặc 50 mg/kg ức chế sự phát triển khối u lần lượt khoảng 41% hoặc 73% (Fig.13A). Sự phân tích dịch dung giải khối u được thu gom 48 giờ hoặc 72 giờ sau khi xử lý cho thấy rằng R3Mab làm giảm rõ rệt mức FRS2 α được phosphoryl hóa (Fig.13B). Bất ngờ là, mức protein FRS2 α toàn phần cũng thấp hơn ở các khối u được xử lý bằng R3Mab, cho thấy rằng tác dụng ức chế FGFR3 có thể còn dẫn đến sự điều hòa giảm FRS2 α . R3Mab còn làm giảm lượng MAPK được phosphoryl hóa trong các khối u, mà không ảnh hưởng đến mức MAPK

toàn phần (Fig.13B). Do đó, R3Mab ức chế sự phát triển của các mô ghép ngoại lai khối u RT112 kết hợp với việc phong bế sự dẫn truyền tín hiệu bởi WT FGFR3.

Tiếp theo tác giả sáng chế kiểm tra tác dụng của R3Mab đối với sự phát triển của các mô ghép ngoại lai biểu hiện FGFR3 đột biến. Việc xử lý bằng R3Mab đã làm suy yếu mạnh sự phát triển của khối u Ba/F3-FGFR3^{S249C} (Fig.13C). Hơn nữa, R3Mab ức chế đáng kể sự phát triển của mô ghép ngoại lai caxinom bàng quang UMUC-14 (Fig.13D). Để đánh giá xem R3Mab có ảnh hưởng tới sự hoạt hóa FGFR3^{S249C} in vivo hay không, tác giả sáng chế đánh giá mức đime FGFR3^{S249C} trong dịch dung giải khối u được thu gom 24 giờ hoặc 72 giờ sau khi điều trị. Trong điều kiện không khử, lượng đime FGFR3^{S249C} gần như là thấp hơn trong khối u được xử lý bằng R3Mab so với nhóm đối chứng, trong khi đó mức FGFR3^{S249C} toàn phần, như được đánh giá bằng lượng được phát hiện trong điều kiện khử, cho thấy ít thay đổi (Fig.13E). Không có sự tích lũy rõ ràng monome FGFR3^{S249C} được quan sát thấy trong dịch dung giải khối u, ngược với kết quả trong môi trường nuôi cấy tế bào (Fig.13E vs. 12A). Điều này có thể là do độ nhạy phát hiện yếu đối với FGFR3 monome trong điều kiện không khử bởi kháng thể đa dòng của thử kháng FGFR3 được sử dụng trong nghiên cứu này (Fig.21). Quan trọng là, R3Mab còn ức chế đáng kể sự phosphoryl hóa và hoạt hóa MAPK trong khối u UMUC-14 (Fig.13E), thể hiện rằng R3Mab ức chế hoạt tính của FGFR3^{S249C} in vivo. Chúng tôi không quan sát thấy sự giảm khối lượng đáng kể bất kỳ hoặc các bất thường chung khác trong nghiên cứu in vivo bất kỳ. Ngoài ra, trong nghiên cứu về độ an toàn được thực hiện ở các con chuột, R3Mab, mà liên kết với ái lực tương tự với cả FGFR3 người và chuột, không gây ra độc tính phân biệt được bất kỳ trong cơ quan bất kỳ, bao gồm bàng quang (số liệu không được thể hiện). Cùng với nhau, các số liệu này thể hiện rằng nhiều lần tiếp xúc với R3Mab được dung nạp tốt ở chuột.

Hoạt tính chống khối u của R3Mab trong các mô hình ghép ngoại lai đa u tủy bao gồm ADCC

Để đánh giá xem R3Mab có thể có khả năng điều trị bệnh đa u tủy hay không, trước tiên tác giả sáng chế kiểm tra tác dụng của R3Mab đối với sự tăng sinh và khả năng sống sót của ba dòng tế bào t(4;14)+ trong môi trường nuôi cấy. Tế bào UTMC-2 mang WT FGFR3, trong khi OPM2 và KMS11 lần lượt mang đột biến thể K650E và Y373C (7). Trong môi trường nuôi cấy, R3Mab làm mất hoàn toàn sự tăng sinh tế bào UTMC-2

được cảm ứng bởi FGF9 (Fig.22A). R3Mab ức chế vừa phải sự phát triển của tế bào OPM2, nhưng không gây tác dụng rõ ràng đối với sự tăng sinh của tế bào KMS11 (Fig.22 B, C). Do tế bào UTM2 không tạo thành khối u ở chuột, tác giả sáng chế đánh giá tính hiệu quả của R3Mab kháng khối u OPM2 và KMS11. R3Mab gần như là loại bỏ hoàn toàn sự phát triển khối u ghép ngoại lai của cả hai dòng tế bào (Fig.14 A, B).

Sự khác biệt đáng kể về hoạt tính của R3Mab kháng tế bào khối u OPM2 và KMS11 in vitro và in vivo cho thấy khả năng là R3Mab có thể có khả năng hỗ trợ chức năng hiệu ứng miễn dịch qua trung gian Fc kháng lại các khối u biểu hiện quá mức FGFR3. Cả hai dòng tế bào này đều biểu hiện mức CD55 và CD59 cao (số liệu không được thể hiện), hai chất ức chế con đường bổ thể; do đó, tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể không được quan sát thấy (số liệu không được thể hiện). Sau đó chúng tôi tập trung vào ADCC. ADCC xuất hiện khi kháng thể liên kết với kháng nguyên của nó trên tế bào đích, và thông qua vùng Fc của nó, gắn với thụ thể Fcγ (FcγRs) được biểu hiện trên tế bào hiệu ứng miễn dịch (38). Để kiểm tra ADCC in vitro, chúng tôi ủ tế bào KMS11 hoặc OPM2 với tế bào đơn nhân máu ngoại vi người mới được phân lập (PBMC) khi có mặt R3Mab hoặc kháng thể đối chứng. Hoạt tính dung giải tế bào PBMC đáng kể do R3Mab kháng cả hai dòng tế bào u tủy (Fig.14 C, D). Ngược lại, R3Mab không hỗ trợ sự dung giải tế bào của tế bào ung thư bàng quang RT112 hoặc UMUC-14 (Fig.14 E, F). Như được xác định bằng phân tích Scatchard, tế bào đa u tủy biểu hiện FGFR3 bề mặt tế bào nhiều hơn đáng kể so với dòng tế bào caxinom bàng quang (nhiều thụ thể hơn ~ 5 đến 6 lần cho mỗi tế bào; Fig.23 A, B).

Để giải thích sự đóng góp của ADCC vào hoạt tính của R3Mab in vivo, chúng tôi đưa đột biến D265A/N297A (DAA) đã được phân tích trên đây vào miền Fc của kháng thể. Đột biến thể kép này trong miền Fc của kháng thể loại bỏ liên kết của nó với FcγRs (39), ngăn cản sự huy động tế bào hiệu ứng miễn dịch. Đột biến DAA không làm thay đổi liên kết R3Mab với FGFR3 hoặc ức chế hoạt tính FGFR3 in vitro, nó cũng không làm thay đổi dược động học của R3Mab ở các con chuột (số liệu không được thể hiện); tuy nhiên, nó gần như loại bỏ hoạt tính in vivo kháng mô ghép ngoại lai OPM2 hoặc KMS11 (Fig.14 G, H). Ngược lại, đột biến DAA không làm thay đổi hoạt tính kháng khối u của R3Mab đối với mô ghép ngoại lai ung thư bàng quang RT112 và UMUC-14 (Fig.24 A, B). Các kết quả này cùng cho thấy rằng ADCC phụ thuộc Fc đóng vai trò quan trọng trong hiệu lực của R3Mab kháng mô ghép ngoại lai đa u tủy OPM2 và KMS11.

Các nghiên cứu mô ghép ngoại lai bổ sung

R3Mab (dòng 184.6.1N54S) còn được phân tích như sau:

(a) R3Mab được kiểm tra về hiệu quả *in vivo* bằng cách sử dụng mô hình ghép ngoại lai khối u dựa trên dòng tế bào ung thư gan (Huh7) cần thiết như nêu trên. Khi được kiểm tra ở nồng độ kháng thể là 5 mg/kg và 30 mg/kg, R3Mab ức chế đáng kể sự phát triển khối u *in vivo*. Sự phát triển khối u được ức chế khoảng 50% so với sự phát triển khối u ở động vật đối chứng.

(b) R3Mab được kiểm tra về hiệu quả *in vivo* bằng cách sử dụng mô hình ghép ngoại lai khối u dựa trên dòng tế bào ung thư vú (Cal-51) mà biểu hiện FGFR3 như được mô tả trên đây. Các kết quả từ nghiên cứu về hiệu lực cho thấy rằng kháng thể R3Mab có khả năng ức chế khối u *in vivo* khi được kiểm tra ở nồng độ kháng thể nằm trong khoảng từ 1 mg/kg đến 100 mg/kg. Sự phát triển khối u được ức chế khoảng 30% so với sự phát triển khối u ở động vật đối chứng.

Thảo luận

Sự kết hợp của biểu hiện quá mức FGFR3 có tiên lượng kém ở các bệnh nhân đa u tủy t(4;14)+ và hoạt tính biến nạp của FGFR3 được hoạt hóa trong một số mô hình thử nghiệm chứng minh FGFR3 là gen điều khiển gây bệnh ung thư quan trọng và do đó là đích điều trị tiềm năng trong bệnh lý huyết học ác tính. Ngược lại, dù các báo cáo về tần suất cao của đột biến và/hoặc sự biểu hiện quá mức của FGFR3 trong caxinom bàng quang (24, 25, 40), vai trò quan trọng đối với sự dẫn truyền tín hiệu FGFR3 ở bệnh ung thư biểu mô này chưa được thiết lập *in vivo*. Ngoài ra, khả năng điều trị của tác dụng ức chế FGFR3 trong ung thư bàng quang chưa được xác định. Ở đây, tác giả sáng chế chỉ ra rằng sự can thiệp di truyền hoặc dược học vào FGFR3 ức chế sự phát triển của một số mô ghép ngoại lai ung thư bàng quang người ở chuột. Các kết quả này chứng minh rằng chức năng FGFR3 là quan trọng đối với sự phát triển khối u trong hệ thống này, nhấn mạnh tầm quan trọng tiềm năng của thụ thể này như là gen điều khiển gây ung thư và đích điều trị trong ung thư bàng quang. Sự phong bế chức năng FGFR3 ức chế giống nhau sự phát triển của các mô ghép ngoại lai biểu hiện FGFR3 WT hoặc đột biến, cho thấy rằng cả hai dạng của thụ thể có thể tham gia đáng kể vào sự phát triển khối u bàng quang. Mặc dù ít gặp hơn nhiều so với trong ung thư bàng quang, các đột biến FGFR3 hoặc sự biểu hiện quá mức FGFR3 đã được xác định trong khối u rắn ác tính khác, bao gồm caxinom cổ tử

cung (40), caxinom tế bào gan (41) và ung thư phổi tế bào không nhỏ (42, 43), cho thấy sự tham gia hiệu quả của FGFR3 vào loại ung thư biểu mô khác.

Sự liên quan rõ ràng của FGFR3 trong các bệnh ác tính đa dạng xác nhận thụ thể này là ứng viên hấp dẫn cho liệu pháp gắn đích. Mặc dù hợp chất phân tử nhỏ mà có thể ức chế hoạt tính kinaza FGFR3 đã được mô tả (18-22, 44), độ tương đồng gần của miền kinaza trong họ FGFR đã cản trở sự phát triển của chất ức chế chọn lọc FGFR3. Sự thiếu tính chọn lọc của chất ức chế đã báo cáo gây khó khăn cho việc phân biệt sự tham gia tương đối của FGFR3 vào sinh học của nhiều loại ung thư cụ thể; ngoài ra, nó có thể có nguy cơ về độ an toàn, vượt mức liều tối đa và do đó hạn chế tác dụng ức chế tối ưu của FGFR3. Do đó, để đạt được sự gắn đích chọn lọc và đặc hiệu FGFR3, tác giả sáng chế chuyển sang chiến lược dựa trên kháng thể. Tác giả sáng chế suy luận rằng kháng thể điều trị tối ưu cần có khả năng phong bế không chỉ WT mà còn các đột biến liên quan đến ung thư chiếm ưu thế của FGFR3. Ngoài ra, mặc dù việc đime hóa FGFR3 là quan trọng đối với sự hoạt hóa của nó, kháng thể mà không chỉ phong bế sự liên kết phối tử mà còn cản trở sự đime hóa thụ thể có thể là tốt hơn. Các tính chất mong muốn khác sẽ bao gồm khả năng hỗ trợ chức năng hiệu ứng do Fc và thời gian bán thải huyết thanh dài được tạo ra bởi khung tự nhiên của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Tác giả sáng chế tập trung vào các nỗ lực sàng lọc và thao tác di truyền để xác định phân tử kháng thể mà kết hợp tất cả các đặc điểm này, dẫn đến việc tạo thành R3Mab. Các nghiên cứu liên kết chứng minh khả năng R3Mab cạnh tranh với phối tử FGF để tương tác với cả hai đồng dạng IIIb và IIIc của FGFR3. Các thử nghiệm khác với dòng tế bào BaF/3 đã chuyển nhiệm khẳng định khả năng đáng chú ý của R3Mab trong việc phong bế cả FGFR3 WT và đột biến FGFR3 liên quan đến bệnh ung thư phổ biến. Ngoài ra, R3Mab gây ra hoạt tính kháng khối u đáng kể ở một số mô hình ghép ngoại lai của ung thư bàng quang biểu hiện WT FGFR3 hoặc FGFR3^{S249C}, mà là đột biến phổ biến nhất của thụ thể này ở bệnh này. Các nghiên cứu được động lực học cho thấy rằng hoạt tính kháng khối u R3Mab ở các mô hình này được dựa trên tác dụng ức chế sự dẫn truyền tín hiệu FGFR3, rõ ràng nhờ sự phosphoryl hóa giảm của chất điều biến xuôi dòng FRS2 α và MAPK của nó. Các số liệu này còn củng cố thêm cho kết luận rằng FGFR3 là cần thiết đối với sự phát triển khối u bàng quang, như được chứng minh bởi các nghiên cứu FGFR3 shARN của tác giả sáng chế.

Các đột biến FGFR3 trong ung thư bàng quang thể hiện một trong số các biến đổi gây bệnh ung thư phổ biến nhất của protein kinaza trong ung thư hắc tố, làm nhớ đến đột biến phổ biến của B-Raf trong khối u ác tính (45). Phần lớn các đột biến hoạt hóa trong FGFR3 tạo ra xystein không bắt cặp, dẫn đến sự đime hóa thụ thể độc lập phối tử và các mức hoạt hóa cơ định khác nhau. Nghiên cứu trước đây sử dụng mảnh Fab hóa trị một kháng FGFR3 chỉ ra hoạt tính ức chế khác biệt kháng đột biến FGFR3 đặc hiệu (46); tuy nhiên, cơ sở phân tử cho tác dụng biến đổi này không được khảo sát. So với các mảnh kháng thể hóa trị một, các kháng thể hóa trị hai có khả năng cảm ứng cụm kháng nguyên, và trong trường hợp thụ thể tyrosin kinaza, có thể gây ra sự oligome hóa và hoạt hóa thụ thể. Dù có chiều dài đầy đủ, cấu hình hóa trị hai, R3Mab thể hiện tác dụng ức chế chung WT FGFR3 và có phổ các đột biến FGFR3 rộng, gồm các biến thể mà là phụ thuộc phối tử (FGFR3^{G372C}, FGFR3^{Y375C}), hoạt tính cơ định (FGFR3^{R248C}, FGFR3^{S249C}), hoặc cả hai (FGFR3^{K552E}). Các kết quả này đặt ra câu hỏi: làm thế nào R3Mab đối kháng cả WT FGFR3 và các đột biến FGFR3 khác nhau, bao gồm biến thể được liên kết disulfua.

Dựa trên sự sắp xếp thẳng hàng trình tự FGFR1, epitop peptit được nhận diện bởi R3Mab chồng lên các gốc FGFR3 tham gia vào liên kết với phối tử và heparin, cũng như đime hóa thụ thể. Kết luận này được khẳng định bằng các nghiên cứu tinh thể học của phức hợp giữa R3Mab và vùng ngoại bào của FGFR3. Cấu trúc tia X cho thấy rằng kháng thể liên kết với vùng của IgD2 và IgD3 mà là quan trọng đối với tương tác phối tử-thụ thể cũng như tiếp xúc thụ thể-thụ thể. Do đó, R3Mab có thể phong bế WT FGFR3 cả bằng cách cạnh tranh liên kết phối tử và bằng cách ngăn cản sự đime hóa thụ thể. R3Mab có thể sử dụng cơ chế tương tự để ức chế FGFR3^{K652E}, mà có hoạt tính cơ định thấp, nhưng yêu cầu phối tử để hoạt hóa đầy đủ. Ngoài ra, liên kết R3Mab làm thay đổi hướng tương đối của FGFR3 IgD3 đối với IgD2. Phát hiện này đưa đến khả năng chính là kháng thể có thể còn ức chế sự hoạt hóa thụ thể bằng cách thúc đẩy cấu hình mà không thuận lợi cho sự dẫn truyền tín hiệu – lưu ý rằng cần nghiên cứu thêm.

Để hiểu rõ hơn về cách R3Mab phong bế các biến thể FGFR3 có xystein không bắt cặp, tác giả sáng chế phân tích đột biến phổ biến nhất, FGFR3^{S249C}, chi tiết hơn. Các thử nghiệm với chất phong bế DTNB không chứa sulfhydryl chỉ ra trạng thái cân bằng động học giữa dạng monome và đime của FGFR3^{S249C}. Trạng thái cân bằng tương tự giữa trạng thái oxy hóa và trạng thái khử được điều biến bằng chất điều hòa oxy hóa khử nội sinh đã được báo cáo đối với các thụ thể NMDA (46). Việc ủ tế bào ung thư bàng quang

biểu hiện FGFR3^{S249C} với R3Mab dẫn đến sự giảm số lượng của đime thụ thể và sự tăng đồng thời mức monome. Ngoài ra, mảnh IgD2-D3 đã tinh chế của FGFR3^{S249C} tạo thành đime trong dung dịch; khi được ủ với R3Mab, đime không xuất hiện ổn định trong khi FGFR3^{S249C} dạng monome được tích lũy. Cùng với phân tích cấu trúc, các kết quả này cho thấy rằng R3Mab bắt giữ FGFR3^{S249C} dạng monome và cản trở sự đime hóa của nó. Theo thời gian, R3Mab chuyển trạng thái cân bằng về phía dạng monome, phong bế hoạt tính thụ thể cơ định. Cơ chế này có thể còn giải thích cách R3Mab ức chế các đột biến xystein khác của FGFR3.

Phát hiện quan trọng khác của nghiên cứu này là hoạt tính kháng khối u hiệu quả của R3Mab kháng t(4;14)+ dòng tế bào đa u tủy OPM2 và KMS11 in vivo. Ngược lại, R3Mab có tác động vừa phải đến tối thiểu đến sự tăng sinh hoặc khả năng sống sót của các tế bào này trong môi trường nuôi cấy. Tế bào OPM2 và KMS11 biểu hiện mức FGFR3 bề mặt tế bào tương đối cao (cao hơn 5-6 lần so với tế bào caxinom bàng quang RT112 và UMUC-14). Mật độ kháng nguyên cao hơn có thể cho phép R3Mab hỗ trợ huy động hiệu quả tế bào hiệu ứng miễn dịch mang FcγR và hoạt hóa ADCC. Quả thật, khi có mặt PBMC người, R3Mab điều tiết sự dung giải tế bào của tế bào OPM2 và KMS11, nhưng không phải với tế bào ung thư bàng quang RT112 hoặc UMUC-14. Ngoài ra, dạng đột biến DAA của R3Mab, mà không có khả năng liên kết FcγR, không có tác dụng đối với sự phát triển KMS11 hoặc OPM2 in vivo, nhưng vẫn ức chế sự phát triển của khối u RT112 và UMUC-14 tương tự với R3Mab. Các số liệu này cùng thể hiện là R3Mab có cơ chế kép của hoạt tính chống khối u: (a) trong tế bào biểu hiện WT FGFR3 hoặc FGFR3 đột biến với các mức bề mặt thấp hơn, nó phong bế sự dẫn truyền tín hiệu phụ thuộc phối tử hoặc cơ định; (b) trong tế bào biểu hiện FGFR3 bề mặt với mức tương đối cao, nó cảm ứng ADCC.

Kết quả của tác giả sáng chế cũng làm xuất hiện một số câu hỏi mới. Thứ nhất, chưa biết là tại sao dòng tế bào ung thư bàng quang được kiểm tra trong thử nghiệm này biểu hiện độ nhạy thay đổi với R3Mab. Đáp ứng khác biệt này, mà thường phổ biến đối với liệu pháp gắn đích, có thể là sự phản ánh cấu tạo gen khác biệt của từng khối u. Quả thật, tế bào ung thư vú dương tính với Her2 thể hiện độ nhạy thay đổi với kháng thể kháng Her2 (48), cũng giống như các tế bào ung thư khác nhau đáp ứng với kháng thể kháng EGFR (49). Trong trường hợp này, sự phát triển của các mô hình in vivo bổ sung đối với bệnh ung thư bàng quang có WT FGFR3 và FGFR3 đột biến cần phải được đánh

giá độ nhạy với phân tử FGFR3 ở động vật một cách khẩn cấp. Ngoài ra, việc làm sáng tỏ về gen đánh dấu sinh học dự đoán được có thể giúp nhận diện các bệnh nhân có thể hưởng lợi ích tối ưu từ liệu pháp gắn đích FGFR3. Thứ hai, vì R3Mab không gây thoái hóa khối u trong các mô hình tác giả sáng chế đã kiểm tra, các nghiên cứu tiếp theo cần khảo sát xem R3Mab có thể kết hợp với các dược chất đã được thiết lập không.

