



(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)



1-0024749

(51)⁷ A61K 39/395; C07K 16/28; A61P 35/00; (13) B
A61K 31/4184

(21) 1-2012-00677

(22) 12/08/2010

(86) PCT/EP2010/004939 12/08/2010

(87) WO2011/018224 17/02/2011

(30) 09010489.4 14/08/2009 EP

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/01/2013 298A

(73) ROCHE GLYCART AG (CH)

Wagistrasse 18 CH-8952 Schlieren (CH)

(72) HERTING, Frank (DE); Christian Klein (DE).

(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG CD20 ĐƯỢC AFUCOSYL HÓA

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa kết hợp với bendamustin để điều trị bệnh ung thư. Cụ thể là chế phẩm theo sáng chế chứa kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người được afucosyl hóa kết hợp với bendamustin để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến liệu pháp kết hợp kháng thể CD20 được afucosyl hóa với bendamustin để điều trị bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các kháng thể được afucosyl hóa

Các chức năng tác động do tế bào tạo ra của các kháng thể đơn dòng có thể được tăng cường bằng cách biến đổi di truyền thành phần oligosacarit của chúng như đã được mô tả trong tài liệu: Umaña, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 và US 6,602,684. Các kháng thể loại IgG1, kháng thể thường được sử dụng nhiều nhất trong liệu pháp miễn dịch ung thư, là các glycoprotein mà có điểm glycosylat hóa liên kết-N bảo toàn tại Asn297 ở mỗi miền CH2. Hai phức hệ oligosacarit hai râu được gắn với Asn297 được chôn giữa các miền CH2, tạo ra các tiếp xúc mở với khung chính polypeptit, và sự có mặt của chúng là cần thiết đối với kháng thể làm trung gian các chức năng tác động như tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (Lifely, M.R., et al., Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., et al., Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A, và Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32). Umaña, P., et al.. Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 và WO1999/54342 đã cho thấy rằng sự biểu hiện quá mức ở các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) của $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferaza III ("GnTIII"), glycosyltransferaza xúc tác quá trình hình thành các oligosacarit cắt đôi, làm tăng đáng kể hoạt tính ADCC *in vitro* của các kháng thể. Sự thay đổi trong chế phẩm carbohydrat N297 hoặc tác động loại bỏ của chúng cũng gắn kết với Fc gắn kết với Fc γ R và C1q (Umaña, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; Davies, J., et al., Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294; Mimura, Y., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001)

45539-45547; Radaev, S., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 16478-16483; Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Shields, R.L., et al., J. Biol. Chem. 277 (2002) 26733-26740; Simmons, L.C., et al., J. Immunol. Methods 263 (2002) 133-147).

Các nghiên cứu thảo luận về các hoạt tính của các kháng thể được afucosyl hóa và fucosylat hóa, bao gồm các kháng thể kháng CD20, đã được báo cáo (ví dụ, Iida, S., et al., Clin. Cancer Res. 12 (2006) 2879-2887; Natsume, A., et al., J. Immunol. Methods 306 (2005) 93-103; Satoh, M., et al., Expert Opin. Biol. Ther. 6 (2006) 1161-1173; ; Kanda, Y., et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; Davies, J., et al., Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294.

CD20 và các kháng thể kháng CD20

Phân tử CD20 (còn được biết đến là kháng nguyên biệt hóa giới hạn lympho bào B hoặc Bp35 ở người) là protein màng chuyển tiếp kỵ nước được định vị trên các lympho bào tiền-B và lympho bào B trưởng thành đã được mô tả rộng rãi (Valentine, M.A., et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 11282-11287; và Einfeld, D.A., et al., EMBO J. 7 (1988) 711-717; Tedder, T.F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 208-12; Stamenkovic, I., et al., J. Exp. Med. 167 (1988) 1975-80; Tedder, T.F., et al., J. Immunol. 142 (1989) 2560-8). CD20 được biểu hiện trên 90% u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B (NHL) (Anderson, K.C., et al., Blood 63 (1984) 1424-1433)), nhưng không được thấy trên các tế bào mầm tạo huyết, các tế bào tiền-B, các tế bào huyết tương bình thường, hoặc các mô bình thường khác (Tedder, T.F., et al., J. Immunol. 135(2) (1985) 973-979).