Kết luận, các phát hiện của tác giả sáng chế cho thấy WT FGFR3 và FGFR3 đột biến đều là quan trọng đối với sự phát triển ung thư bàng quang, do đó mở rộng sự liên quan đến việc gây bệnh ung thư in vivo của thụ thể này từ bệnh lý huyết học ác tính đến ung thư biểu mô. Ngoài ra, kết quả của tác giả sáng chế chứng minh rằng cả WT FGFR3 và FGFR3 đột biến có thể được gắn đích hiệu quả trong khối u có kháng thể có chiều dài đầy đủ mà kết hợp khả năng phong bế liên kết phối tử, dime hóa thụ thể và dẫn truyền tín hiệu, cũng như thúc đẩy sự dung giải tế bào khối u bằng ADCC. Các kết quả này cho thấy sự hợp lý trong việc khảo sát liệu pháp gắn đích FGFR3 dựa trên kháng thể trong các bệnh ác tính đa dạng có liên quan đến thụ thể này.

Một phần danh sách tài liệu tham khảo

1. Eswarakumar, V.P., Lax, I., and Schlessinger, J. 2005. Cellular signaling by fibroblast Growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:139-149.
2. L'Hote, C.G., and Knowles, M.A. 2005. Cell responses to FGFR3 signalling: Growth, differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res* 304:417-431.
3. Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., and Basilico, C. 2005. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:233-247.
4. Mohammadi, M., Olsen, S.K., and Ibrahimi, O.A. 2005. Structural basis for fibroblast Growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:107-137.
5. Grose, R., and Dickson, C. 2005. Fibroblast Growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:179-186.
6. Chang, H., Stewart, A.K., Qi, X.Y., Li, Z.H., Yi, Q.L., and Trudel, S. 2005. Immunohistochemistry accurately predicts FGFR3 aberrant expression and t(4;14) in multiple myeloma. *Blood* 106:353-355.

7. Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. 1997. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast Growth factor receptor 3. *Nat Genet* 16:260-264.
8. Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M.M., Kyle, R.A., Dewald, G.W., Van Ness, B., Van Wier, S.A., Henderson, K.J., et al. 2003. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 101:4569-4575.
9. Moreau, P., Facon, T., Leleu, X., Morineau, N., Huyghe, P., Harousseau, J.L., Bataille, R., and Avet-Loiseau, H. 2002. Recurrent 14q32 translocations determine prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 100:1579-1583.
10. Pollett, J.B., Trudel, S., Stern, D., Li, Z.H., and Stewart, A.K. 2002. Overexpression of the myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 confers dexamethasone resistance. *Blood* 100:3819-3821.
11. Bernard-Pierrot, I., Brams, A., Dunois-Larde, C., Caillaud, A., Diez de Medina, S.G., Cappellen, D., Graff, G., Thiery, J.P., Chopin, D., Ricol, D., et al. 2006. Oncogenic properties of mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis* 27:740-747.
12. Agazie, Y.M., Movilla, N., Ischenko, I., and Hayman, M.J. 2003. phosphotyrosine phosphatase SHP2 is critical mediator of transformation induced oncogenic fibroblast growth factor receptor 3. *Oncogene* 22:6909-6918.
13. Ronchetti, D., Greco, A., Compasso, S., Colombo, G., Dell'Era, P., Otsuki, T., Lombardi, L., and Neri, A. 2001. Điều kiện FGFR3 mutations in multiple myeloma cell line with t(4;14): comparative analysis of Y373C, K650E and novel G384D các đột biến. *Oncogene* 20:3553-3562.
14. Chesi, M., Brents, L.A., Ely, S.A., Bais, C., Robbiani, D.F., Mesri, E.A., Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. 2001. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor pregression in multiple myeloma. *Blood* 97:729-736.

15. Plowright, E.E., Li, Z., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Barber, D.L., Branch, D.R., Hawley, R.G., and Stewart, A.K. 2000. Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis. *Blood* 95:992-998.
16. Chen, J., Williams, I.R., Lee, B.H., Duclos, N., Huntly, B.J., Donoghue, D.J., and Gilliland, D.G. 2005. Constitutively activated FGFR3 mutations signal through PLCgamma-dependent and -independent pathways for hematopoietic transformation. *Blood* 106:328-337.
17. Li, Z., Zhu, Y.X., Pthápright, E.E., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Patterson, B., Hawley, T.S., Hawley, R.G., and Stewart, A.K. 2001. myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 is transforming in hematopoietic cells. *Blood* 97:2413-2419.
18. Trudel, S., Ely, S., Farooqi, Y., Affer, M., Robbiani, D.F., Chesi, M., and Bergsagel, P.L. 2004. Inhibition fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma. *Blood* 103:3521-3528.
19. Trudel, S., Li, Z.H., Wei, E., Wiesmann, M., Chang, H., Chen, C., Reece, D., Heise, C., and Stewart, A.K. 2005. CHIR-258, novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for potential treatment t(4;14) multiple myeloma. *Blood* 105:2941-2948.
20. Chen, J., Lee, B.H., Williams, I.R., Kutok, J.L., Mitsiades, C.S., Duclos, N., Cohen, S., Adelsperger, J., Okabe, R., Coburn, A., et al. 2005. FGFR3 as a therapeutic target of small molecule inhibitor PKC412 in hematopoietic malignancies. *Oncogen* 24:8259-8267.
21. Paterson, J.L., Li, Z., Wen, X.Y., Masih-Khan, E., Chang, H., Pollett, J.B., Trudel, S., and Stewart, A.K. 2004. Preclinical studies of fibroblast growth factor receptor 3 as a therapeutic target in multiple myeloma. *Br J Haematol* 124:595-603.
22. Grand, E.K., Chase, A.J., Heath, C., Rahemtulla, A., and Cross, N.C. 2004. Targeing FGFR3 in multiple myeloma: inhibition t(4;14)-positive cell by SU5402 and PD173074. *Leukemia* 18:962-966.
23. Gomez-Roman, J.J., Saenz, P., Molina, M., Cuevas Gonzalez, J., Escuredo, K., Santa Cruz, S., Junquera, C., Simon, L., Martinez, A., Gutierrez Banos, J.L., et al.

2005. Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates neoplastic cell growth. *Clin Cancer Res* 11:459-465.

24. Tomlinson, D.C., Baldo, O., Harnden, P., and Knowles, M.A. 2007. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J Pathol* 213:91-98.

25. van Rhijn, B.W., Montironi, R., Zwarthoff, E.C., Jobsis, A.C., and van der Kwast, T.H. 2002. Frequent FGFR3 mutation in urothelial papilloma. *J Pathol* 198:245-251.

26. Tomlinson, D.C., Hurst, C.D., and Knowles, M.A. 2007. Knockdown by shRNA identifies S249C mutation FGFR3 as potential therapeutic target in bladder cancer. *Oncogene* 26:5889-5899.

27. Martinez-Torrecuadrada, J., Cifuentes, G., Lopez-Serra, P., Saenz, P., Martinez, A., and Casal, J.I. 2005. Targeting the extracellular domain of fibroblast growth factor receptor 3 with human single-chain Fv antibodies inhibits bladder carcinoma cell line proliferation. *Clin Cancer Res* 11:6280-6290.

28. Martinez-Torrecuadrada, J.L., Cheung, L.H., Lopez-Serra, P., Barderas, R., Canamero, M., Ferreira, S., Rosenblum, M.G., and Casal, J.I. 2008. Antitumor activity of fibroblast growth factor receptor 3-specific immunotoxins in xenograft mouse model of bladder carcinoma is mediated by apoptosis. *Mol Cancer Ther* 7:862-873.

29. Ornitz, D.M., and Leder, P. 1992. Ligand specificity and heparin dependence of fibroblast growth factor receptors 1 and 3. *J Biol Chem* 267:16305-16311.

30. d'Avis, P.Y., Robertson, S.C., Meyer, A.N., Bardwell, W.M., Webster, M.K., and Donoghue, D.J. 1998. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations responsible for the lethal skeletal dysplasia thanatophoric dysplasia type I. *Cell Growth Differ* 9:71-78.

31. Adar, R., Monsonego-Ornan, E., David, P., and Yaron, A. 2002. Differential activation of cysteine-substitution mutations of fibroblast growth factor receptor 3 is determined by cysteins localization. *J Bone Miner Res* 17:860-868.

32. Knowles, M.A. 2008. Novel therapeutics targets in bladder cancer: mutation and expression of FGF receptors. *Future Oncol* 4:71-83.

33. Naski, M.C., Wang, Q., Xu, J., and Ornitz, D.M. 1996. Graded activation fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet* 13:233-237.
34. Plotnikov, A.N., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., and Mohammadi, M. 1999. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 98:641-650.
35. Olsen, S.K., Ibrahimi, O.A., Raucci, A., Zhang, F., Eliseenkova, A.V., Yayon, A., Basilico, C., Linhardt, R.J., Schlessinger, J., and Mohammadi, M. 2004. Insights into molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:935-940.
36. Jebar, A.H., Hurst, C.D., Tomlinson, D.C., Johnston, C., Taylor, C.F., and Knowles, M.A. 2005. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 24:5218-5225.
37. Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-77.
38. Adams, G.P., and Weiner, L.M. 2005. Đơn dòng antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23:1147-1157.
39. Gong, Q., Ou, Q., Ye, S., Lee, W.P., Cornelius, J., Diehl, L., Lin, W.Y., Hu, Z., Lu, Y., Chen, Y., et al. 2005. Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy. *J Immunol* 174:817-826.
40. Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J.P., and Radvanyi, F. 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 23:18-20.
41. Qiu, W.H., Zhou, B.S., Chu, P.G., Chen, W.G., Chung, C., Shih, J., Hwu, P., Yeh, C., Lopez, R., and Yen, Y. 2005. Over-expression of fibroblast growth factor receptor 3 in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 11:5266-5272.
42. Cortese, R., Hartmann, O., Berlin, K., and Eckhardt, F. 2008. Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1494-1508.
43. Woenckhaus, M., Klein-Hitpass, L., Grepmeier, U., Merk, J., Pfeifer, M., Wild, P., Bettstetter, M., Wuensch, P., Blaszyk, H., Hartmann, A., et al. 2006. Smoking

and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non small-cell lung cancers. *J Pathol* 210:192-204.

44. Xin, X., Abrams, T.J., Hollenbach, P.W., Rendahl, K.G., Tang, Y., Oei, Y.A., Embry, M.G., Swinarda, D.E., Garrett, E.N., Pryer, N.K., et al. 2006. CHIR-258 is efficacious in newly developed fibroblast growth factor receptor 3-biểu hiện orthotopic multiple myeloma model in mice. *Clin Cancer Res* 12:4908-4915.

45. Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. 2002. Mutations of BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954.

46. Trudel, S., Stewart, A.K., Rom, E., Wei, E., Li, Z.H., Kotzer, S., Chumakov, I., Singer, Y., Chang, H., Liang, S.B., et al. 2006. Inhibitory anti-FGFR3 antibody, PRO-001, is cytotoxic to t(4;14) multiple myeloma cell. *Blood* 107:4039-4046.

47. Gozlan, H., and Ben-Ari, Y. 1995. NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection? *Trends Pharmacol Sci* 16:368-374.

48. Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M., and Ullrich, A. 1989. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cell to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9:1165-1172.

49. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J.D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. 1984. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor đơn dòng antibodies. *Cancer Res* 44:1002-1007.

50. Pai, R., Dunlap, D., Qing, J., Mohtashemi, I., Hotzel, K., and French, D.M. 2008. Inhibition fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling. *Cancer Res* 68:5086-5095.

51. Pegram, M., Hsu, S., Lewis, G., Pietras, R., Beryt, M., Sliwkowda, M., Coombs, D., Baly, D., Kabbinavar, F., and Slamon, D. 1999. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and hóa trị liệu agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 18:2241-2251.

52. Lee, C.V., Liang, W.C., Dennis, M.S., Eigenbrot, C., Sidhu, S.S., and Fuh, G. 2004. High-ái lực human antibodies from phage-displayed synthetic Fab thư viện with a single framework scaffold. *J Mol Biol* 340:1073-1093.
53. Liang, W.C., Dennis, M.S., Stawicki, S., Chanthery, Y., Pan, Q., Chen, Y., Eigenbrot, C., Yin, J., Koch, A.W., Wu, X., et al. 2007. Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody thể thực khuẩn library. *J Mol Biol* 366:815-829.
54. Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E., and Shepard, H.M. 1992. Humanization of anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-4289.
55. Sidhu, S.S., Li, B., Chen, Y., Fellouse, F.A., Eigenbrot, C., and Fuh, G. 2004. Phage-displayed antibody thư viện of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J Mol Biol* 338:299-310.
56. Otwinowda, Z.a.M., W. 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 276:307-326.
57. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C., and Read, R.J. 2005. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61:458-464.
58. Emsley, P., and Cowtan, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2126-2132.
59. Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. 1997. Refinement of macromolecular structures by maximum-likelihood methods. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53:240-255.

Mặc dù sáng chế trên được mô tả chi tiết bằng các minh họa và ví dụ với mục đích làm rõ, các mô tả và ví dụ này không được xem là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đối kháng kháng FGFR3 được phân lập, trong đó kháng thể này chứa HVR-L1 bao gồm trình tự RASQDVDTSLA (SEQ ID NO:87), HVR-L2 bao gồm trình tự SASFLYS (SEQ ID NO:88), HVR-L3 bao gồm trình tự QQSTGHPQT (SEQ ID NO:89), HVR-H1 bao gồm trình tự GFTFTSTGIS (SEQ ID NO:84), HVR-H2 bao gồm trình tự GRIYPTSGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:85), và HVR-H3 bao gồm trình tự ARTYGIYDLYVDYTEYVMDY (SEQ ID NO:86).

2. Kháng thể đối kháng kháng FGFR3 theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:132 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:133.

3. Kháng thể đối kháng kháng FGFR3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó kháng thể này không cảm ứng sự điều hòa giảm FGFR3 đáng kể và/hoặc dạng hóa trị hai của kháng thể không có chức năng chủ vận đáng kể.

4. Kháng thể đối kháng kháng FGFR3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó kháng thể liên kết với polypeptit chứa trình tự axit amin có tỷ lệ tương đồng hoặc đồng nhất trình tự ít nhất là 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% với trình tự axit amin LAVPAANTVRFRCPA (SEQ ID NO:179) và/hoặc SDVEFHCKVYSDAQP (SEQ ID NO:180).

5. Kháng thể đối kháng kháng FGFR3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó kháng thể này liên kết với ít nhất một, hai, ba, bốn, hoặc số lượng bất kỳ lên đến tất cả các gốc 154, 155, 158, 159, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 202, 205, 207, 210, 212, 214, 216, 217, 241, 246, 247, 248, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 314, 315, 316, 317 và/hoặc 318 của FGFR3 IIIb.

6. Kháng thể đối kháng kháng FGFR3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó kháng thể này ức chế hoạt tính FGFR3 cơ định, cụ thể là hoạt tính FGFR3 phụ thuộc phối tử cơ định và/hoặc hoạt tính FGFR3 cơ định độc lập phối tử, và/hoặc ức chế (a) FGFR3-IIIb^{R248C} và (b) một hoặc nhiều FGFR3-IIIb^{K652E}, FGFR3-IIIb^{Y375C}, FGFR3-IIIb^{S249C}, và FGFR3-IIIb^{G372C}.

7. Kháng thể đối kháng kháng FGFR3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó kháng thể này chứa trình tự khung và ít nhất một phần của trình tự khung là

trình tự khung liên ứng của người cụ thể là trình tự khung liên ứng phân nhóm κ của người và/hoặc trình tự khung liên ứng phân nhóm III chuỗi nặng của người.

8. Kháng thể đối kháng kháng FGFR3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên, trong đó kháng thể này được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể hoàn thiện ái lực, kháng thể người và kháng thể đặc hiệu kép.

9. Kháng thể đối kháng kháng FGFR3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể này là mảnh kháng thể.

10. Kháng thể đối kháng kháng FGFR3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể này có hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể.

11. Polynucleotit mã hóa cho kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm trên.

12. Tế bào chủ chứa vector chứa polynucleotit theo điểm 11.

13. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng FGFR3, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa polynucleotit mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 sao cho polynucleotit này được biểu hiện, và tùy ý, thu hồi kháng thể từ môi trường nuôi cấy này.

14. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 và chất mang dược dụng.

Dòng #	H1									
	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
184.6	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.62	G	F	T	F	S	T	T	G	I	S
184.6.21	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.49	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.51	G	F	S	F	T	G	T	G	I	S
184.6.52	G	F	T	F	Y	T	T	G	I	S
184.6.92	G	F	S	F	W	S	T	G	I	S
184.6.1.N54S	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.N54G	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.N54A	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.N54Q	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54S	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54G	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54A	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.58.N54Q	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S
184.6.1.NS D30E	G	F	T	F	T	S	T	G	I	S

Dòng #	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
184.6	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.62	G	R	I	Y	P	L	Y	G	S	T	H	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.21	G	R	I	Y	P	Y	D	D	S	F	Y	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.49	G	R	I	Y	P	T	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.51	G	S	I	Y	P	Y	F	A	T	K	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.52	G	R	I	Y	P	A	F	G	S	S	I	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.92	G	R	I	Y	P	S	S	A	T	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54S	G	R	I	Y	P	T	S	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54G	G	R	I	Y	P	T	G	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54A	G	R	I	Y	P	T	A	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.N54Q	G	R	I	Y	P	T	Q	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54S	G	R	I	Y	P	T	S	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54G	G	R	I	Y	P	T	G	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54A	G	R	I	Y	P	T	A	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.58.N54Q	G	R	I	Y	P	T	Q	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
184.6.1.NS D30E	G	R	I	Y	P	T	S	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G


FIG. 1A

Dòng #	H3																				
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D							M	101	102
184.6	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.58	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.62	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.21	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.49	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.51	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.52	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.92	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1.N54S	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1.N54G	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1.N54A	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1.N54Q	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.58.N54S	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.58.N54G	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.58.N54A	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.58.N54Q	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	
184.6.1.NS D30E	A	R	T	Y	G	I	Y	D	L	Y	V	D	Y	T	E	Y	V	M	D	Y	

Dòng #	L1											
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
184.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.1	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A	
184.6.58	R	A	S	Q	D	V	D	I	S	L	A	
184.6.62	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.21	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.49	R	A	S	Q	V	I	D	I	S	L	A	
184.6.51	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.52	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.92	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	
184.6.1.N54S	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A	
184.6.1.N54G	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A	
184.6.1.N54A	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A	
184.6.1.N54Q	R	A	S	Q	D	V	D	T	S	L	A	
184.6.58.N54S	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A	
184.6.58.N54G	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A	
184.6.58.N54A	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A	
184.6.58.N54Q	R	A	S	Q	V	V	D	T	S	L	A	
184.6.1.NS D30E	R	A	S	Q	D	V	E	T	S	L	A	


FIG. 1B

Dòng #	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
184.6	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.58	S	A	S	S	L	A	S
184.6.62	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.21	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.49	G	A	S	T	L	A	S
184.6.51	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.52	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.92	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54S	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54G	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54A	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.1.N54Q	S	A	S	F	L	Y	S
184.6.58.N54S	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54G	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54A	S	A	S	S	L	A	S
184.6.58.N54Q	S	A	S	S	L	A	S
184.6.1.NS D30E	S	A	S	F	L	Y	S

Dòng #	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
184.6	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
184.6.1	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.58	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.62	Q	Q	T	Y	T	T	S	L	T
184.6.21	Q	Q	S	Y	T	T	P	L	T
184.6.49	Q	Q	S	A	A	D	P	Y	T
184.6.51	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
184.6.52	Q	Q	T	Y	S	A	Q	P	T
184.6.92	Q	Q	S	Y	S	H	Q	S	T
184.6.1.N54S	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54G	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54A	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.1.N54Q	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T
184.6.58.N54S	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54G	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54A	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.58.N54Q	Q	Q	G	A	G	N	P	Y	T
184.6.1.NS D30E	Q	Q	S	T	G	H	P	Q	T

FIG. 1C

Dòng 184.6.1.N54S

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
 GRIYPTSGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (SEQ ID NO: 132)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDQVDTSLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSTGHPQTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:133)

Dòng 184.6.58

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
 ARIYPTNGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (SEQ ID NO:134)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDQVDISLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGAGNPYTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:135)

Dòng 184.6.62

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
 ARIYPLYGSTHYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (SEQ ID NO:136)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYTTSITFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:137)

Dòng 184.6.1.NS D30E

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWV
 GRIYPTSGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 ARTYGIYDLYVDYTEYVMDYWGQGLV (SEQ ID NO:138)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVETSLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSTGHPQTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:139)

FIG. 2A

Dòng 1G6

HVR-H1: GYSFTDYNMY (SEQ ID NO:164)
HVR-H2: WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:167)
HVR-H3: ASPNYYDSSPFAY (SEQ ID NO:170)
HVR-L1: SASSSVSYMH (SEQ ID NO:155)
HVR-L2: TWIYDTSILAS (SEQ ID NO:158)
HVR-L3: QQWTSNPLT (SEQ ID NO:161)

Dòng 6G1

HVR-H1: GYVFTHYNMY (SEQ ID NO:165)
HVR-H2: WIGYIEPYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:168)
HVR-H3: ARGQGPDFDV (SEQ ID NO:171)
HVR-L1: SASSSVSYMH (SEQ ID NO:156)
HVR-L2: RWIYDTSKLAS (SEQ ID NO:159)
HVR-L3: QQWSSYPPT (SEQ ID NO:162)

Dòng 15B2

HVR-H1: GYAFTSYNMY (SEQ ID NO:166)
HVR-H2: WIGYIDPYIGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:169)
HVR-H3: ARWGDYDVGAMDY (SEQ ID NO:172)
HVR-L1: LASQTIGTWLA (SEQ ID NO:157)
HVR-L2: LLIYAATSLAD (SEQ ID NO:160)
HVR-L3: QQLYSPPWT (SEQ ID NO:163)

FIG. 2B

I			
A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG
B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM
C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM
D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM
II			
A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG
B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI
C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI
D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI
III			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
Thế nhận			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
Thế nhận thứ hai			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV

FIG. 3A

7 / 35

I	A	RV	ITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 19, 203-205
	B	RV	ITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 20, 206-208
	C	RV	ITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCA	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 21, 209-211
	D	RV	ITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYC	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 22, 212-214
II	A	RV	ISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 23, 215-217
	B	RV	ISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 24, 218-220
	C	RV	ISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCA	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 25, 221-223
	D	RV	ISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYC	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 26, 224-226
III	A	RFT	ISRDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 27, 227-229
	B	RFT	ISRDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 28, 230-232
	C	RFT	ISRDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 29, 233-235
	D	RFT	ISRDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 30, 236-238
Thế nhận								
	A	RFT	ISADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 31, 239-241
	B	RFT	ISADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 32, 242-244
	C	RFT	ISADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 33, 245-247
Thế nhận thứ hai								
	A	RFT	ISADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 34, 248-250
	B	RFT	ISADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 35, 251-253
	C	RFT	ISADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 36, 254-256
	D	RFT	ISADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NO.: 37, 257-259

FIG. 3B

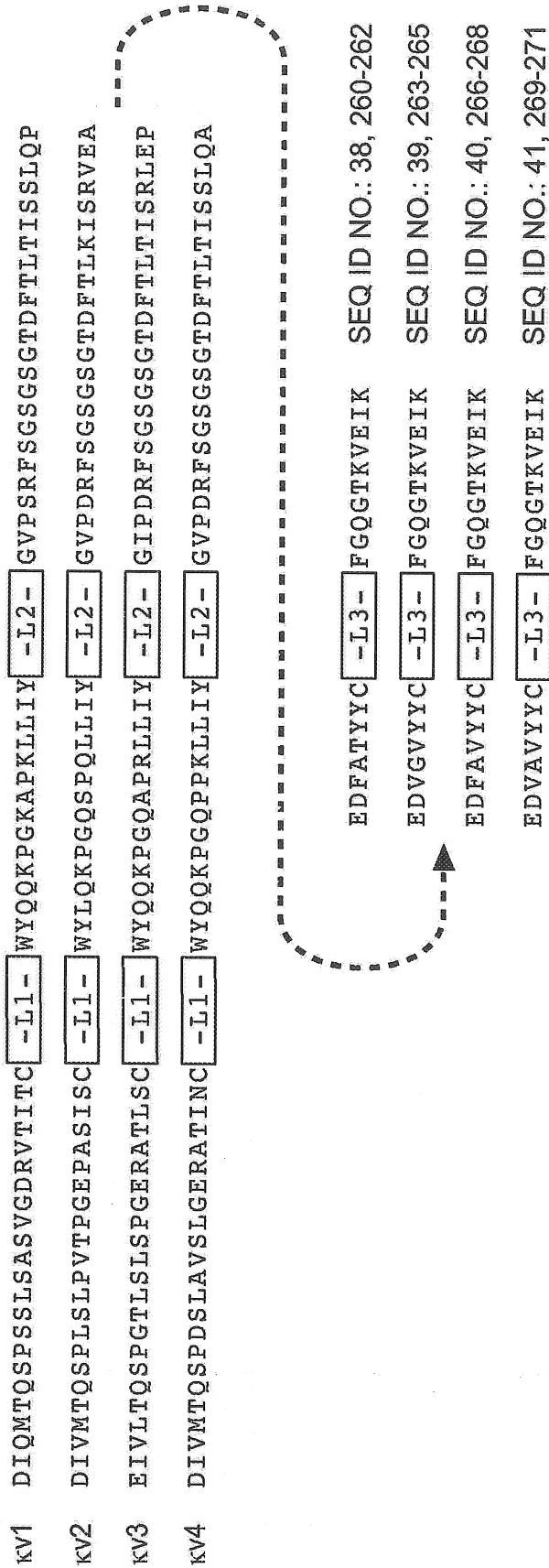


FIG. 4

9 / 35

Trình tự khung của chuỗi nhẹ huMAb4D5-8

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 44)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 45)

Trình tự khung của chuỗi nặng huMAb4D5-8

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEQ ID NO: 175)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 176)

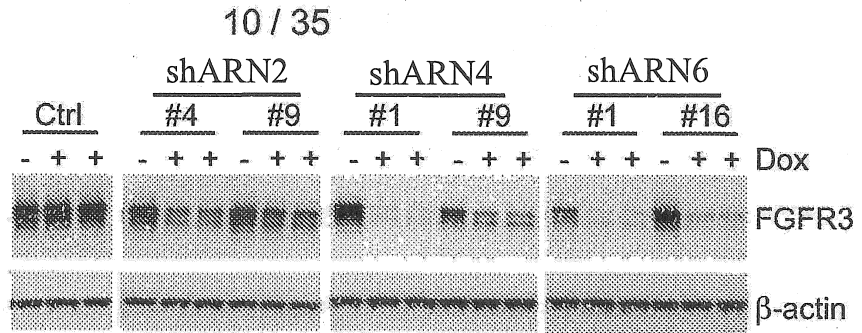
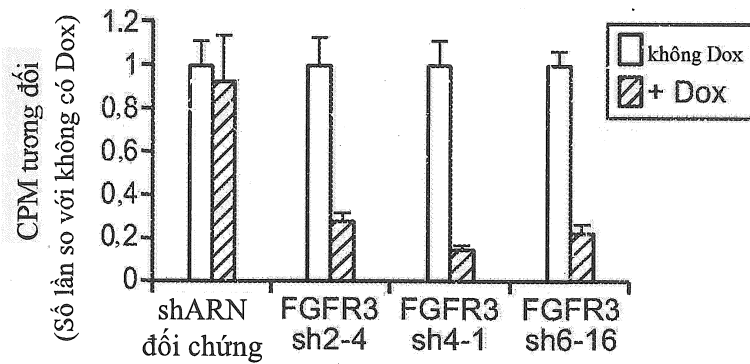
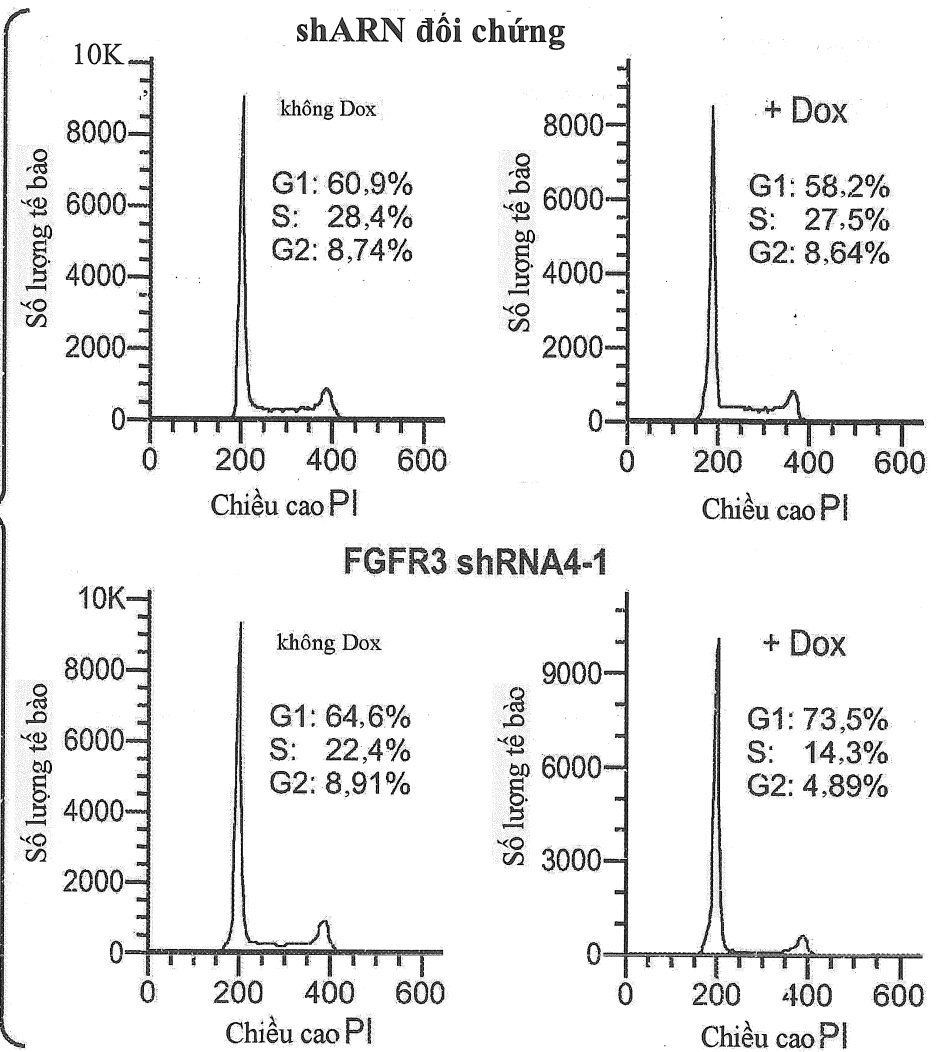
FIG. 5Trình tự khung của chuỗi nhẹ huMAb4D5-8 được biến đổi ở vị trí 66 (được gạch chân)

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 42)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 43)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 177)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 45)

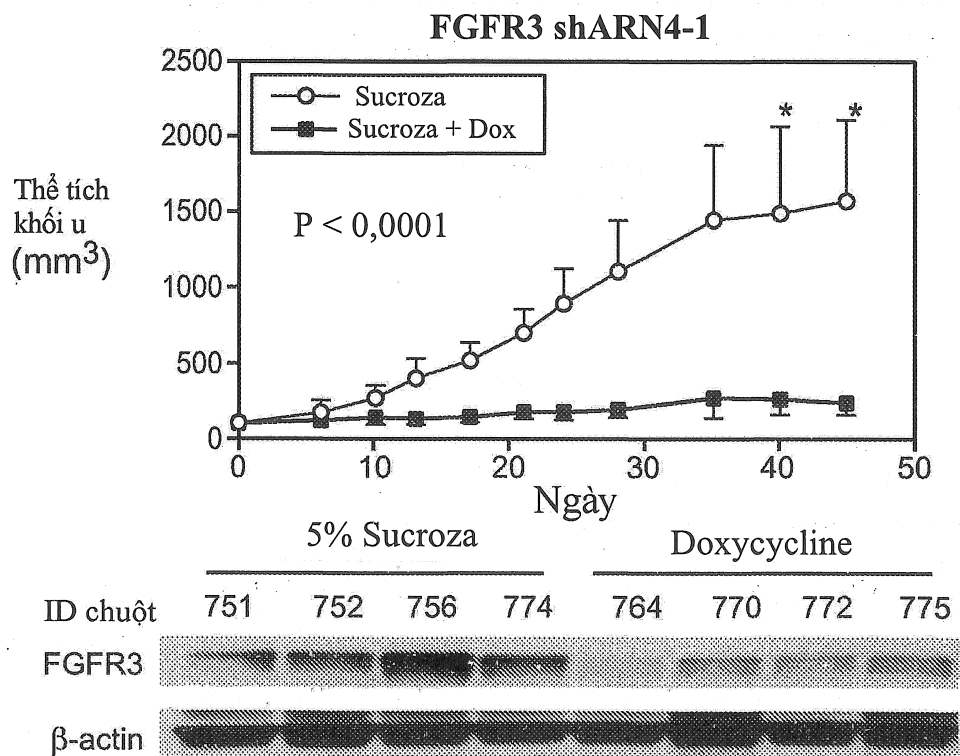
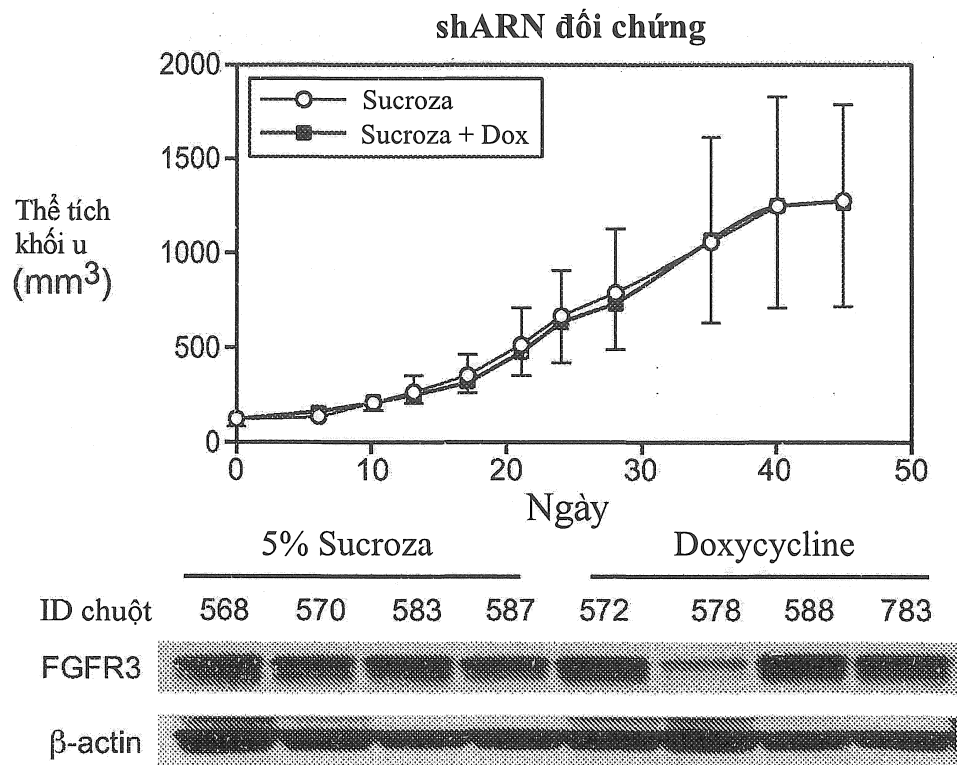
Trình tự khung của chuỗi nặng huMAb4D5-8 được biến đổi ở vị trí 71, 73, và 78 (được gạch chân)

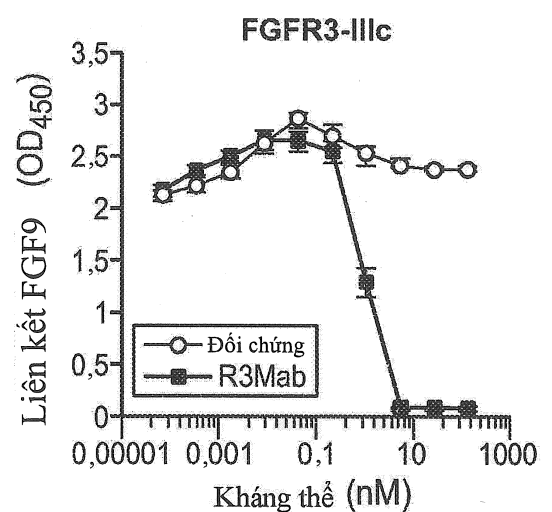
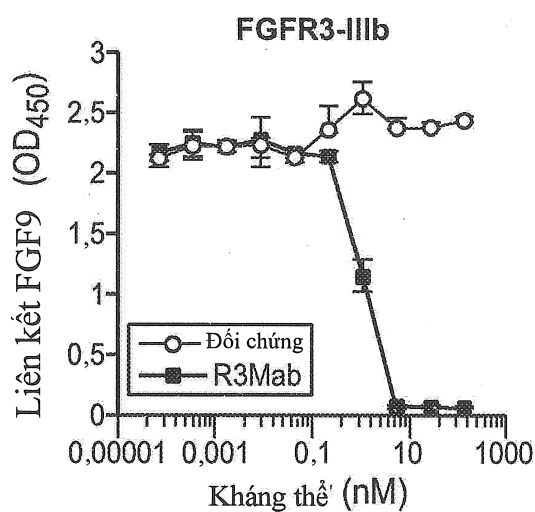
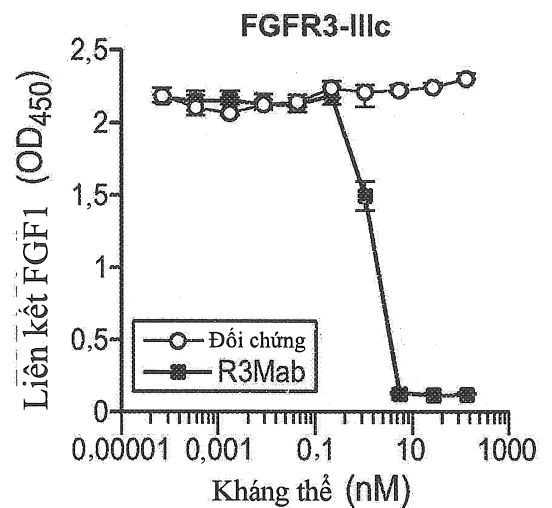
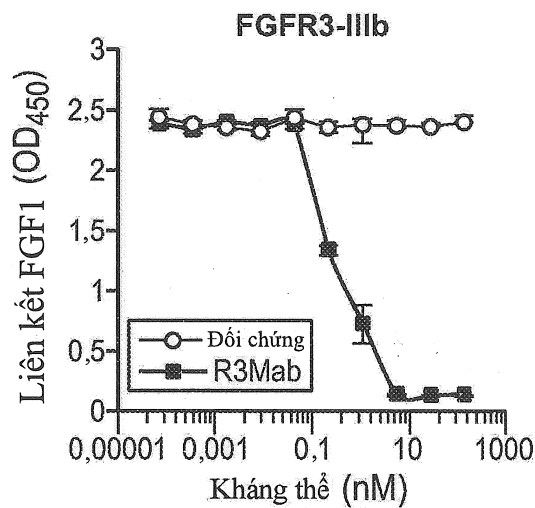
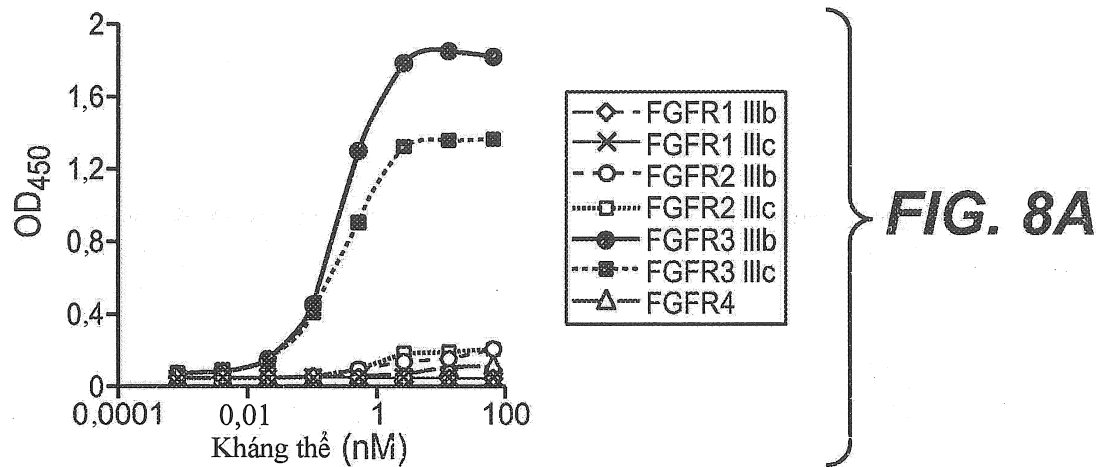
- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 46)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 47)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (SEQ ID NO: 178)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 176)