Có hai loại kháng thể khác nhau kháng CD20 tồn tại khác nhau đáng kể về kiểu gắn kết CD20 và các hoạt tính sinh học của chúng (Cragg, M.S., et al., Blood 103 (2004) 2738-2743; và Cragg, M.S., et al., Blood 101 (2003) 1045-1051). Các kháng thể typ I, ví dụ như rituximab, là hiệu nghiệm về khả năng gây độc trung gian bổ sung, trong khi các kháng thể typ II như các kháng thể

Tositumomab (B1), 11B8, AT80 hoặc B-Ly1 được làm tương thích với người, và gây ra sự chết tế bào đích một cách hữu hiệu nhờ gây chết tế bào không phụ thuộc capa bởi sự tiếp xúc phosphatidylserin đồng thời.

Các đặc tính phân chia chung của các kháng thể kháng CD20 typ I và typ II được tóm tắt trong Bảng 1.

Bảng 1: Các đặc tính của các kháng thể kháng CD20 typ I và typ II

Các kháng thể kháng CD20 typ I	Các kháng thể kháng CD20 typ II
Epitop CD20 typ I	Epitop CD20 typ II
Định vị CD20 với các khối lipid	Không định vị CD20 với các khối lipid
CDC tăng (nếu là isotyp IgG1)	CDC giảm (nếu là isotyp IgG1)
Hoạt tính ADCC (nếu là isotyp IgG1)	Hoạt tính ADCC (nếu là isotyp IgG1)
Dung lượng gắn kết đầy đủ	Dung lượng gắn kết giảm
Kết tụ đồng kiểu	Kết tụ đồng kiểu mạnh hơn
Kích thích gây chết tế bào khi liên kết chéo	Kích thích gây chết tế bào mạnh không liên kết chéo

Bendamustin

Bendamustin (tên thương mại là Ribomustin và Treanda; còn được biết đến là SDX-105) là hạt cải nitơ được sử dụng trong điều trị bệnh bạch cầu limpho mãn tính (CLL) (Kath, R., et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127 (2001) 48-54) và u bạch huyết non-Hodgkin (NHL). Nó thuộc về họ của các thuốc được gọi là các tác nhân alkylat hóa. Nó cũng đang được nghiên cứu để điều trị sarcoma (Bagchi, S., Lancet Oncol. 8 (2007) 674).

Bendamustin đã từng được sử dụng như tác nhân điều trị với các tác nhân khác nhau, bao gồm rituximab (Cheson, B.D., et al., J Clin Oncol. 27(9) 2009 1492-501; Knauf, W., Expert Rev Anticancer Ther. (2) 9 (2009) 165-74; Plosker, G.L., et al., Drugs. 68(18) (2008) 2645-60).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Bất ngờ là việc kết hợp bendamustin với kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa cho thấy tác dụng hiệp đồng (ví dụ, thậm chí còn nhiều hơn phụ gia) đối với tác dụng kháng tăng sinh so với sự kết hợp của rituximab kháng thể CD20 không được afucosyl hóa.

Sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa với lượng fucoza 60% hoặc ít hơn của tổng lượng oligosacarit (đường) ở Asn297, để bào chế được phẩm dùng để điều trị bệnh ung thư kết hợp với bendamustin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh nhân bị ung thư bằng cách cung cấp kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa với lượng fucoza 60% hoặc ít hơn tổng lượng oligosacarit (đường) ở Asn297, kết hợp với bendamustin, cho bệnh nhân cần được điều trị.

Một khía cạnh khác, sáng chế mô tả kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa với lượng fucoza 60% hoặc ít hơn tổng lượng oligosacarit (đường) ở Asn297, để điều trị bệnh ung thư kết hợp với bendamustin.

Theo một phương án của sáng chế, lượng fucoza là giữa 40 % và 60 % của tổng lượng oligosacarit (đường) ở Asn297.

Theo một phương án khác của sáng chế, lượng fucoza là 0% của tổng lượng ligosacarit (đường) ở Asn297.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa là kháng thể IgG1.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa là kháng thể B-ly được làm tương thích với người, và bệnh ung thư là bệnh ung thư biểu hiện CD20, mà là u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B (NHL).

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể B-ly 1 được làm tương thích với người được cung cấp với liều 800 đến 1200mg vào ngày 1, 8, 15 với chu kỳ

liều lượng 6 tuần và sau đó với liều 800 đến 1200mg vào ngày 1 lên đến 5 ngày với chu kỳ liều lượng 4 tuần, và bendamustin được cung cấp với liều 80mg/m² đến 110mg/m² vào ngày 1 và 2 lên đến 6 ngày với chu kỳ liều lượng 4 tuần.

Một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa với lượng fucoza 60% hoặc ít hơn và bendamustin để điều trị bệnh ung thư.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig. 1. Hoạt tính chống u *in vivo* của điều trị kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 typ II được afucosyl hóa (B-HH6-B-KV1 GE) với fludarabin (so với sự kết hợp giữa rituximab (= kháng thể kháng CD20 typ I focusylat được hóa) với fludarabin và so với đơn trị liệu tương ứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa của isotyp IgG3 hoặc IgG1 (tốt hơn là isotyp IgG1) với lượng fucoza 60% hoặc ít hơn tổng lượng oligosacarit (đường) ở Asn297, để bào chế được phẩm dùng để điều trị bệnh ung thư kết hợp với bendamustin. Theo một phương án của sáng chế, kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa gắn kết CD20 với KD từ 10⁻⁹M đến 10⁻¹³mol/l.

Theo một phương án của sáng chế, lượng fucoza là giữa 40% và 60% tổng lượng oligosacarit (đường) ở Asn297.

Thuật ngữ "kháng thể" bao gồm các dạng khác nhau của các kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể nguyên, các kháng thể người, các kháng thể được làm tương thích với người và các kháng thể được biến đổi di truyền như các kháng thể đơn dòng, các kháng thể dạng khảm hoặc các kháng thể tái tổ hợp cũng như các phần của các kháng thể này với điều kiện là các đặc tính đặc trưng theo sáng chế được giữ lại. Các thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "chế phẩm chứa kháng thể đơn dòng" theo sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa các phân tử kháng thể của hợp chất axit amin đơn. Vì vậy, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng người" đề cập đến các kháng thể thể hiện tính gắn kết đơn

mà có các vùng ổn định và biến đổi thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. Theo một phương án, các kháng thể đơn dòng người được tạo ra bởi tế bào lai bao gồm tế bào B thu được từ động vật không phải là người biến đổi gen, ví dụ chuột biến đổi gen, có hệ gen bao gồm gen biến đổi chuỗi nặng người và gen biến đổi chuỗi nhẹ người kết hợp với tế bào bất tử.

Thuật ngữ "kháng thể dạng khảm" đề cập đến kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi, tức vùng gắn kết, từ một nguồn hoặc loài và ít nhất một phần của vùng ổn định thu được từ một nguồn hoặc loài khác, thường được bào chế bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Các kháng thể dạng khảm bao gồm vùng biến đổi chuột và vùng ổn định người được ưu tiên đặc biệt. Các kháng thể dạng khảm chuột/người này là sản phẩm của các gen globulin miễn dịch biểu hiện bao gồm các đoạn ADN mã hóa các vùng biến đổi globulin miễn dịch chuột và các đoạn ADN mã hóa các vùng ổn định globulin miễn dịch người. Các dạng khác của "các kháng thể dạng khảm" nằm trong sáng chế là các loại trong đó lớp hoặc lớp phụ được cải biến hoặc thay đổi từ lớp hoặc lớp phụ của kháng thể gốc. Các kháng thể "dạng khảm" đó cũng được đề cập đến như "các kháng thể chuyển đổi nhóm." Các phương pháp để tạo ra các kháng thể dạng khảm bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp ADN và biến đổi gen thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem ví dụ tài liệu Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238 và US 5,204,244.

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người" đề cập đến các kháng thể trong đó khung hoặc "các vùng xác định hỗ trợ" (CDR) được cải biến để bao gồm CDR của globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác so với tính đặc hiệu của globulin miễn dịch gốc. Theo một phương án được ưu tiên, CDR chuột được cấy ghép vào vùng khung của kháng thể người để tạo ra "kháng thể được làm tương thích với người." Xem ví dụ tài liệu Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; và Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270.

Thuật ngữ "kháng thể người", theo sáng chế, sẽ bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. Các kháng thể người là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật (van Dijk,

M.A., và van de Winkel, Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Dựa vào kỹ thuật này, các kháng thể người chống lại rất nhiều loại đích khác nhau có thể được tạo ra. Các ví dụ về các kháng thể người được mô tả trong tài liệu Kellermann, S.A., et al., Curr. Opin. Biotechnol. 13 (2002) 593-597 chẳng hạn.