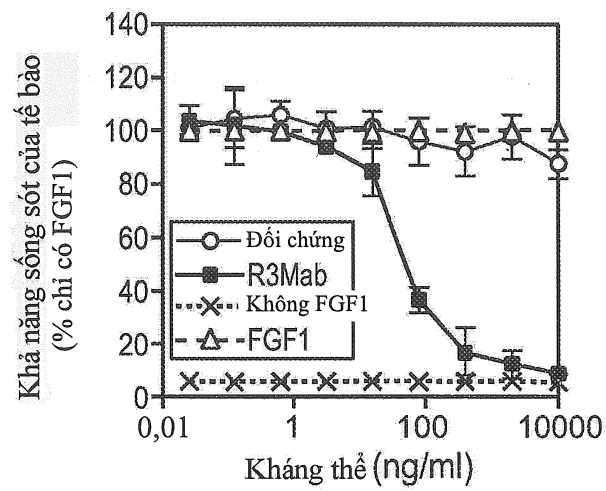
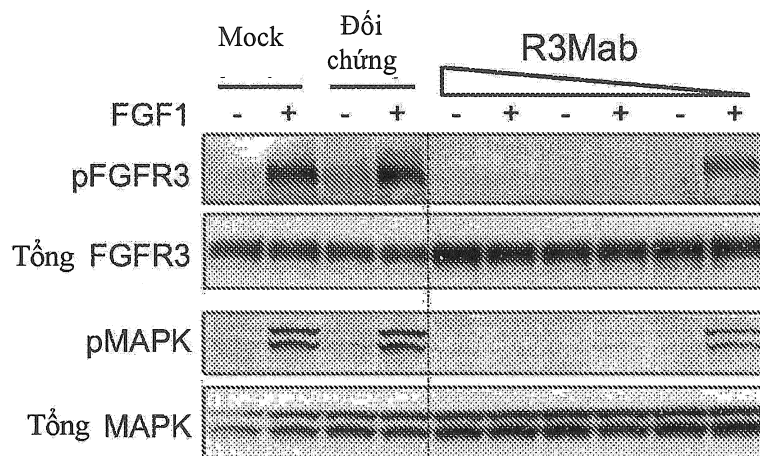
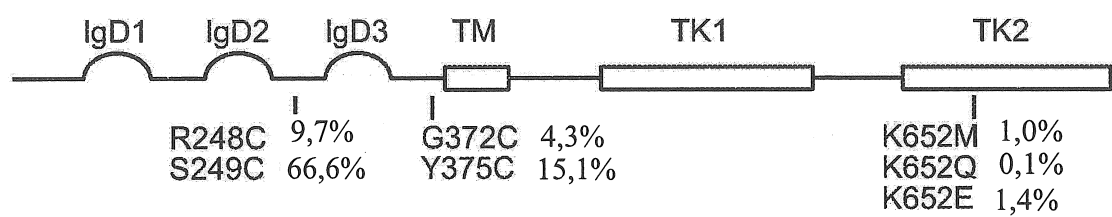
FIG. 6

FIG. 7A**FIG. 7B****FIG. 7C**

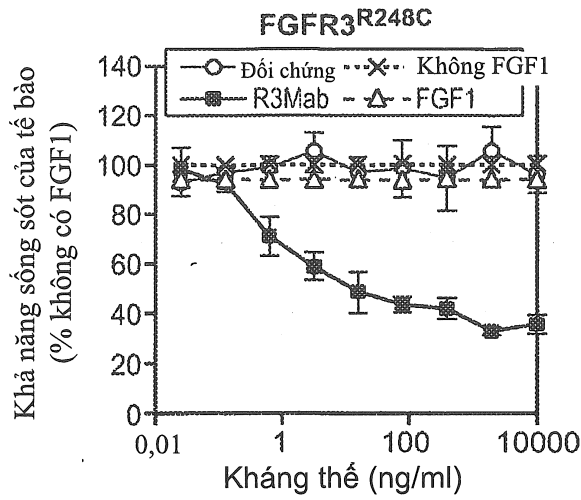
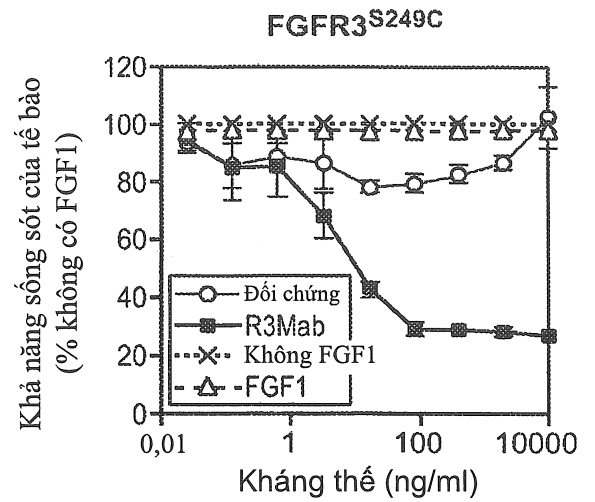
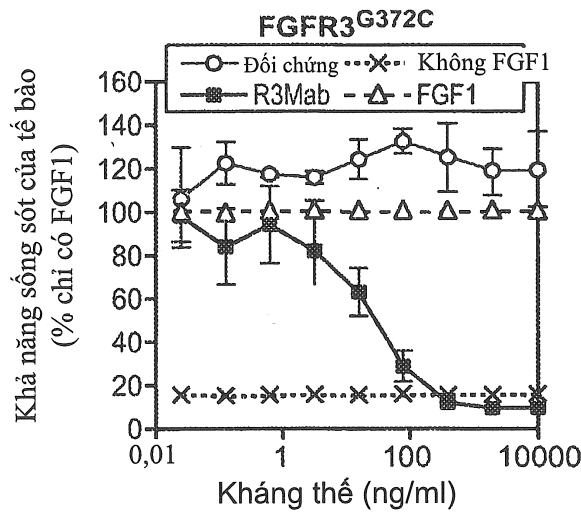
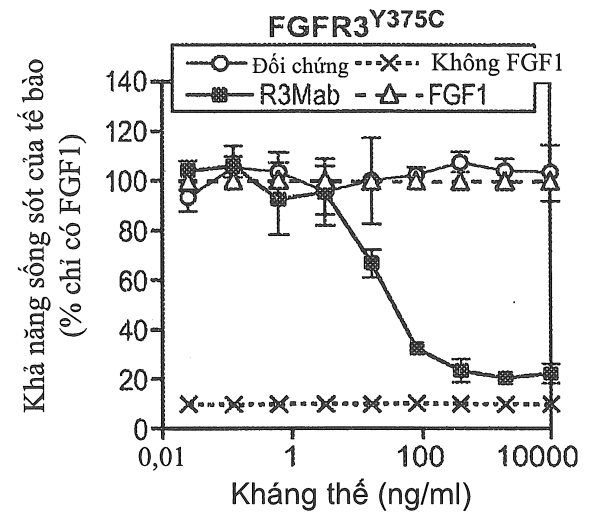
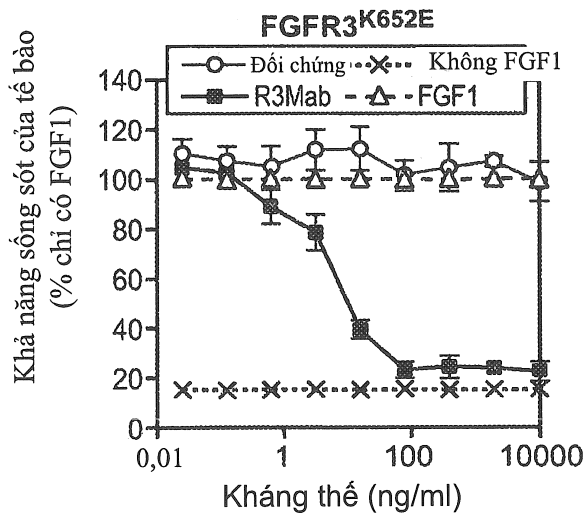
11 / 35

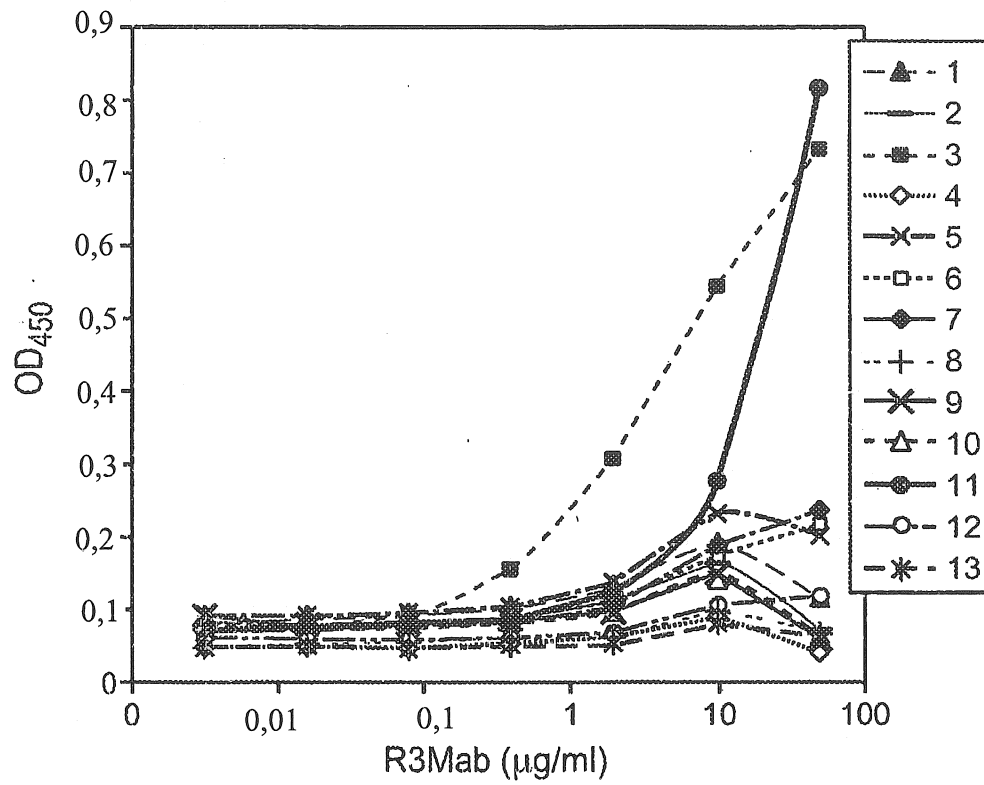
**FIG. 7D**



**FIG. 9A****FIG. 9B****FIG. 9C**

14 / 35

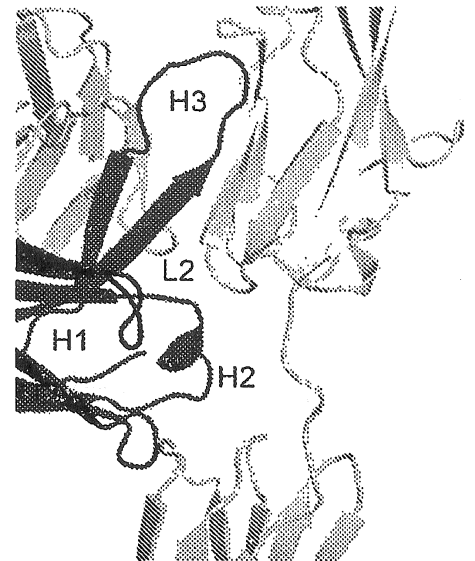
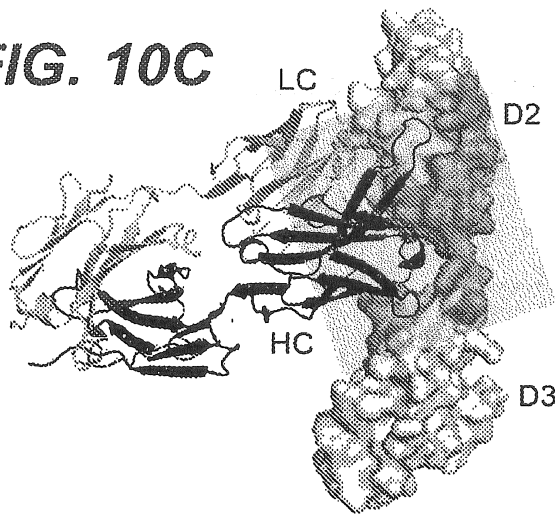
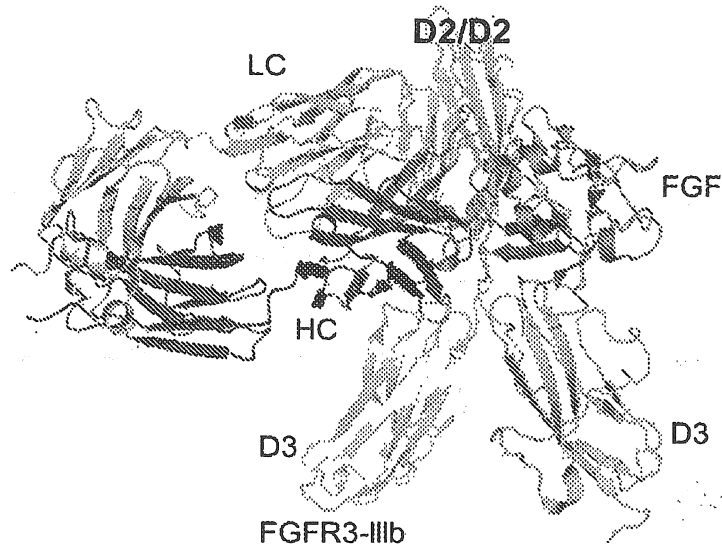
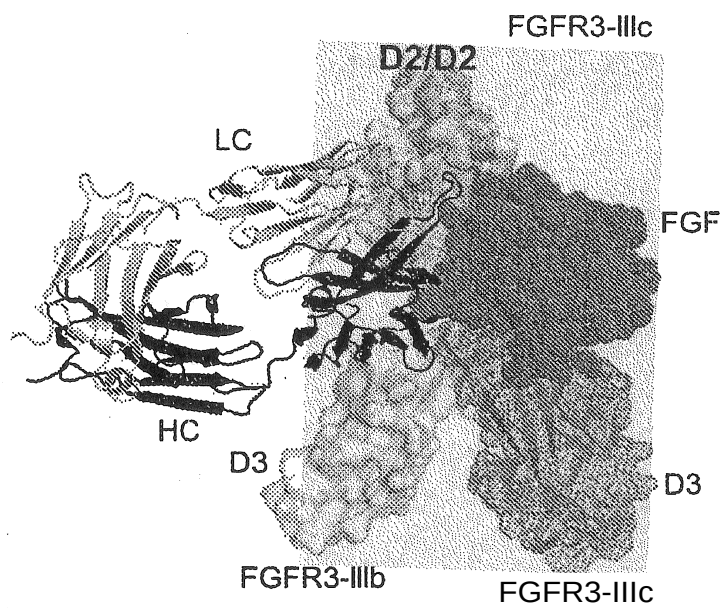
**FIG. 9D****FIG. 9E****FIG. 9F****FIG. 9G****FIG. 9H**

**FIG. 10A**

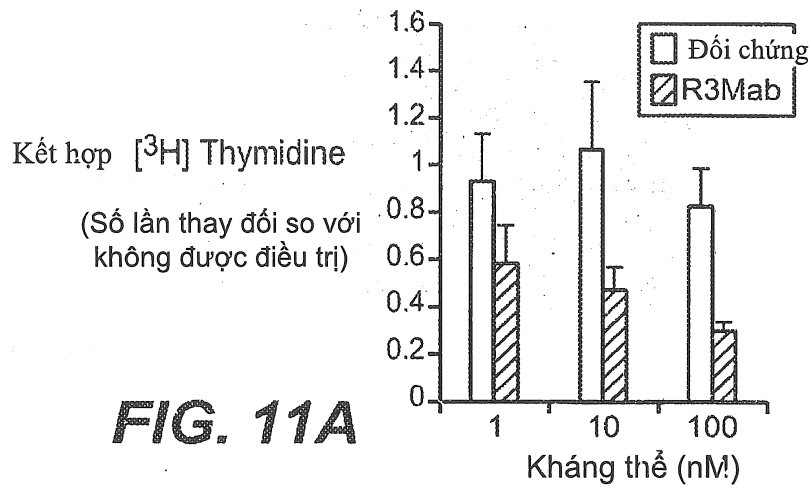
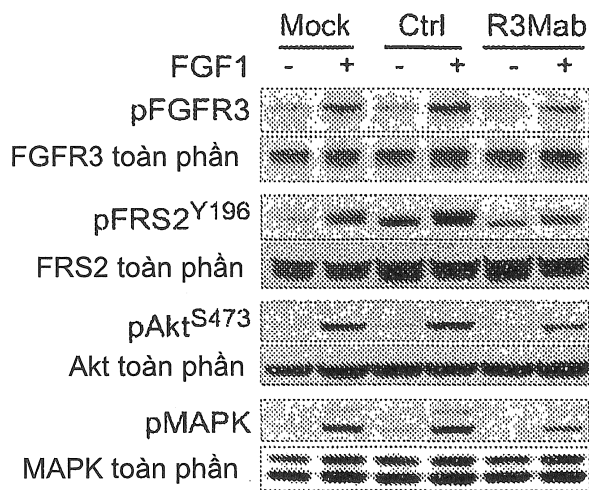
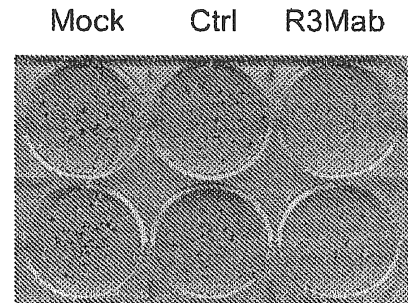
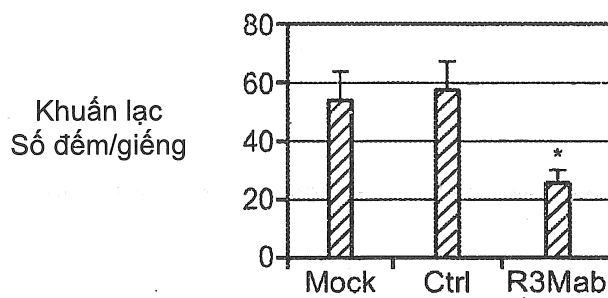
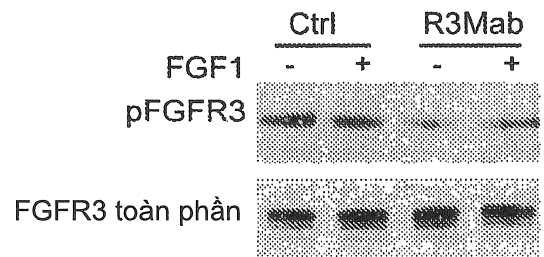
164	178	
FGFR3	LAVPAANTVRFRCPA	Peptit 3
FGFR1	HAVPAAKTVKFKCPS	
269	283	
FGFR3	SDVEFHCKVYSDAQP	Peptit 11
FGFR1	SNVEFMCKVYSDPQP	

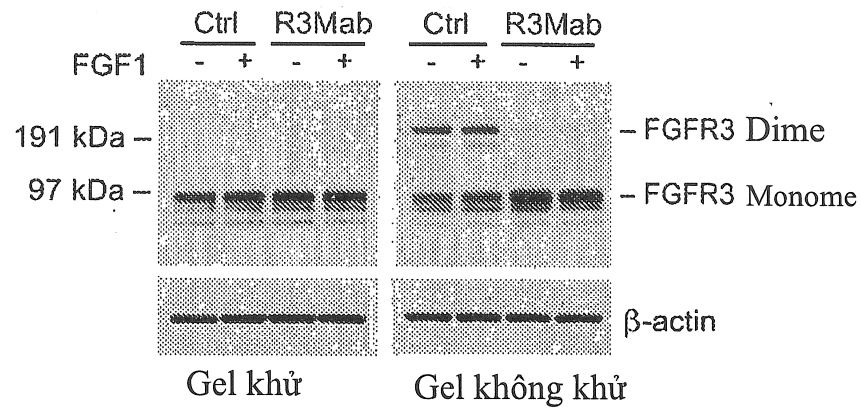
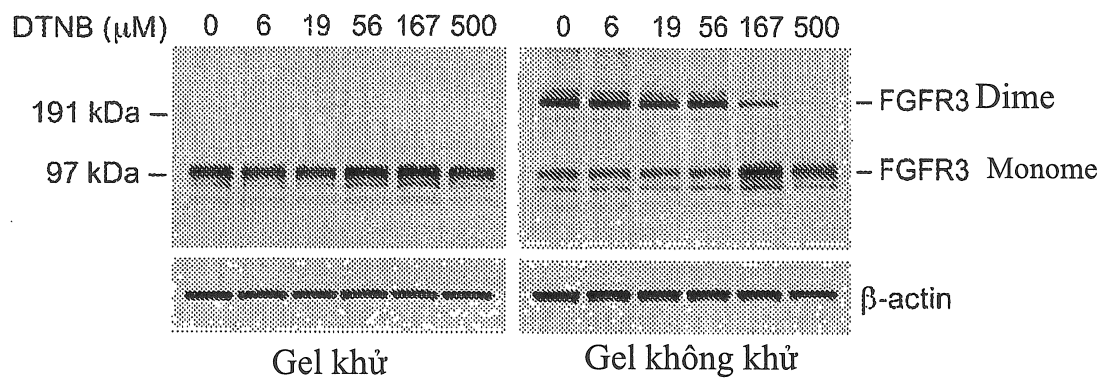
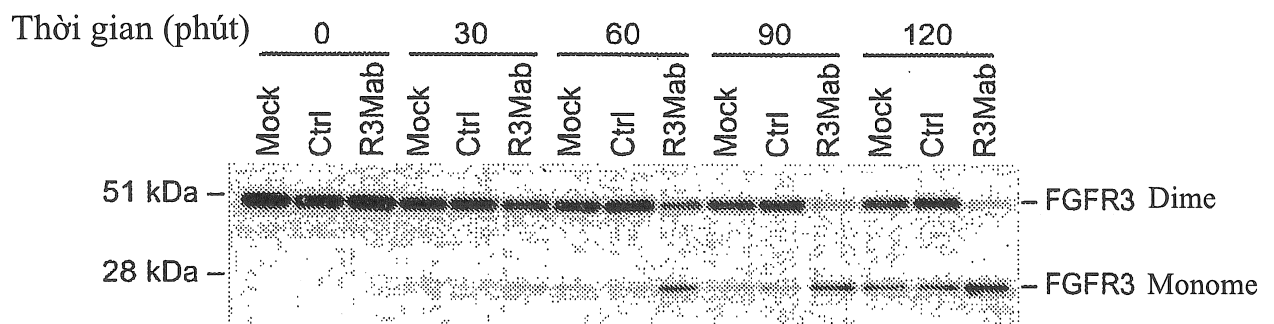
FIG. 10B

16 / 35

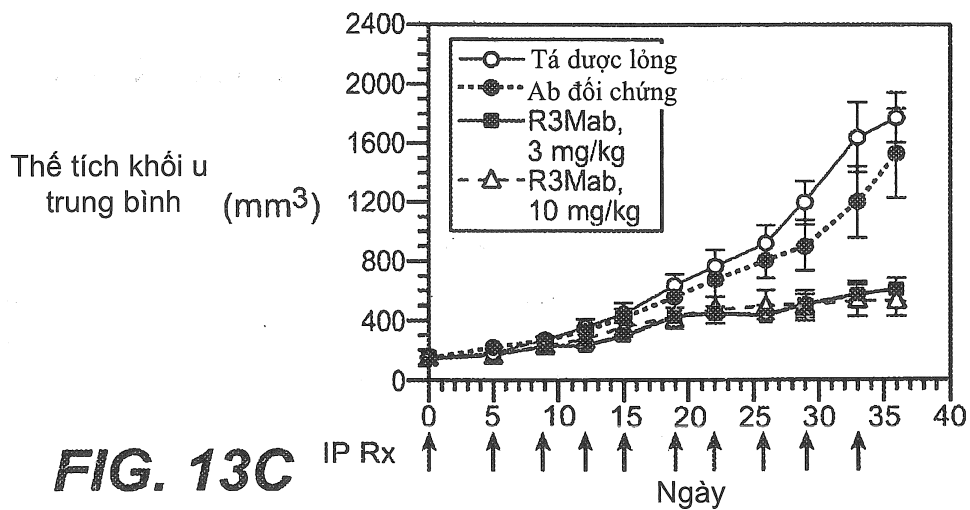
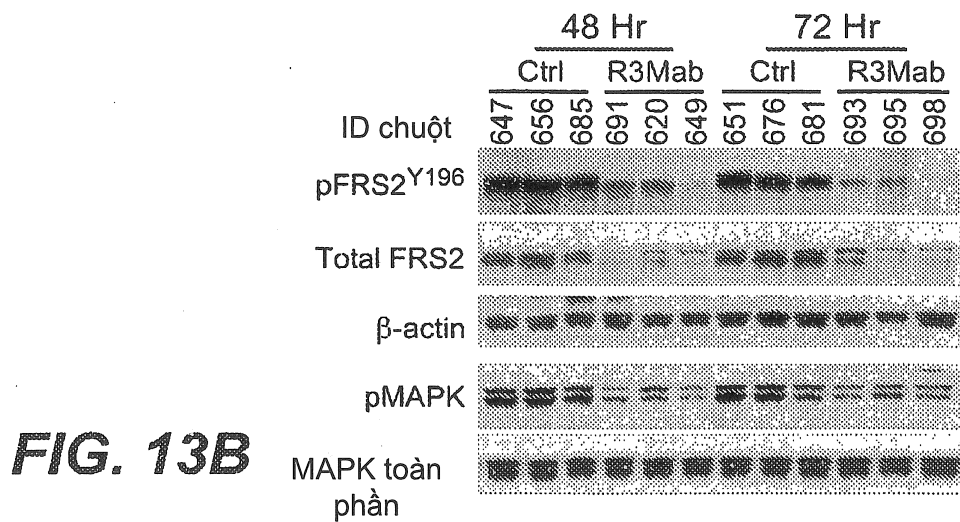
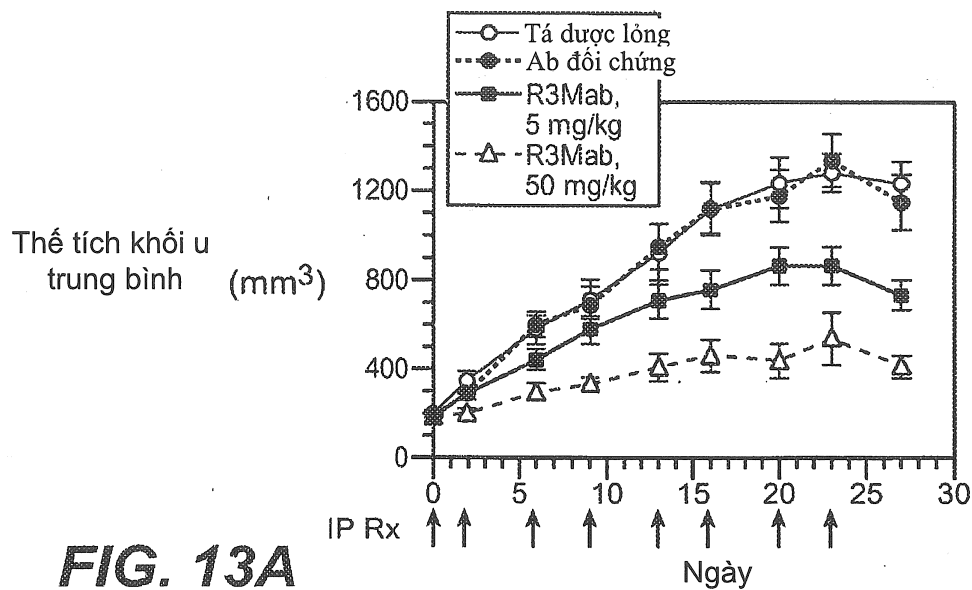
FIG. 10C**FIG. 10D****FIG. 10E****FIG. 10F**

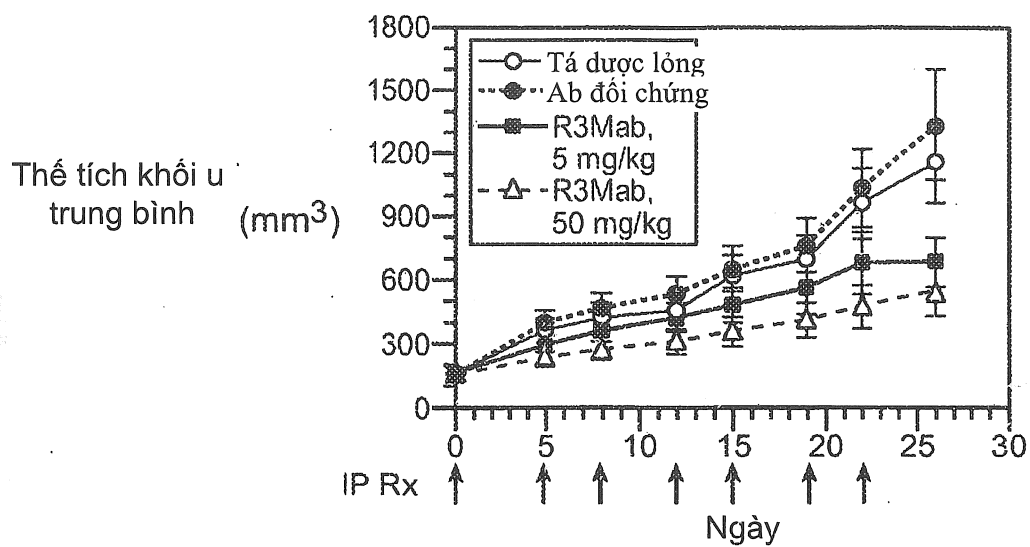
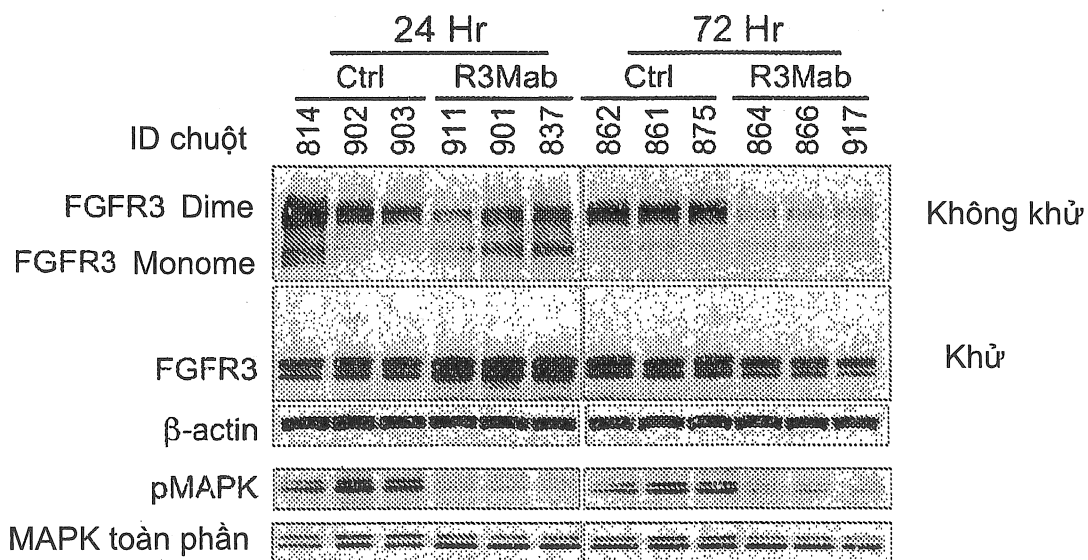
17 / 35

**FIG. 11A****FIG. 11B****FIG. 11C****FIG. 11D****FIG. 11E**

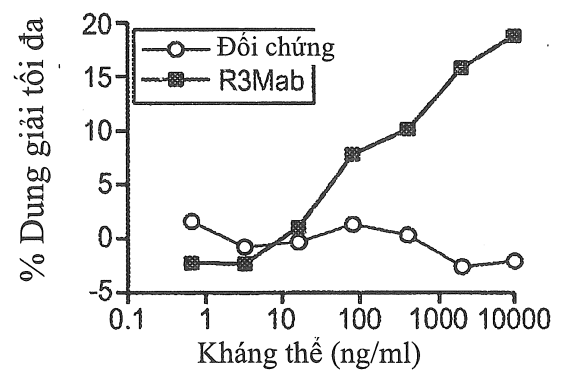
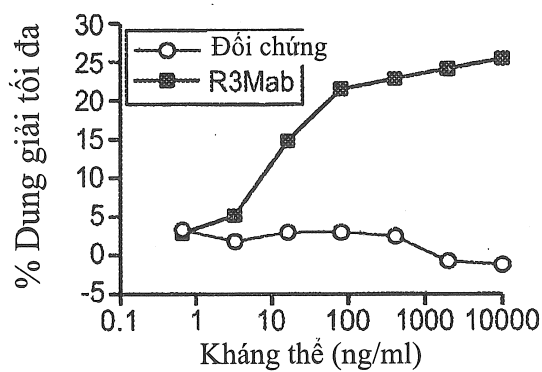
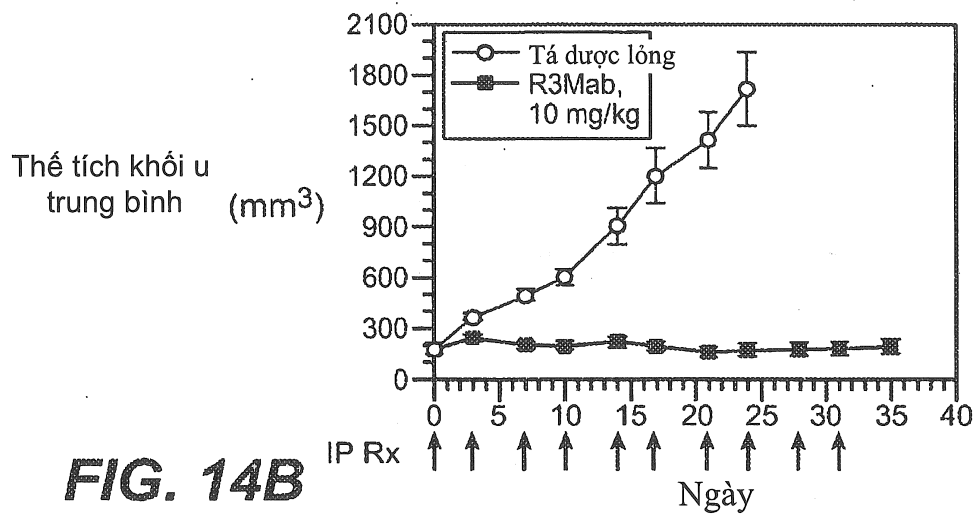
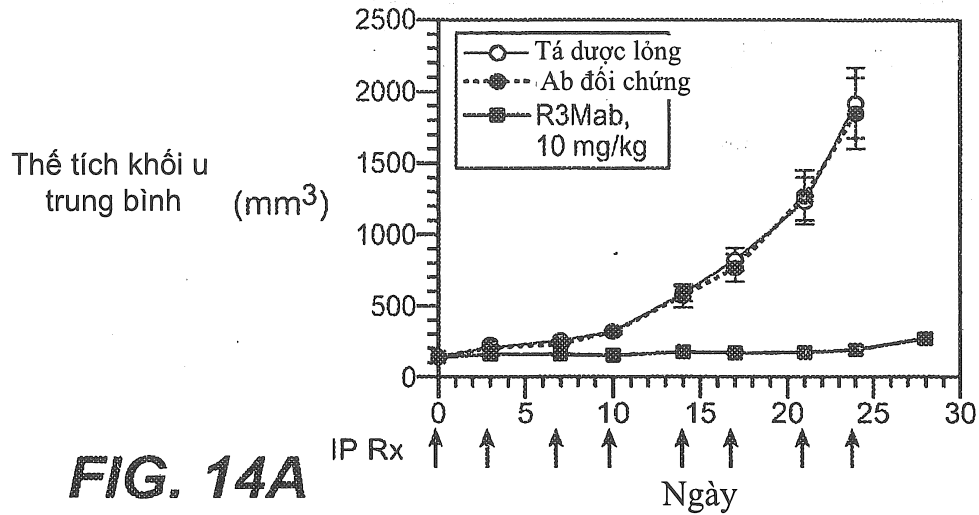
**FIG. 12A****FIG. 12B****FIG. 12C**

19 / 35

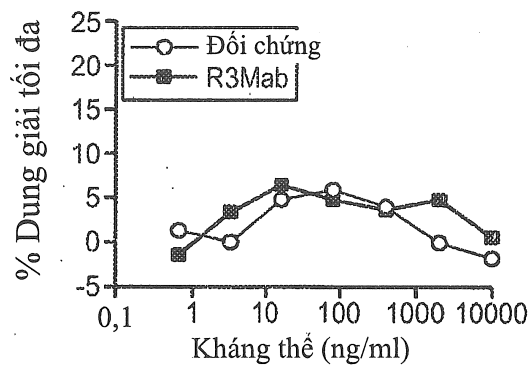
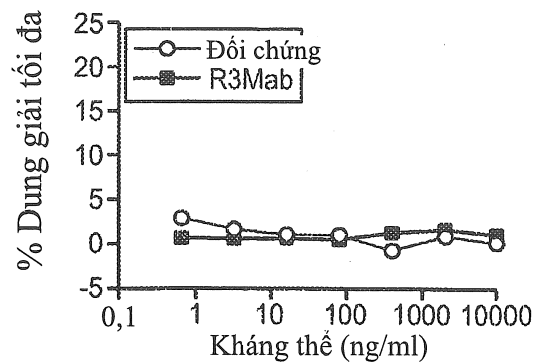
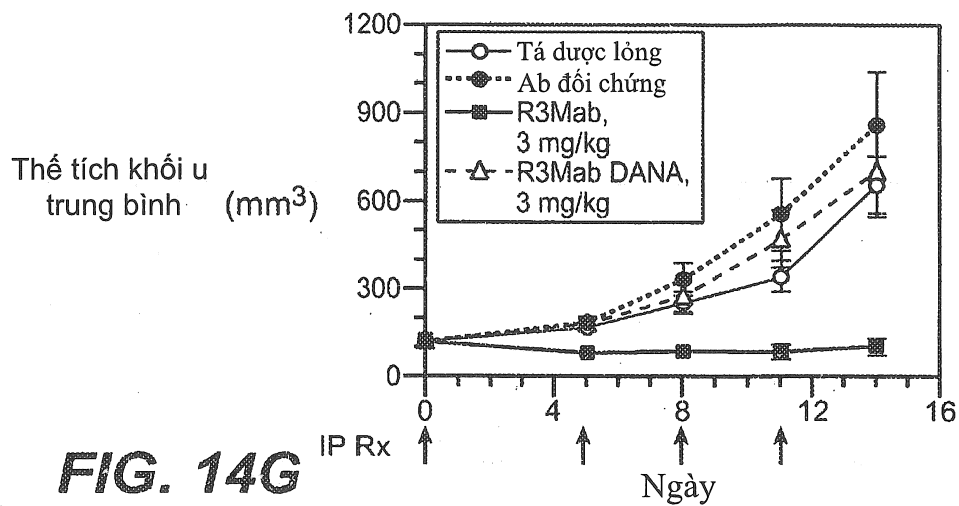
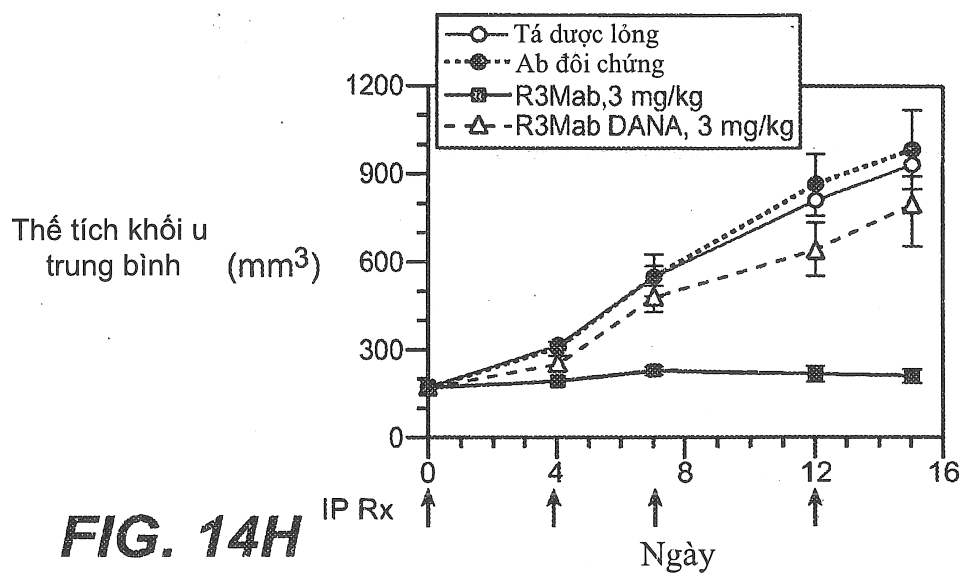