Thuật ngữ "kháng thể người tái tổ hợp", theo sáng chế, sẽ bao gồm tất cả các kháng thể người được bào chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng cách tái tổ hợp, các kháng thể này được phân lập từ tế bào chủ như tế bào NS0 hoặc CHO hoặc từ động vật (ví dụ như chuột) được biến đổi gen đối với các gen globulin miễn dịch người hoặc các kháng thể biểu hiện bằng cách sử dụng vật truyền biểu hiện tái tổ hợp chuyển nhiễm vào tế bào chủ. Các kháng thể người tái tổ hợp này có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người dưới dạng sắp xếp lại. Các kháng thể người tái tổ hợp theo sáng chế được tạo siêu đột biến soma *in vivo*. Vì vậy, các trình tự axit amin của các vùng VH và VL của các kháng thể tái tổ hợp là trình tự mà, trong khi thu được và liên quan đến các trình tự người dòng mầm VH và VL, có thể không tồn tại tự nhiên trong kho dòng mầm kháng thể người *in vivo*.

Theo sáng chế, thuật ngữ "gắn kết" hoặc "gắn kết đặc hiệu" đề cập đến việc gắn kết kháng thể với epitop của kháng nguyên khối u trong thí nghiệm *in vitro*, tốt hơn là trong thí nghiệm cộng hưởng gen nguyên sinh (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden) với kháng nguyên chưa tinh khiết. Ái lực gắn kết được định nghĩa bằng các thuật ngữ k_a (tỉ lệ ổn định cho sự kết hợp của kháng thể từ phức hợp kháng thể/kháng nguyên), k_D (phân ly ổn định), và K_D (k_D/k_a). Gắn kết hoặc gắn kết đặc hiệu có nghĩa là ái lực gắn kết (K_D) của 10^{-8} mol/l hoặc thấp hơn, tốt hơn là 10^{-9} M đến 10^{-13} mol/l. Như vậy, kháng thể được afucosyl hóa theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên khối u với ái lực gắn kết (K_D) 10^{-8} mol/l hoặc thấp hơn, tốt hơn là 10^{-9} M đến 10^{-13} mol/l.

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic", theo sáng chế, sẽ bao gồm các phân tử ADN và các phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là sợi đơn hoặc kép, nhưng tốt hơn là ADN sợi kép.

Thuật ngữ "các vùng ổn định" không tạo ra sự gắn kết trực tiếp của kháng thể với kháng nguyên, nhưng các chức năng điều biến (ADCC, gắn kết bổ trợ, và CDC).

Thuật ngữ "vùng biến đổi" (vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH)) theo sáng chế đề cập đến từng cặp các chuỗi nặng và nhẹ tạo ra sự gắn kết trực tiếp của kháng thể với kháng nguyên. Các miền của các chuỗi nặng và nhẹ người biến đổi có cấu trúc chung tương tự và mỗi miền bao gồm bốn vùng khung (FR) mà các trình tự của chúng được bảo toàn rộng rãi, liên kết bởi ba "vùng siêu biến" (hoặc các vùng xác định bổ trợ, các CDR). Các vùng khung thông qua cấu hình tấm b- và các CDR có thể tạo ra các vòng nối với cấu trúc tấm b-. Các CDR được giữ trong cấu trúc ba chiều của chúng bằng các vùng khung và cùng với các CDR của chuỗi khác tạo ra điểm gắn kết kháng nguyên.

Các thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể" khi được sử dụng ở đây đề cập đến các gốc axit amin của kháng thể mà có thể tạo ra gắn kết kháng nguyên. Vùng siêu biến bao gồm các gốc axit amin từ "các vùng xác định bổ trợ" hoặc "các CDR". Các vùng "khung" hoặc "FR" là các vùng miền biến đổi ngoài các gốc vùng siêu biến như được xác định ở đây. Vì vậy, các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể bao gồm các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4 có các đầu tận cùng từ N- đến C-. Đặc biệt, CDR3 của chuỗi nặng là vùng góp phần nhiều nhất vào gắn kết kháng nguyên. Các vùng CDR và FR được xác định theo cách xác định chuẩn của Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) và/hoặc các gốc từ "vùng siêu biến".