**FIG. 13D****FIG. 13E**

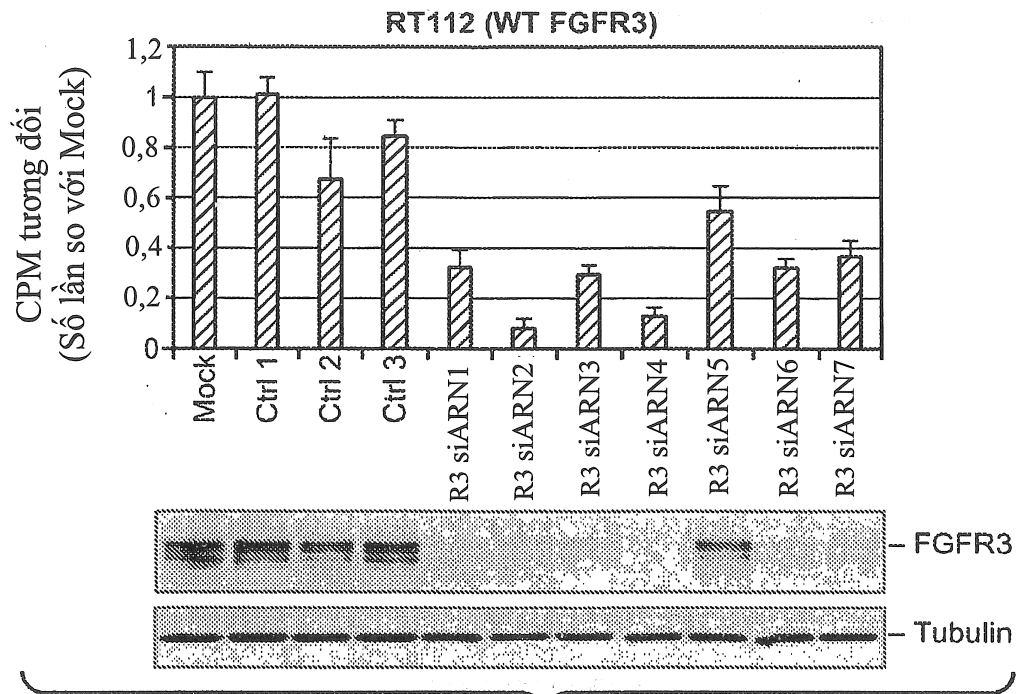
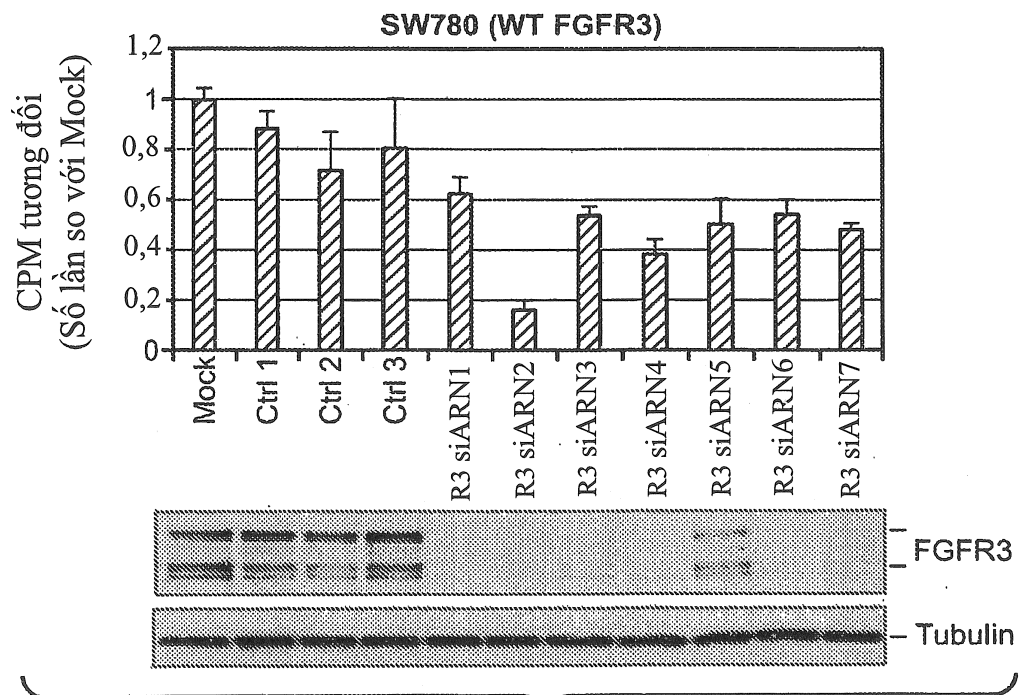
21 / 35



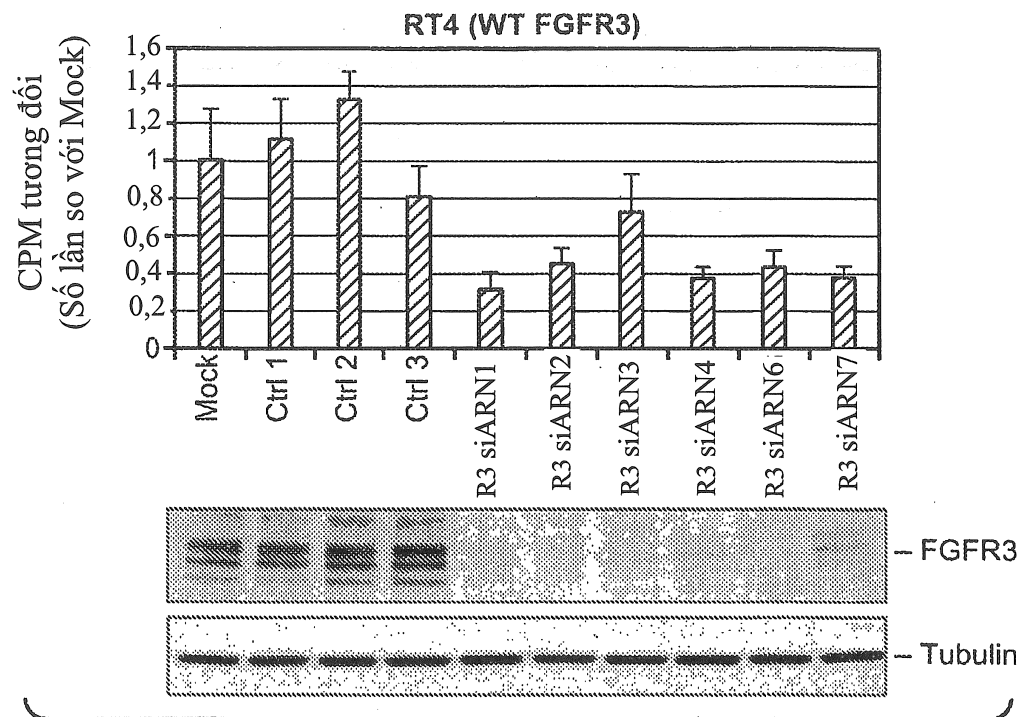
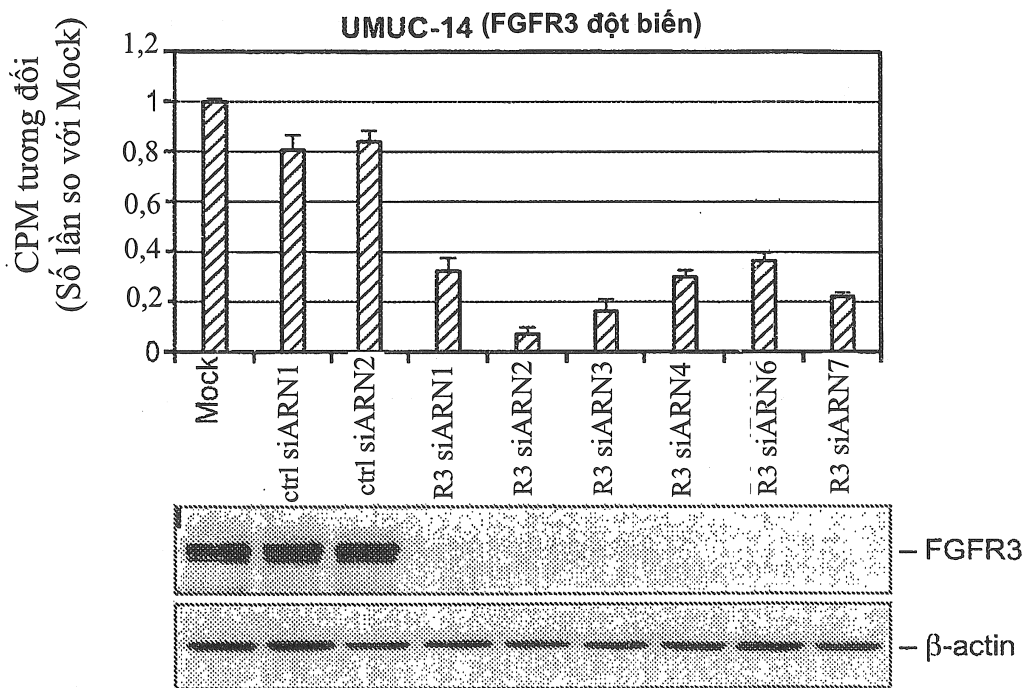
22 / 35

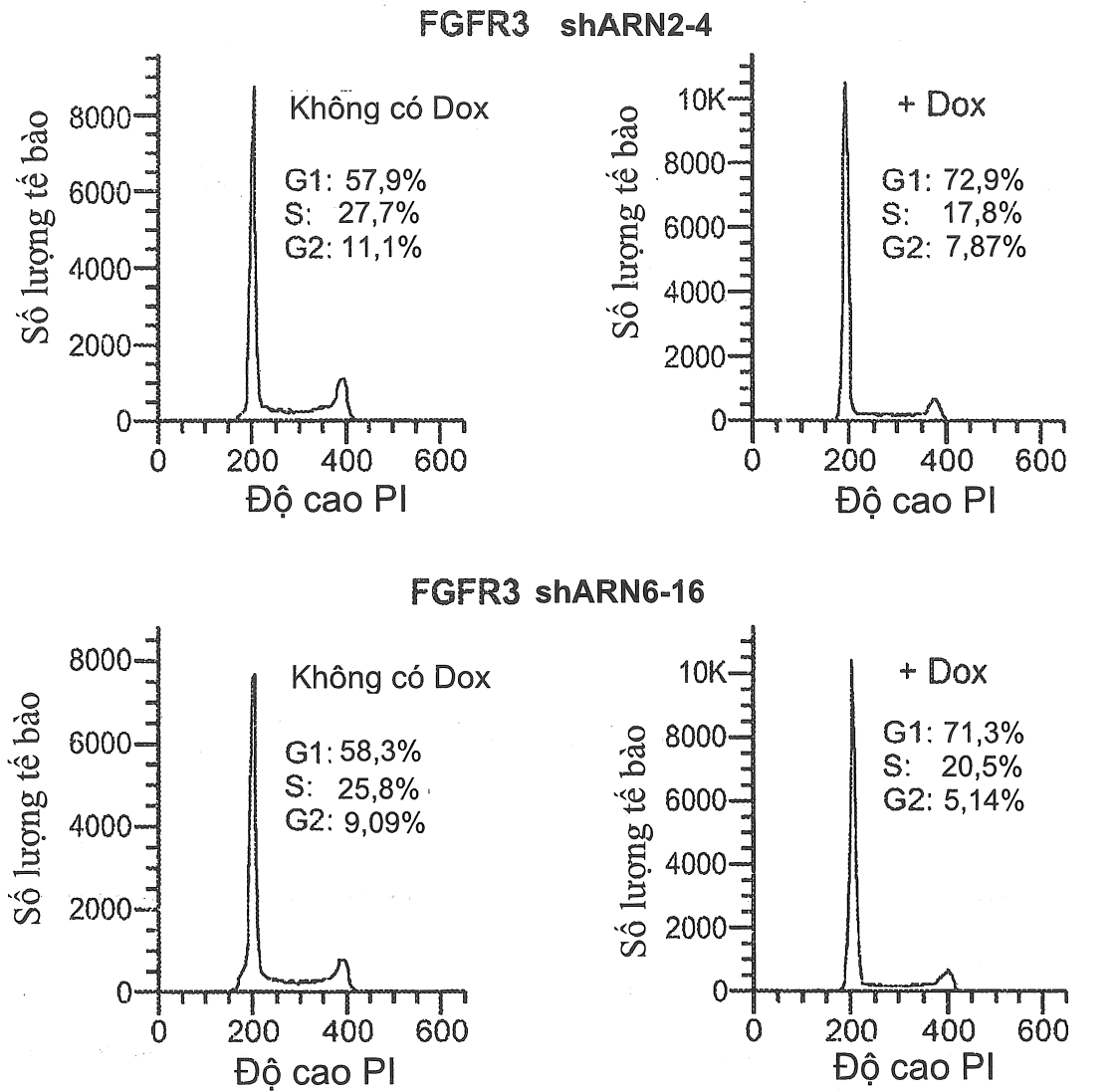
**FIG. 14E****FIG. 14F****FIG. 14G****FIG. 14H**

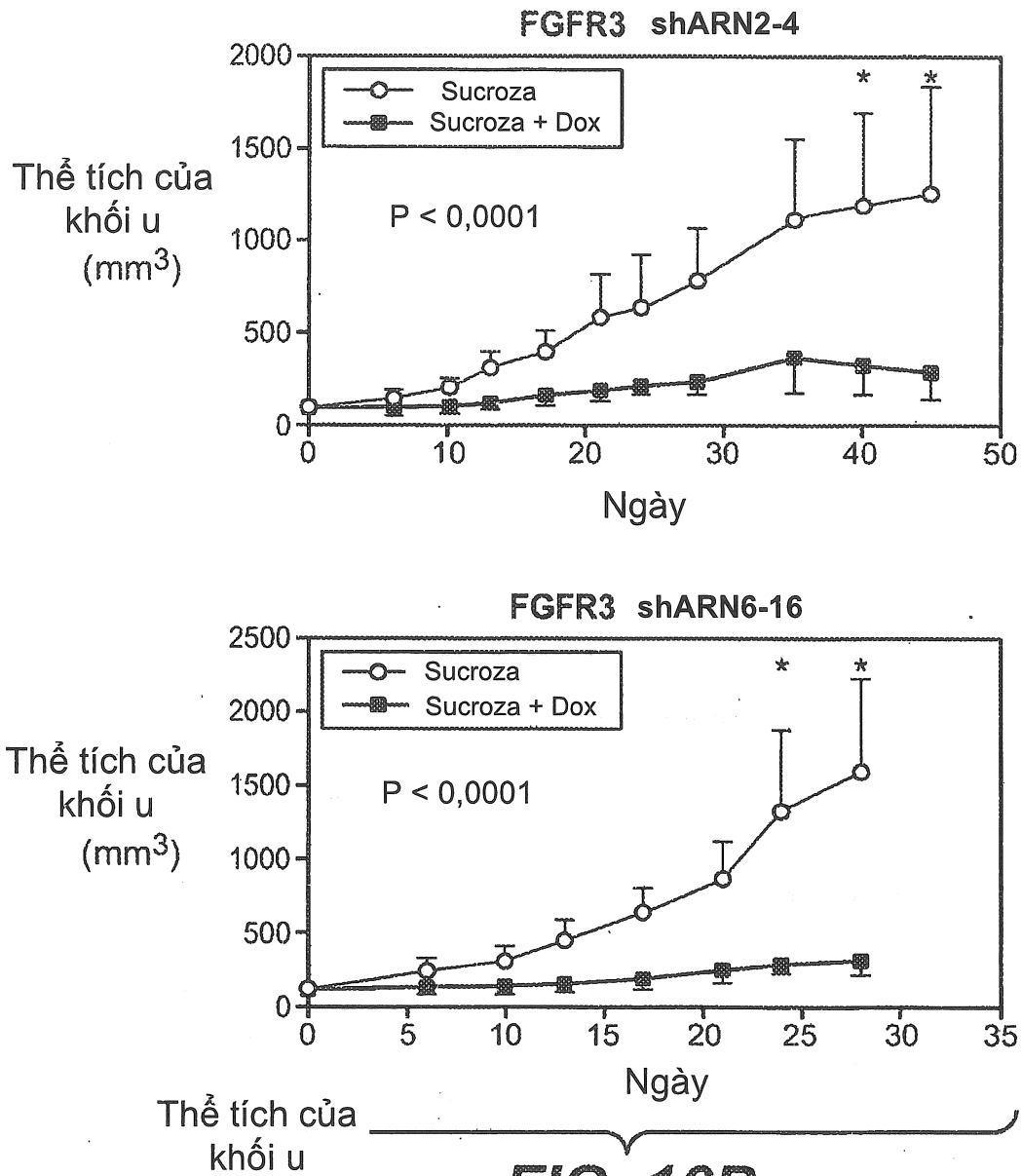
23 / 35

**FIG. 15A****FIG. 15B**

24 / 35

**FIG. 15C****FIG. 15D**

**FIG. 16A**

**FIG. 16B**

27 / 35

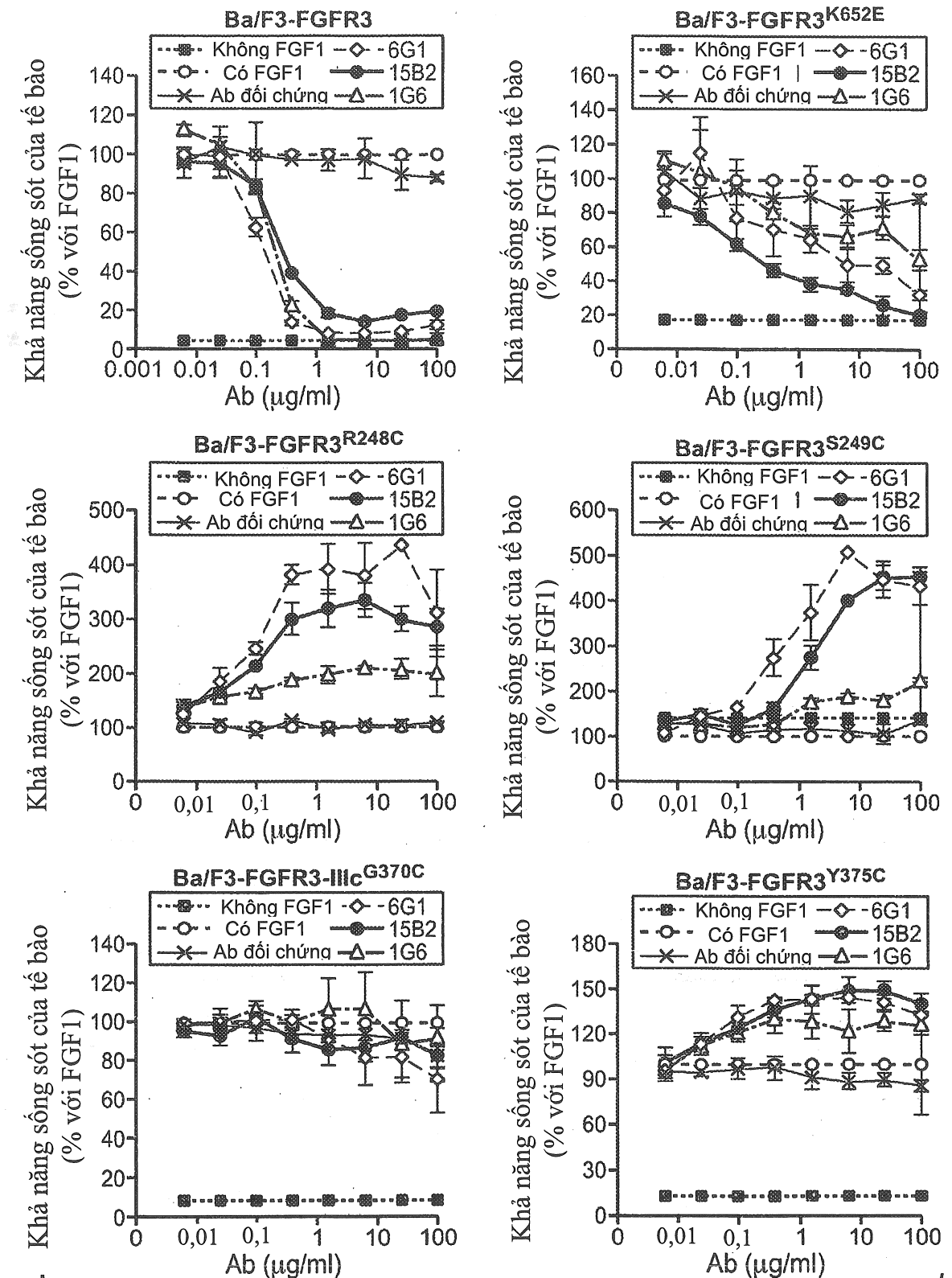
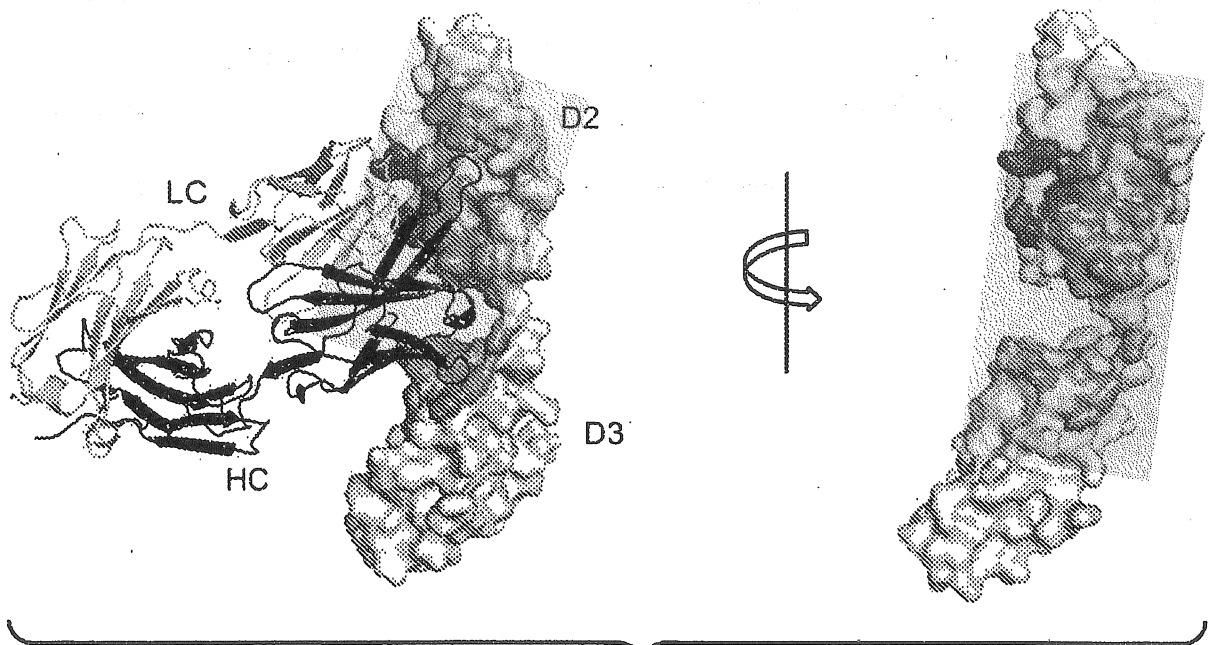
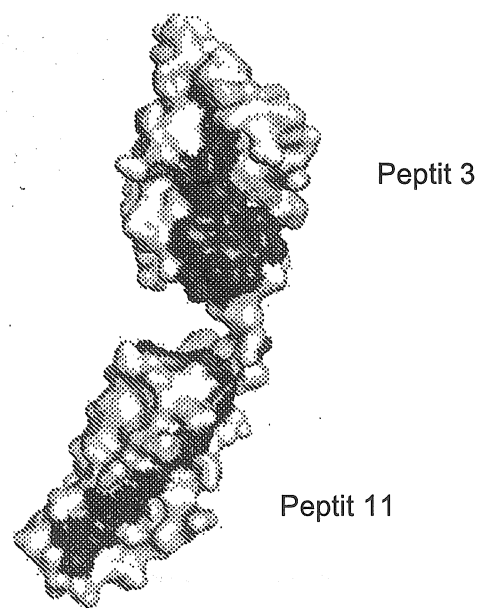
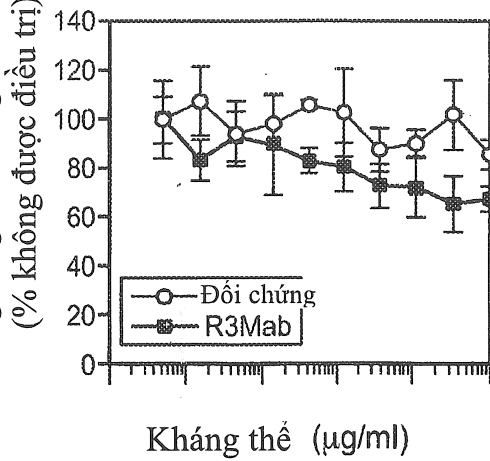