Bendamustin là axit 4-[5-[Bis(2-cloetyl)amino]-1-metylbenzimidazol-2-yl]buta-noic. Tên thương mại là Ribomustin và Treanda; bendamustin còn được biết đến là SDX-105). Bendamustin là hạt cải nitơ được sử dụng trong điều trị

bệnh bạch cầu limpho mãn tính (CLL) (Kath, R., et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127 (2001) 48-54) và u bạch huyết non-Hodgkin (NHL). Nó thuộc về họ của các được chất được gọi là các tác nhân alkylat hóa. Chúng cũng đang được nghiên cứu để điều trị sarcoma (Bagchi, S., Lancet Oncol. 8 (2007) 674).

Thuật ngữ “kháng thể được afucosyl hóa” đề cập đến kháng thể isotyp IgG1 hoặc IgG3 (tốt hơn là isotyp IgG1) với mẫu thay đổi glycosylat hóa trong vùng Fc ở Asn297 có một mức giảm dư lượng gốc fucoza. Glycosylat hóa của gG1 hoặc IgG3 trên người xảy ra ở Asn297 như là một lõi oligosacarit glycosylat hóa phức hợp hai râu fucosylat hóa chấm dứt với gốc 2 Gal. Những cấu trúc này được chỉ định là G0, G1 (α 1,6 hoặc α 1,3) hoặc gốc glycan G2, tùy thuộc vào lượng các gốc Gal cuối cùng (Raju, T.S., BioProcess Int. 1 (2003) 44-53). Glycosyl hóa typ CHO của kháng thể các phần Fc là, ví dụ như được mô tả bởi Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207. Các kháng thể được thể hiện tái hợp lại trong các tế bào chủ CHO không được cải biến glyco thường được fucosylat hóa ở Asn297 với một lượng ít nhất là 85%. Nên hiểu rằng thuật ngữ kháng thể được afucosyl hóa được sử dụng ở đây bao gồm kháng thể không fucoza trong mẫu glycosylat hóa này. Thường được biết đến là gốc glycosylat hóa được đặt trong kháng thể là asparagin tại vị trí 297 theo hệ thống số EU (“Asn297”).

“Hệ thống số EU” hoặc “chỉ số EU” thường được sử dụng để đề cập đến một gốc trong vùng ổn định chuỗi nặng globulin miễn dịch (ví dụ, chỉ số EU được đề cập đến trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) được kết hợp trong tài liệu này bằng cách viện dẫn).

Vì vậy kháng thể được afucosyl hóa theo sáng chế có nghĩa là kháng thể isotyp IgG1 hoặc IgG3 (tốt hơn là isotyp IgG1) trong đó lượng fucoza là 60% hoặc ít hơn tổng lượng oligosacarit (đường) ở Asn297 (có nghĩa là ít nhất 40% hoặc lớn hơn oligosacarit của vùng Fc ở Asn297 là được afucosyl hóa). Theo

một phương án lượng fucoza giữa 40% và 60% oligosacarit của vùng Fc ở Asn297. Theo một phương án khác lượng fucoza là 50% hoặc ít hơn, và theo một phương án khác nữa lượng fucoza là 30% hoặc ít hơn oligosacarit của vùng Fc ở Asn297. Theo một phương án thay thế lượng fucoza là 0% oligosacarit của vùng Fc ở Asn297. Theo sáng chế “lượng fucoza” nghĩa là lượng oligosacarit (fucoza) trong chuỗi oligosacarit (đường) ở Asn297, liên quan đến tổng lượng oligosacarit (đường) ở Asn 297 (ví dụ các cấu trúc phức hợp, lai và mannoza cao) được đo bởi khối phổ MALDI-TOF và được tính như giá trị trung bình (quy trình chi tiết để xác định lượng fucoza được đề cập như ví dụ trong WO2008/077546). Hơn nữa, theo một phương án của sáng chế, oligosacarit của vùng Fc được cắt đôi. Kháng thể được afucosyl hóa theo sáng chế có thể được thể hiện trong tế bào chủ được cải biến glyco được thiết kế để biểu hiện ít nhất một axit nucleic mã hóa polypeptit có hoạt tính GnTIII trong một lượng đủ để một phần oligosacarit được fucosyl hóa trong vùng Fc. Theo một phương án, polypeptit có hoạt tính GnTIII là sự hợp nhất polypeptit. Ngoài ra, hoạt tính của tế bào chủ α 1,6-fucosyltransferaza có thể được giảm hoặc loại bỏ theo US 6,946,292 để tạo ra các tế bào chủ được cải biến glyco. Lượng kháng thể fucosyl hóa có thể được xác định trước ví dụ, bằng các điều kiện lên men (ví dụ thời gian lên men) hoặc bởi sự kết hợp của ít nhất hai kháng thể với một lượng fucosylat hóa khác nhau. Như các kháng thể được afucosyl hóa và các phương pháp biến đổi di truyền glyco tương ứng như được mô tả trong WO2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180, WO 99/154342, WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 97/028267, US2006/0134709, US2005/0054048, US2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739. Các kháng thể biến đổi di truyền glyco có ADCC tăng. Các phương pháp biến đổi di truyền glyco khác sinh ra các kháng thể được afucosyl hóa theo như sáng chế được đề cập ví dụ như Niwa, R., et al.,