FIG. 17

**FIG. 18A****FIG. 18B**

Khả năng sống sót tương đối của tế bào
(% không được điều trị)



Kháng thể (µg/ml)

FIG. 19A

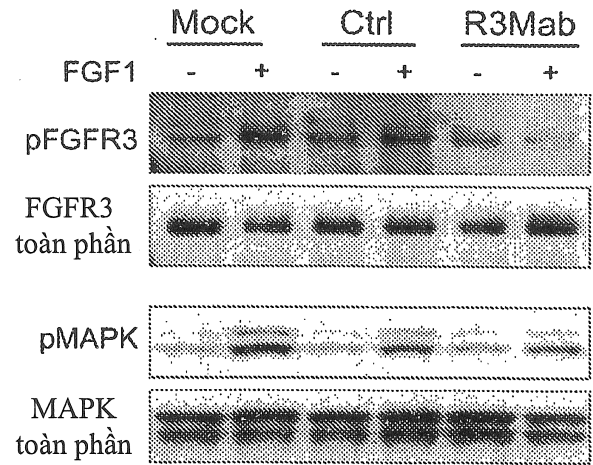


FIG. 19B

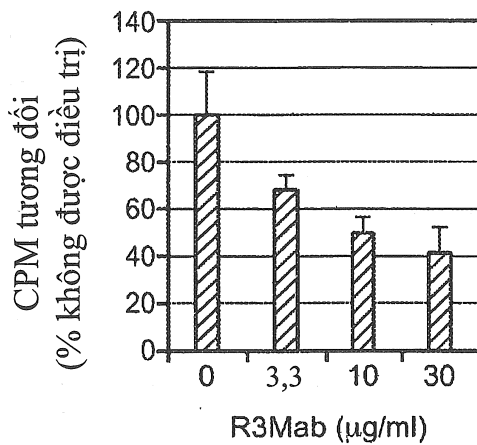


FIG. 19C

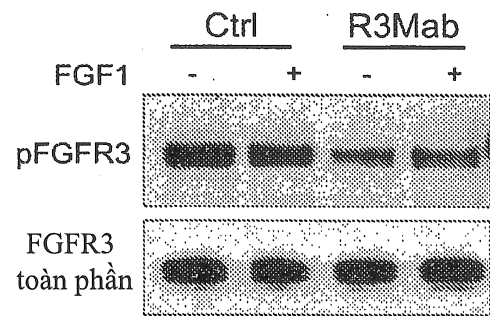
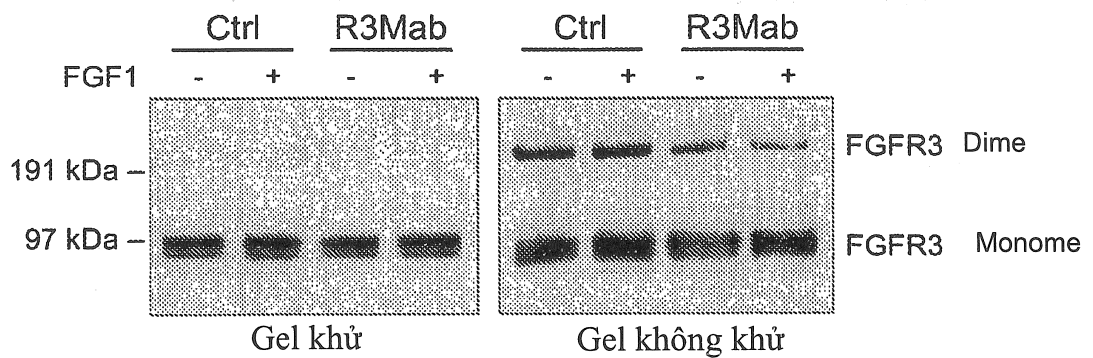


FIG. 19D

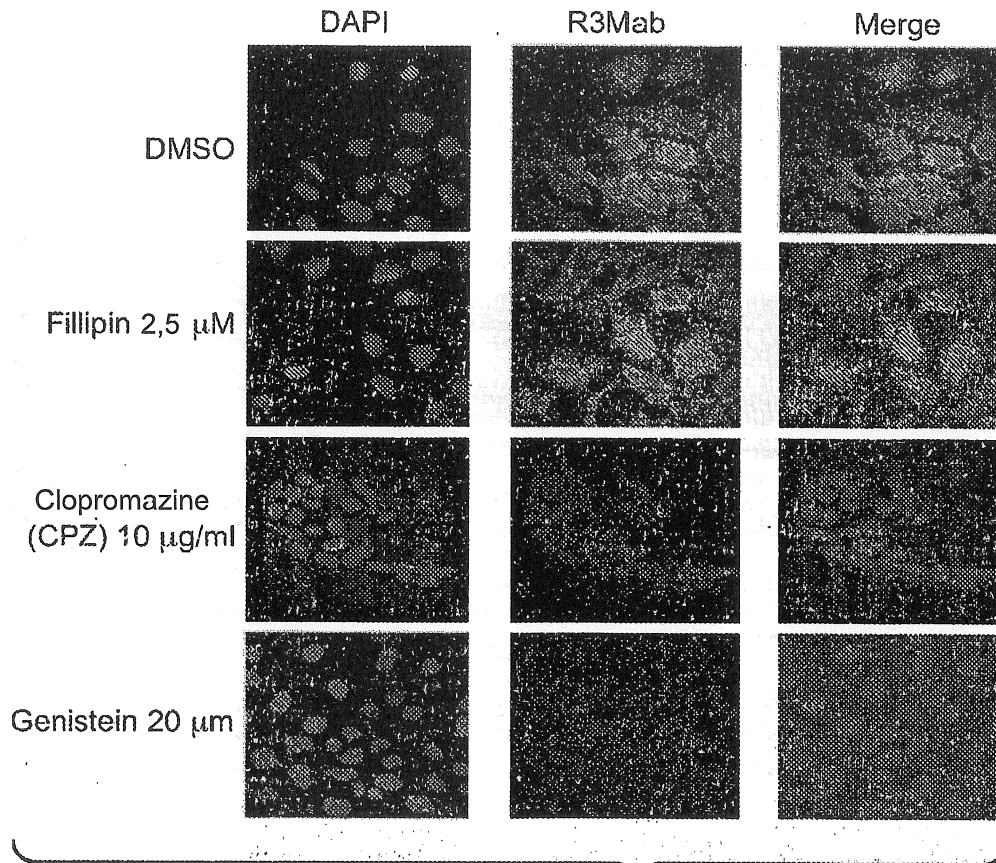
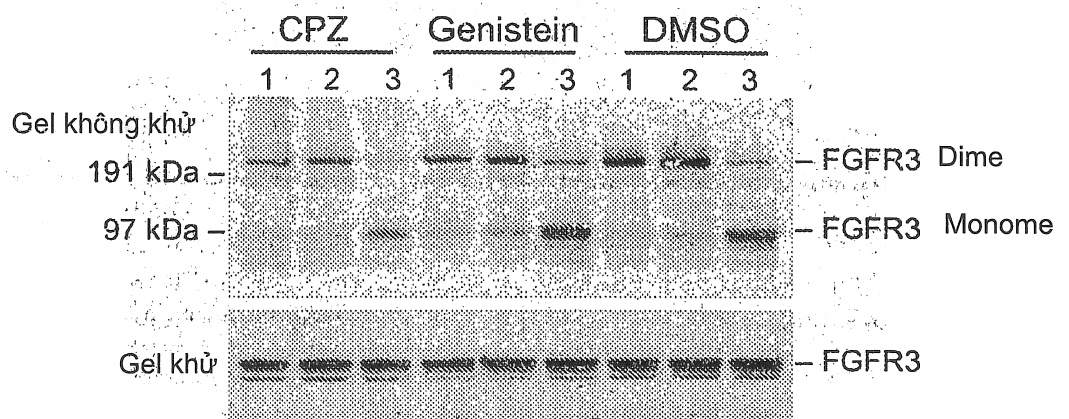


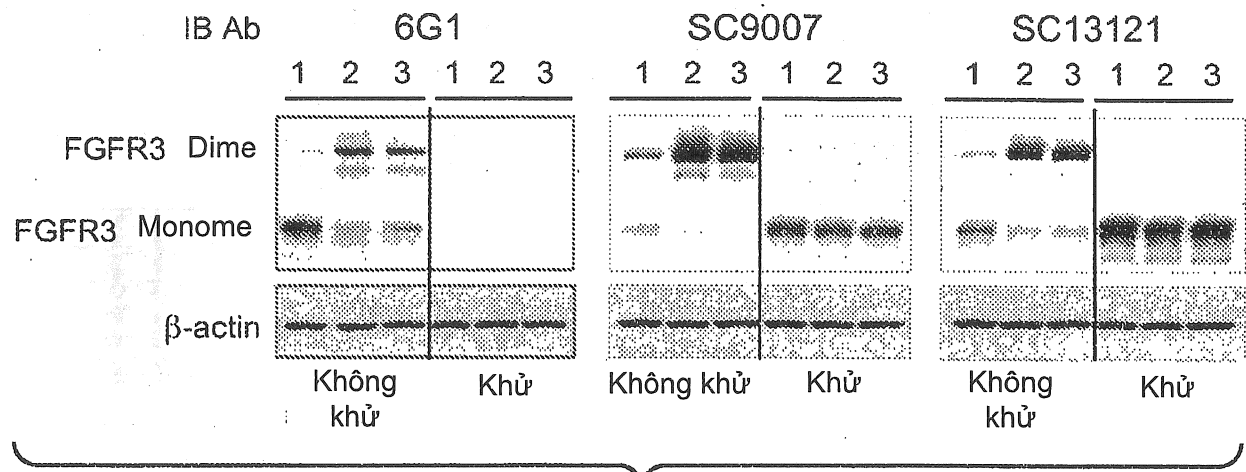
Gel khử

Gel không khử

FIG. 19E

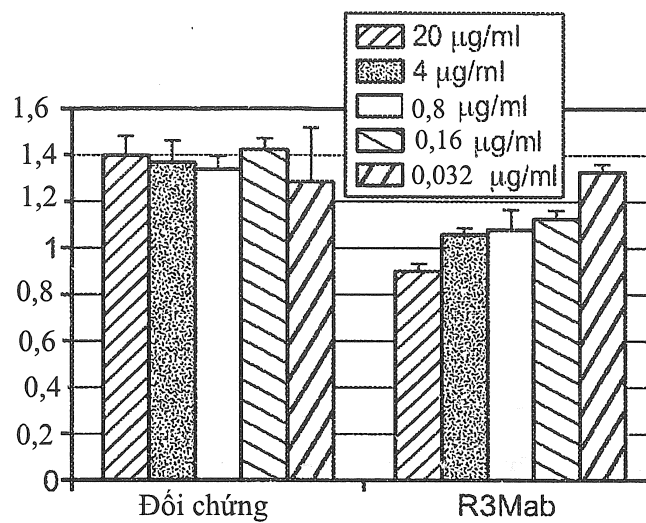
30 / 35

**FIG. 20A****FIG. 20B**

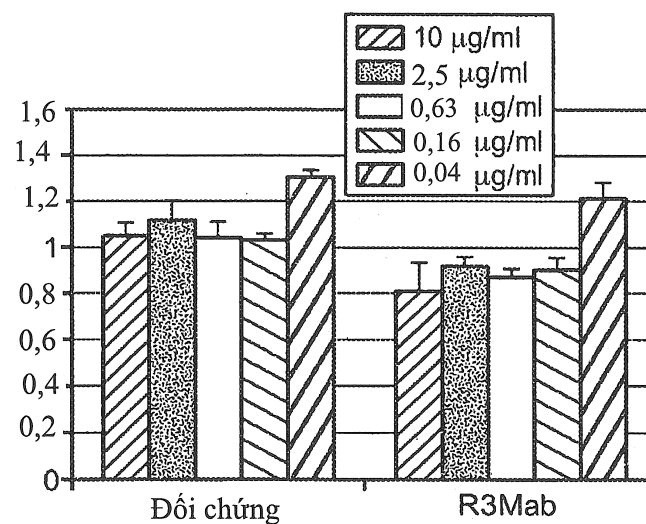
**FIG. 21**

32 / 35

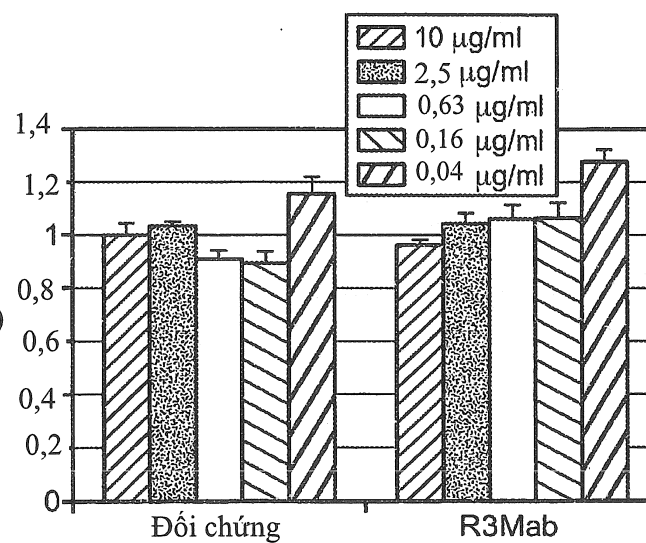
CPM tương đối
(Số lần so với không có FGF9)

FIG. 22A

CPM tương đối
(Số lần so với không được điều trị)

FIG. 22B

CPM tương đối
(Số lần so với không được điều trị)

FIG. 22C

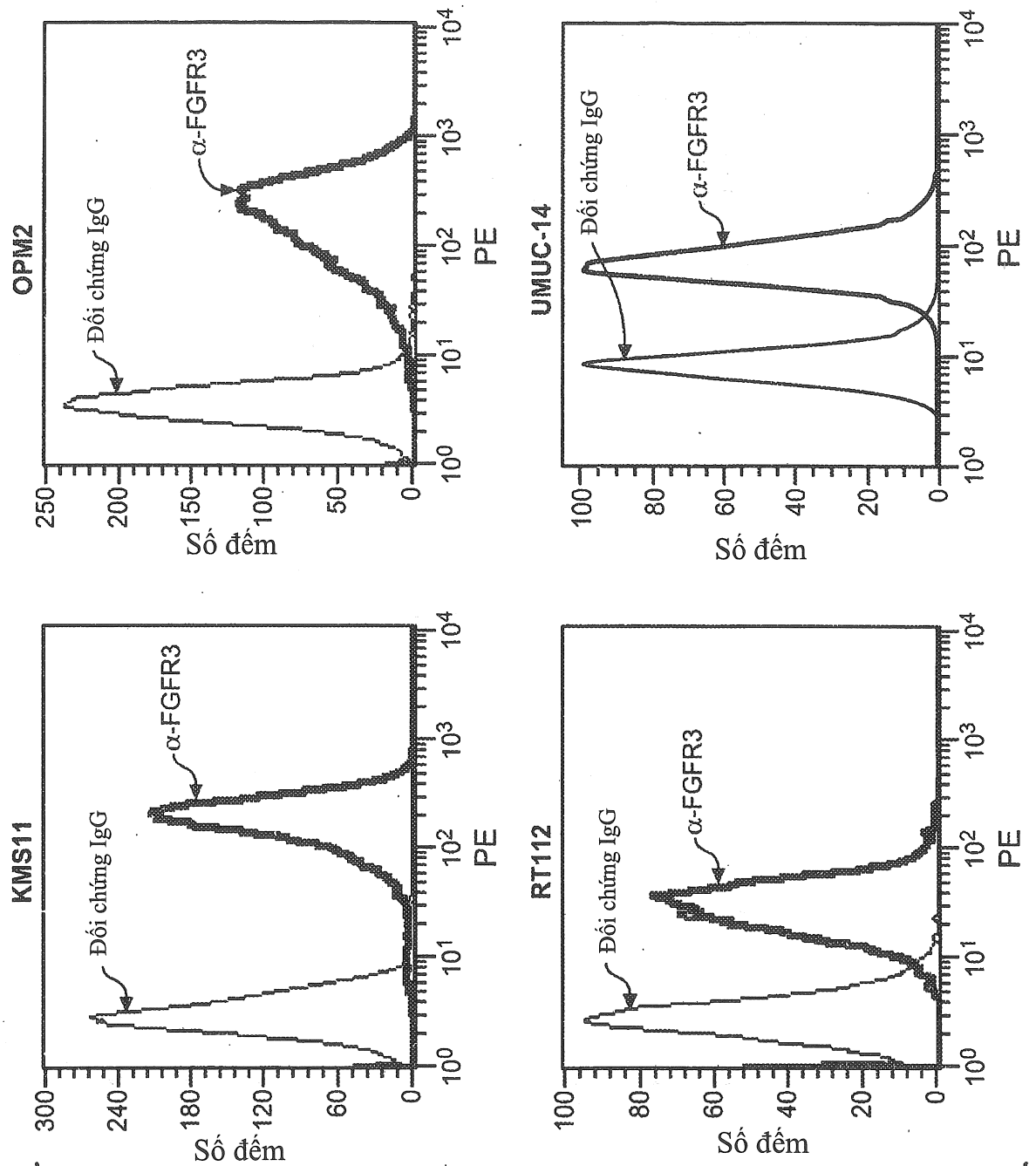


FIG. 23A

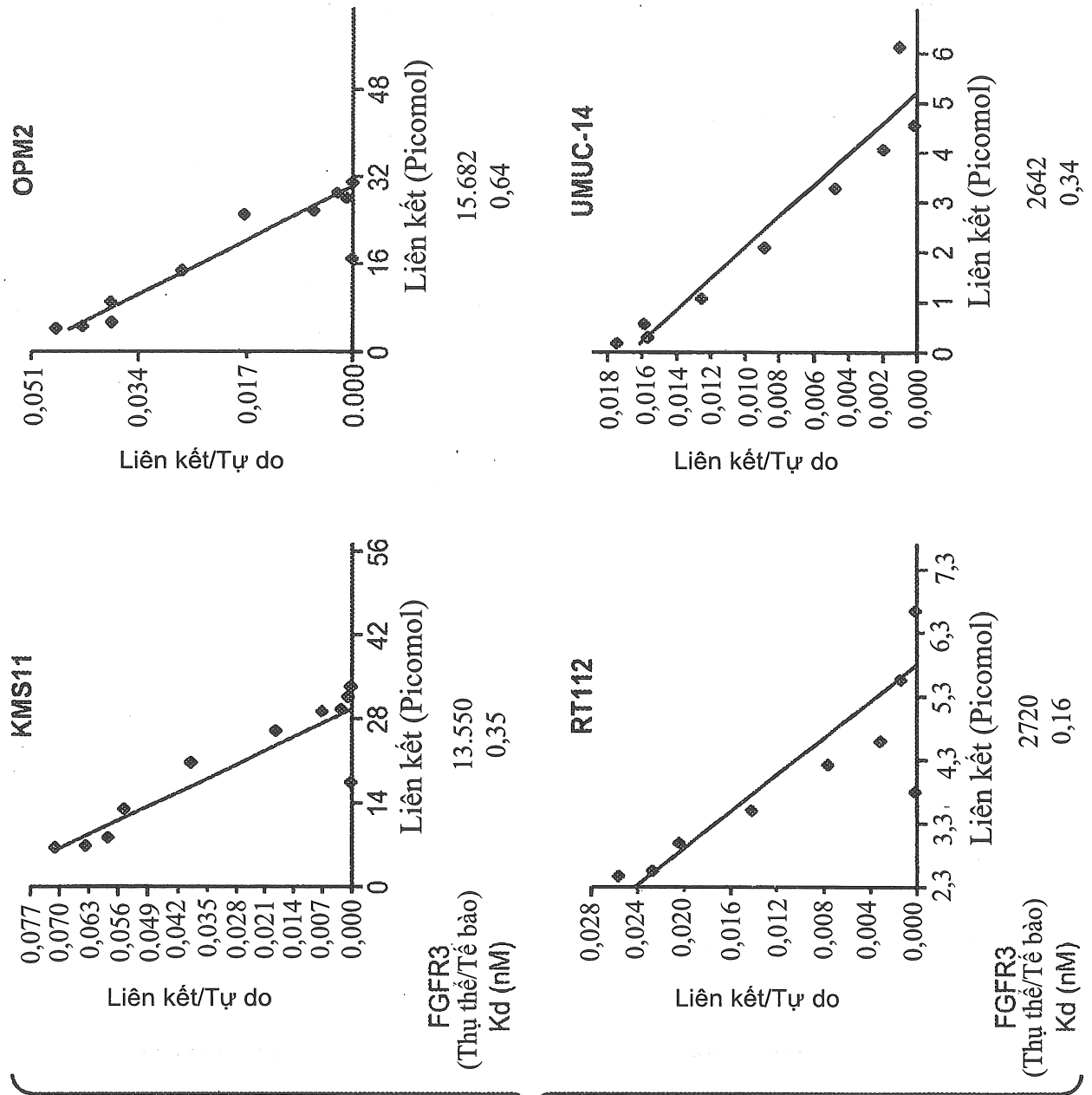
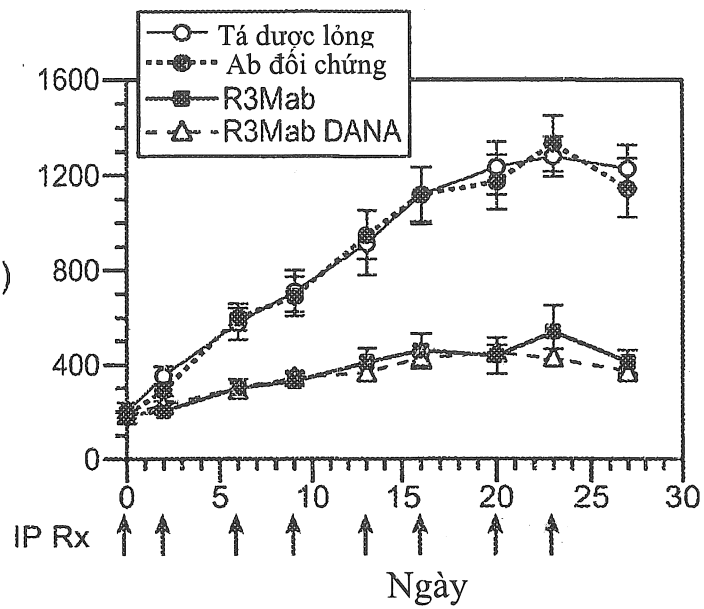