J. Immunol. Methods 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T., et al., J. Biol. Chem. 278 (2003) 3466-3473; WO03/055993 hoặc US2005/0249722.

Do đó, một khía cạnh khác của sáng chế là việc dùng kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa của isotyp IgG1 hoặc IgG3 (tốt hơn là isotyp IgG1) gắn kết đặc hiệu với CD20 với lượng fucoza 60% hoặc ít hơn tổng lượng oligosacarit (đường) ở Asn297, để bào chế được phẩm trong điều trị bệnh ung thư kết hợp với bendamustin. Theo một phương án, lượng fucoza là nằm trong khoảng từ 40% đến 60% tổng lượng oligosacarit (đường) ở Asn297.

CD20 (còn được gọi là CD20 kháng nguyên lympho bào-B, kháng nguyên bề mặt lympho bào-B B1, Leu-16, Bp35, BM5, và LF5; trình tự khác biệt bởi SwissProt cơ sở dữ liệu đầu vào P11836) là protein xuyên màng kỵ nước với trọng lượng phân tử khoảng 35kD đặt trên tế bào lympho tiền-B và B trưởng thành. (Valentine, M.A., et al., J. Biol. Chem. 264(19) (1989) 11282-11287; Tedder, T.F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 208-212; Stamenkovic, I., et al., J. Exp. Med. 167 (1988) 1975-80; Einfeld, D.A., et al., EMBO J. 7 (1988) 711-7; Tedder, T.F., et al., J. Immunol. 142 (1989) 2560-2568). Gen ở người tương ứng là màng tế bào kéo dài 4-miền, họ phụ A, thành phần 1, còn được gọi là MS4A1. Gen này mã hóa thành phần của gen họ màng tế bào kéo dài 4A. Các thành phần của họ protein mới sinh khác biệt bởi các đặc tính cấu trúc chung và các giới hạn nối intron/exon tương tự và các mô hình mô phỏng duy nhất hiển thị trong số các tế bào tạo máu và các mô nonlymphoít. Gen này mã hóa phân tử bề mặt lympho bào B mà đóng một vai trò trong việc phát triển và phân biệt tế bào B trong tế bào plasma. Thành phần trong họ được đặt tại 11q12, trong một cụm các thành phần trong họ. Thay thế nối của gen này dẫn tới hai biến thể bản sao mã hóa các protein tương tự.

Theo sáng chế, các thuật ngữ "CD20" và "kháng thể CD20" được sử dụng thay thế lẫn nhau và bao gồm các thể tương đồng loài, các isoform và các biến thể của CD20 người bất kỳ được biểu hiện một cách tự nhiên bởi các tế bào hoặc

được biểu hiện trên các tế bào chuyên nhiễm với gen CD20. Sự gắn kết của kháng thể theo sáng chế với kháng nguyên CD20 gây chết các tế bào biểu hiện CD20 (ví dụ các tế bào khối u) bằng cách làm bất hoạt CD20. Sự chết của các tế bào biểu hiện CD20 có thể xuất hiện bằng một hoặc nhiều trong các cơ chế dưới đây: kích thích cái chết/gây chết tế bào, ADCC và CDC.

Các từ đồng nghĩa của CD20, như được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm kháng nguyên lympho bào B CD20, kháng nguyên bề mặt lympho bào B B1, Leu-16, Bp35, BM5, và LF5.

Thuật ngữ “kháng thể kháng CD20” theo sáng chế là kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên CD20. Tùy thuộc vào các đặc tính gắn kết và các hoạt tính sinh học của các kháng thể kháng CD20 với kháng nguyên CD20, hai loại của các kháng thể kháng CD20 (các kháng thể kháng CD20 typ I và typ II) có thể được phân biệt như đề cập trong Cragg, M.S., et al., Blood 103 (2004) 2738-2743; và Cragg, M.S., et al., Blood 101 (2003) 1045-1051, xem bảng 2.