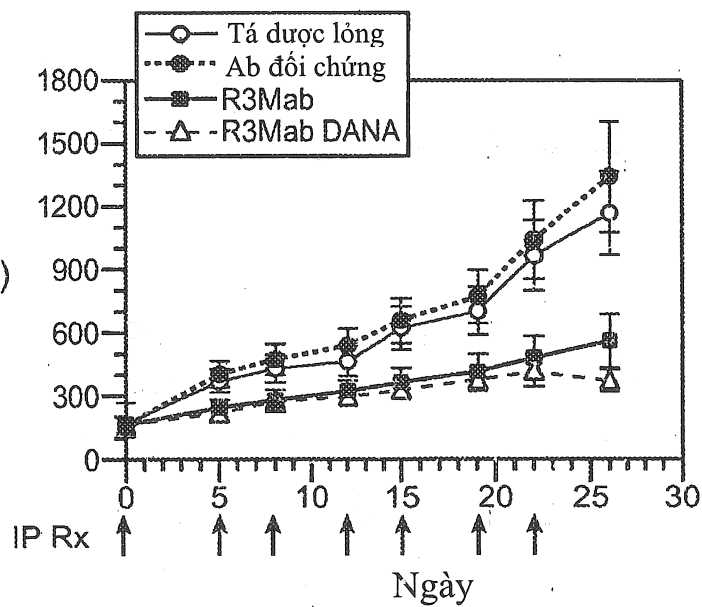
FIG. 23B

35 / 35

Thể tích khối
u trung bình (mm^3)

**FIG. 24A**

Thể tích khối
u trung bình (mm^3)

**FIG. 24B**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GENENTECH INC.

ASHKENAZI, Avi

QING, Jing

WIESMANN, Christian

WU, Yan

<120> KHÁNG THỂ ĐỐI KHÁNG KHÁNG THỤ THỂ YẾU TỔ TĂNG TRƯỞNG NGUYÊN BÀO SỢI 3 (FGFR-3) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> P4294R1 WO

<140>

<141>

<150> 61/163,222

<151> 25-03-2009

<160> 271

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1

5

10

$\langle 210 \rangle \quad 2$

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

 $\langle 400 \rangle \quad 2$

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

 $\langle 210 \rangle \quad 3$

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

 $\langle 400 \rangle$ 3

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

$\langle 210 \rangle$ 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 5

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

 $\langle 210 \rangle$ 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 6

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 8

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 9

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 11

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 12

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr

1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 14

Peptit to

n Tyr Ala

Peptit t

Asp Tyr

$\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Ile Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 17

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 18

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"
poly

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 20

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 20

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

23152

20

25

<210> 21

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 21

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20

25

<210> 22

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 22

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20

25

<210> 23

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"
poly

<400> 23

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1			5					10						15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Val	Ser		
			20					25					30		

<210> 24

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 24

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1			5					10						15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser							
			20					25							

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 25

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

20 25

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 26

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser

20 25

<210> 27

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 27

Glu	Val	Gln	Leu	Val	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		
			20					25					30		

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 28

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser							
			20					25							

<210> 29

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 30

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 31

Glu	Val	Gln	Leu	Val	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	Asn	Ile	Lys		
				20				25					30		

<210> 32

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 32

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20

25

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20

25

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 34

Glu Val Gln Leu Val 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	Asn
Ile	Lys		
20	25	30	

<210> 35

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 35

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1	5	10	15												
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser							
20	25														

<210> 36

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 37

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

<210> 38

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 38

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

20

<210> 39

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 39

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 40

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 41

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 41

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

20

<210> 42

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 42

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

20

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 43

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 44

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 44

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1					5				10					15	
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
					20				25					30	

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 45

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
1				5				10	

<210> 46

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 47

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10

<210> 48

$\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 48

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 49

Gly Arg Ile Tyr Pro Leu Tyr Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 50

$\langle 211 \rangle$ 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 50

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 51

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 52

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1

5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 53

Gln Gln Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Thr

1

5

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 54

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 55

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 55

Gly Arg Ile Tyr Pro Tyr Asp Asp Ser Phe Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 56

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 57

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 58

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1

5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 59

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Leu Thr

1

5

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 61

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 62

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr
 1 5 10 15
 Val Met Asp Tyr
 20

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 63

Arg Ala Ser Gln Val Ile Asp Ile Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 64

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1

5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 65

Gln Gln Ser Ala Ala Asp Pro Tyr Thr

1

5

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 66

Gly Phe Ser Phe Thr Gly Thr Gly Ile Ser

1

5

10

<210> 67

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 67

Gly Ser Ile Tyr Pro Tyr Phe Ala Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 68

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 69

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1

5

10

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 70

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1

5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 71

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1

5

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 72

Gly Phe Thr Phe Tyr Thr Thr Gly Ile Ser

1

5

10

<210> 73

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 73

Gly Arg Ile Tyr Pro Ala Phe Gly Ser Ser Ile Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 74

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 74

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 75

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 76

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 77

Gln Gln Thr Tyr Ser Ala Gln Pro Thr

1 5

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 78

Gly Phe Ser Phe Trp Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 79

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 79

Gly Arg Ile Tyr Pro Ser Ser Ala Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 80

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 81

$\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 81

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 82

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 83

Gln Gln Ser Tyr Ser His Gln Ser Thr

1 5

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 84

23152

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 85

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 85

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 86

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 87

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala

1

5

10

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 88

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1

5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 89

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr

1 5

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 90

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 91

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 91

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

23152

1	5	10	15
Lys	Gly		

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 92

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Met Asp Tyr

20

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 93

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala

1	5	10
---	---	----

<210> 94

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 94

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1

5

<210> 95

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 95

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr

1

5

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 96

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 97

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 97

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 98

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 98

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 99

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

 $\langle 210 \rangle$ 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

$\langle 400 \rangle$ 100

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1

5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 101

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr

1

5

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 102

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1

5

10

<210> 103

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 103

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gln Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 104

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 104

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 105

$\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 105

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 106

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 107

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr

1 5

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 108

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 109

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 109

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

 $\langle 210 \rangle$ 110

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 112

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1

5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 113

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr

1

5

<210> 114

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 114

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1

5

10

<210> 115

23152

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 115

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 116

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 116

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 117

$\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 117

Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 118

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1 5

<210> 119

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 119

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 120

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 120

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 121

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 121

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 122

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 122

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

 $\langle 210 \rangle$ 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

 $\langle 400 \rangle$ 123

Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala

1 5 10

$\langle 210 \rangle$ 124

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 124

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1

5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 125

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr

1

5

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 126

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 127

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 127

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Gln Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 128

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 128

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 129

Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ser Leu Ala

1

5

10

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 130

Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser

1

5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 131

Gln Gln Gly Ala Gly Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 132

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 132

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr

20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

23152

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
 100 105 110
 Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125

<210> 133

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 133

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 Asp Val Asp Thr Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Thr Gly His Pro Gln
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 134

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 134

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

<210> 135

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 135

```

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 Asp Val Asp Ile Ser
             20             25             30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
             35             40             45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Gly Ala Gly Asn Pro Tyr
             85             90             95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
             100            105

```

<210> 136

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 136

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

<210> 137

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 137

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 Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

```

          35              40              45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Thr Tyr Thr Thr Ser Leu
          85              90              95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100              105

```

<210> 138

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 138

```

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

```

23152

Ala Arg Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr
 100 105 110
 Glu Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125

<210> 139

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 139

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 Asp Val Glu Thr Ser
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Thr Gly His Pro Gln
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 140

Arg Ala Ser Gln Asp Val Glu Thr Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 141

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 142

Gln Gln Ser Thr Gly His Pro Gln Thr

1

5

<210> 143

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 143

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Gly Ile Ser

1

5

10

<210> 144

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 144

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1

5

10

15

Lys Gly

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (7)..(7)

<223> /thay thế="Glu" hoặc "Ser"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (8)..(8)

<223> /thay thế="Ile"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (9)..(9)

<223> /thay thế="Ser"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (10)..(10)

<223> /thay thế="Leu"

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(10)

<223> /chú thích="Các gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu tiên so với các gốc trong phần chú thích cho các vị trí này"

<400> 146

Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ala Val Ala

1

5

10

<210> 147

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (1)..(1)

<223> /thay thế="Gly"

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /chú thích="Gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu tiên
so với chú thích cho vị trí này"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (6)..(6)

<223> /thay thế="Tyr"

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> /chú thích="Gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu tiên
so với chú thích cho vị trí này"

<400> 147

Ser Ala Ser Phe Leu Ala Ser

1

5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (3)..(3)

<223> /thay thế="Ser" hoặc "Thr"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (4)..(4)

<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Ala"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (5)..(5)

<223> /thay thế="Ser" hoặc "Thr" hoặc "Ala"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (6)..(6)

<223> /thay thế="His" hoặc "Asp" hoặc "Thr" hoặc "Asn"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (7)..(7)

<223> /thay thế="Pro" hoặc "Ser"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (8)..(8)

<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Leu" hoặc "Pro" hoặc "Gln"

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(8)

<223> /chú thích="Các gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu tiên so với các gốc trong phần chú thích cho các vị trí này"

<400> 148

Gln Gln Gly Thr Gly Ala Gln Ser Thr

1

5

<210> 149

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (3)..(3)

<223> /thay thế="Thr"

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> /chú thích="Gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu tiên
so với chú thích cho vị trí này"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (5)..(5)

<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Ser" hoặc "Thr"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (6)..(6)

<223> /thay thế="Gly" hoặc "Thr"

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(6)

<223> /chú thích="Các gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu
tiên so với các gốc trong phần chú thích cho các vị trí này"

<400> 149

Gly Phe Ser Phe Trp Ser Thr Gly Ile Ser

1

5

10

<210> 150

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (6)..(6)

<223> /thay thế="Ala" hoặc "Leu" hoặc "Ser" hoặc "Thr"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (7)..(7)

<223> /thay thế="Gln" hoặc "Asp" hoặc "Gly" hoặc "Tyr" hoặc
"Ser" hoặc "Asn" hoặc "Phe"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (8)..(8)

<223> /thay thế="Asp" hoặc "Gly"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (9)..(9)

<223> /thay thế="Ser"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (10)..(10)

<223> /thay thế="Phe" hoặc "Thr" hoặc "Ser"

$\langle 220 \rangle$

<221> BIẾN THỂ

$$\langle 222 \rangle \quad (11) \dots (11)$$

<223> /thay thế="His" hoặc "Asn" hoặc "Ile"

 $\langle 220 \rangle$

<221> misc feature

$\langle 222 \rangle$ (6) .. (11)

<223> /chú thích="Các gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu tiên so với các gốc trong phần chú thích cho các vị trí này"

<400> 150

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

1 5 10 15

Lys Gly

$\langle 210 \rangle$ 151

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 151

Ala Arg Thr Tyr Gly Ile Tyr Asp Leu Tyr Val Asp Tyr Thr Glu Tyr

1 5 10 15

Val Met Asp Tyr

20

<210> 152

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (5)..(5)

<223> /thay thế="Asp"

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> /chú thích="Gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu tiên
so với chú thích cho vị trí này"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (7)..(7)

<223> /thay thế="Glu" hoặc "Ser"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (8)..(8)

<223> /thay thế="Ile"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (9) . . (9)

```
<223> /thay thế="Ser"
```

 $\langle 220 \rangle$

<221> misc feature

<222> (7) . . (9)

<223> /chú thích="Các gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu tiên so với các gốc trong phần chú thích cho các vị trí này"

<400> 152

Arg Ala Ser Gln Val Val Asp Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

 $\langle 220 \rangle$

<221> BIẾN THỂ

$$\langle 222 \rangle \quad (3) \dots (3)$$

<223> /thay thế="Gly" hoặc "Thr"

 $\langle 220 \rangle$

<221> BIẾN THỂ

$$\langle 222 \rangle \quad (4) \dots (4)$$

<223> /thay thế="Thr" hoặc "Ala"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (5) .. (5)

<223> /thay thế="Gly"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (6) .. (6)

<223> /thay thế="His" hoặc "Asn"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (7) .. (7)

<223> /thay thế="Ser"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (8) .. (8)

<223> /thay thế="Gln" hoặc "Tyr" hoặc "Leu"

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) .. (8)

<223> /chú thích="Các gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu tiên so với các gốc trong phần chú thích cho các vị trí này"

<400> 153

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1

5

<210> 154

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (6)..(6)

<223> /thay thế="Leu"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (7)..(7)

<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Ser" hoặc "Gly" hoặc "Ala" hoặc "Gln"

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> /chú thích="Các gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu tiên so với các gốc trong phần chú thích cho các vị trí này"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (11)..(11)

<223> /thay thế="His"

<220>

<221> misc_feature

$$\langle 222 \rangle \quad (11) \dots (11)$$

<223> /chú thích="Gốc đã cho trong trình tự này không có sự ưu tiên
so với chú thích cho vị trí này"

<400> 154

Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 155

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 155

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 156

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 156

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

[illegible]

<210> 157

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 157

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 158

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 158

Thr Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Ile Leu Ala Ser

1 5 10

<210> 159

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 159

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5 10

<210> 160

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 160

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp

1 5 10

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 161

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Leu Thr

1

5

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 162

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr

1

5

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 163

Gln Gln Leu Tyr Ser Pro Pro Trp Thr

1

5

<210> 164

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 164

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Met Tyr

1 5 10

<210> 165

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 165

Gly Tyr Val Phe Thr His Tyr Asn Met Tyr

1 5 10

<210> 166

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 166

Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Asn Met Tyr

1 5 10

<210> 167

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 167

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

1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly

20

<210> 168

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 168

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

1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly

20

<210> 169

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 169

Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Ile Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln

1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly

20

<210> 170

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 170

Ala Ser Pro Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Pro Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 171

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 171

Ala Arg Gly Gln Gly Pro Asp Phe Asp Val

1 5 10

<210> 172

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 172

Ala Arg Trp Gly Asp Tyr Asp Val Gly Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 173

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 173

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 Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile


```

          35              40              45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50              55              60
Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
          85              90              95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
    100              105

```

<210> 174

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 174

```

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 Asp Val Ser Thr Ala
          20              25              30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35              40              45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr 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 Thr Thr Pro Pro
          85              90              95

```

23152

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 175

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 175

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1

5

10

15

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

20

25

30

<210> 176

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 176

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

<210> 177

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 177

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 178

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 178

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 179

<211> 15

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 179

Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala

1 5 10 15

<210> 180

<211> 15

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 180

Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro

1 5 10 15

<210> 181

<211> 15

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 181

His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser

1 5 10 15

<210> 182

<211> 15

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 182

Ser Asn Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro

1 5 10 15

<210> 183

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 183

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 184

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 184

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 185

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 185

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10

<210> 186

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 186

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 187

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 187

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 188

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 188

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

20

<210> 189

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 189

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 190

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 191

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 191

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1

5

10

<210> 192

<211> 65

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 192

gatccccgca tcaagctgcg gcatcattca agagatgatg ccgcagcttg atgctttttt
60

ggaaa
65

<210> 193

<211> 65

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 193

gatcccctgc acaacctcga ctactattca agagatagta gtcgagggtg tgcatttttt
60

ggaaa
65

<210> 194

<211> 65

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp"

<400> 194

gatccccaac ctcgactact acaagattca agagatcttg tagtagtcga ggTTTTTTTT
60

ggaaa
65

<210> 195

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn môi tổng hợp"

<400> 195

gtcagatatc gtkctsacmc artctccwgc
30

<210> 196

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp"

<400> 196

gatcgacgta cgctgagatc carytgcarc artctgg
37

<210> 197

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp"

<400> 197

gtcagatatc gtgctgacmc artctcc
27

<210> 198

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp"

<400> 198

gatcgacgta cgctgagatc carytgcarc artctgg
37

<210> 199

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp"

<400> 199

gtacgatatc cagatgacmc artctcc
27

<210> 200

<211> 37

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp"

<400> 200

gatcgacgta cgctgagatc carytgcarc artctgg
37

<210> 201

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp"

<400> 201

tttdakytcc agcttggtac c
21

<210> 202

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp"

<400> 202

acagtgggcc cttggtggag gctgmrgaga cdgtgashrd rgt
43

<210> 203

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 203

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

 $\langle 210 \rangle \quad 204$

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 204

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
1				5					10					15	
Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
				20					25					30	

<210> 205

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 205

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 206

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 206

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

1 5 10

<210> 207

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 207

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 208

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 208

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 209

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 209

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

1 5 10

<210> 210

<211> 31

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 210

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 211

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 211

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 212

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 212

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

1 5 10

<210> 213

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 213

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 214

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 214

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 215

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 215

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

23152

1 5 10

<210> 216

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 216

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys
1					5				10					15	
Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
					20				25					30	

<210> 217

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 217

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1					5				10	

<210> 218

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 218

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

1 5 10

<210> 219

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 219

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 220

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 221

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 221

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

1 5 10

<210> 222

<211> 31

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 222

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

1 5 10 15

23152

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

<210> 223

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 223

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 224

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 224

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

<210> 225

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 225

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 226

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 226

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 227

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 227

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

1 5 10

<210> 228

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 228

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 229

$\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 229

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 230

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 230

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10

<210> 231

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 231

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 232

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 232

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

<210> 233

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 233

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1

5

10

<210> 234

<211> 31

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 234

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
			20					25					30		

<210> 235

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 235

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 236

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 236

23152

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10

<210> 237

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 237

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 238

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 238

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 239

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 239

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

10

$\langle 210 \rangle$ 240

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

$\langle 400 \rangle$ 240

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

15

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

30

$\langle 210 \rangle$ 241

$\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 241

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

$\langle 210 \rangle$ 242

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 242

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10

$\langle 210 \rangle$ 243

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 243

23152

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

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

<210> 244

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 244

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 245

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 245

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

<210> 246

<211> 31

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 246

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	
			20					25					30		

<210> 247

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 247

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 248

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 250

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 251

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 251

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10

<210> 252

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 252

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

23152

1	5	10	15
Met	Asn Ser	Leu Arg	Ala Glu Asp Thr
		Ala Val	Tyr Tyr Cys Ala Arg
	20	25	30

<210> 253

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 253

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1	5	10
---	---	----

<210> 254

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 254

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1	5	10
---	---	----

<210> 255

<211> 31

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 255

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 256

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 256

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 257

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 257

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1 5 10

<210> 258

<211> 30

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 258

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 259

$\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 259

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 260

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 260

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 261

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 261

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 262

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 262

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1

5

10

<210> 263

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 263

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

1

5

10

15

<210> 264

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 264

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	
Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30	

<210> 265

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 265

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
1				5					10

<210> 266

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 266

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

1 5 10 15

<210> 267

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 267

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 268

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 268

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 269

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 269

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5				10					15	

<210> 270

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 270

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5				10				15			
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20				25				30			

<210> 271

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /chú thích="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 271

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1

5

10