Bảng 2: Các đặc tính của các kháng thể kháng CD20 typ I và typ II

Các kháng thể kháng CD20 typ I	Các kháng thể kháng CD20 typ II
Epitop CD20 typ I	Epitop CD20 typ II
Định vị CD20 với các khối lipid	Không định vị CD20 với các khối lipid
CDC tăng (nếu là isotyp igG1)	CDC giảm (nếu là isotyp igG1)
Hoạt tính ADCC (nếu là isotyp igG1)	Hoạt tính ADCC (nếu là isotyp igG1)
Dung lượng gắn kết đầy đủ	Dung lượng gắn kết giảm
Kết tụ đồng kiểu	Kết tụ đồng kiểu mạng hơn
Kích thích gây chết tế bào khi liên kết chéo	Kích thích gây chết tế bào mạnh không liên kết chéo

Các ví dụ về các kháng thể kháng CD20 typ II bao gồm, ví dụ như kháng thể B-ly 1 được làm tương thích với người IgG1 (kháng thể IgG1 được làm

tương thích với người dạng khảm như đề cập trong WO2005/044859), 11B8 IgG1 (như được bộc lộ trong WO2004/035607), và AT80 IgG1. Các kháng thể kháng CD20 typ II thông thường của isotyp IgG1 biểu thị các đặc tính CDC đặc trưng. Các kháng thể kháng CD20 Typ II có CDC giảm (nếu là isotyp IgG1) so với các kháng thể typ I của isotyp IgG1.

Các ví dụ về các kháng thể kháng CD20 typ I bao gồm, ví dụ như rituximab, HI47 IgG3 (ECACC, hybridoma), 2C6 IgG1 (được bộc lộ trong WO2005/103081), 2F2 IgG1 (được bộc lộ trong WO2004/035607 và WO2005/103081) và 2H7 IgG1 (được bộc lộ trong WO2004/056312).

Các kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa theo sáng chế là trong một phương án kháng thể kháng CD20 typ II, theo một phương án cụ thể khác là kháng thể B-ly 1 được làm tương thích với người được afucosyl hóa.

Các kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa theo sáng chế có tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) không giống như các kháng thể kháng CD20 không có fucoza giảm.

Bằng “kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa với tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC)” có nghĩa là một kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa, như được đề cập ở đây, có ADCC tăng như được xác định bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một thử nghiệm ADCC *in vitro* được chấp nhận như sau:

1) thử nghiệm sử dụng các tế bào đích đã biết để biểu hiện kháng nguyên đích được nhận dạng bởi vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể;

2) thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi người (PBMCs), phân lập từ máu của người cho khỏe mạnh được trộn ngẫu nhiên làm các tế bào hiệu ứng;

3) thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp sau:

i) các PBMC được phân lập nhờ sử dụng các phương pháp ly tâm mật độ chuẩn và được tạo huyền phù với 5×10^6 tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy tế bào RPMI;

ii) Các tế bào đích được nuôi cấy bằng các phương pháp nuôi cấy mô chuẩn, thu được từ pha sinh trưởng theo số mũ với khả năng sống sót cao hơn 90%, rửa bằng môi trường nuôi cấy tế bào RPMI, đánh dấu với 100 micro-Curies của ^{51}Cr , rửa hai lần với môi trường nuôi cấy tế bào, và tạo huyền phù lại trong môi trường nuôi cấy tế bào ở mật độ 10^5 tế bào/ml;

iii) 100 microlit huyền phù chứa tế bào đích cuối cùng nêu trên được chuyển vào mỗi giếng của đĩa vi chuẩn độ 96 giếng;

iv) kháng thể được pha loãng theo bậc từ 4000 ng/ml đến 0.04 ng/ml trong môi trường nuôi cấy tế bào và 50 microlit gồm các dung dịch kháng thể thu được được thêm vào các tế bào đích trong đĩa vi chuẩn độ 96 giếng, thử nghiệm ba lần các nồng độ kháng thể khác nhau bao gồm giới hạn nồng độ toàn bộ nêu trên;

v) đối với các đối chứng giải phóng tối đa (MR), 3 giếng khác trong đĩa chứa các tế bào đích đánh dấu, nhận 50 microlit gồm dung dịch nước tẩy 2% (VN) không ion (Nonidet, Sigma, St. Louis), thay cho dung dịch kháng thể (điểm iv nêu trên);

vi) đối với các đối chứng giải phóng tự nhiên (SR), 3 giếng khác trong đĩa chứa các tế bào đích đánh dấu, nhận 50 microlit gồm môi trường nuôi cấy tế bào RPMI thay cho dung dịch kháng thể (điểm iv nêu trên);

vii) sau đó đĩa vi chuẩn độ 96 giếng được làm ly tâm đến $50 \times g$ trong 1 phút và ủ trong 1 giờ ở 4°C ;

viii) 50 microlit gồm huyền phù PBMC (điểm i nêu trên) được thêm vào mỗi giếng để tạo ra tỷ lệ tế bào hiệu ứng: tế bào là 25:1 và các đĩa được đặt vào lồng ấp trong môi trường khí CO_2 dưới 5% ở 37°C trong 4 giờ;

ix) dịch nổi không chứa tế bào từ mỗi giếng được thu hoạch và độ phóng xạ giải phóng qua thử nghiệm (ER) được xác định số lượng nhờ sử dụng máy đếm gama;

x) tỉ lệ phần trăm của phân giải đặc hiệu được tính toán cho từng nồng độ kháng thể theo công thức $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, trong đó ER là độ phóng xạ trung bình (xem điểm ix nêu trên) cho nồng độ kháng thể đó, MR là độ phóng xạ trung bình (xem điểm ix nêu trên) cho các đối chứng MR (xem điểm V nêu trên), và SR là độ phóng xạ trung bình (xem điểm ix nêu trên) cho các đối chứng SR (xem điểm ix nêu trên);

4) "ADCC tăng" được xác định là hoặc tăng về tỉ lệ phần trăm tối đa của phân giải đặc hiệu được thấy trong giới hạn nồng độ kháng thể thử nghiệm nêu trên, và/hoặc giảm về nồng độ kháng thể cần thiết để đạt được một nửa tỉ lệ phần trăm tối đa của phân giải đặc hiệu thấy trong giới hạn nồng độ kháng thể thử nghiệm nêu trên. Tăng về ADCC tương xứng với ADCC, được xác định bằng thử nghiệm nêu trên, do kháng thể tương tự gây ra, được tạo bởi loại các tế bào chủ tương tự, nhờ sử dụng các quy trình bào chế, tinh chế, tạo chế phẩm và lưu giữ chuẩn tương tự mà đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, nhưng không được tạo ra bởi các tế bào chủ biến đổi di truyền để biểu hiện quá mức GnTIII.

Thuật ngữ "ADCC tăng" này có thể thu được bằng cách biến đổi di truyền glyco các kháng thể đã nêu, điều đó có nghĩa là tăng các chức năng tác động do tế bào tạo ra đã nêu của các kháng thể đơn dòng bằng cách biến đổi di truyền thành phần oligosacarit của chúng như được mô tả trong tài liệu Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 và US Pat. No. 6,602,684.

Thuật ngữ "tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC)" đề cập đến sự phân giải của các thể bào đích khối u người bằng kháng thể theo sáng chế với sự có mặt của bổ thể. CDC được xác định tiếp bằng cách xử lý chế phẩm chứa các thể bào biểu hiện CD20 với kháng thể kháng CD20 theo sáng chế với có mặt của

bổ thể. CDC được thấy nếu kháng thể kích thích ở nồng độ 100 nM phân giải (chết tế bào) của 20% hoặc nhiều hơn các tế bào khối u sau 4 giờ. Tốt hơn là thử nghiệm được tiến hành với các tế bào khối u được đánh dấu ^{51}Cr hoặc xác định ^{51}Cr hoặc Eu giải phóng. Các đối chứng bao gồm quá trình ủ các tế bào khối u với bổ thể nhưng không có kháng thể.

Kháng thể “rituximab” (kháng thể tham khảo; ví dụ về kháng thể kháng CD20 typ I) là miễn ổn định chuột 1 gama người dạng khảm biến đổi di truyền chứa kháng thể đơn dòng trực tiếp chống lại kháng nguyên CD20 người. Kháng thể dạng khảm này chứa các miễn ổn định 1 gama người và được nhận dạng bằng tên "C2B8" trong US 5,736,137 (Andersen, et. al.) cấp ngày 17 tháng 4 năm 1998, chuyển nhượng cho IDEC Pharmaceuticals Corporation. Rituximab được chấp nhận để điều trị các bệnh nhân bị tái phát hoặc khức xạ mức độ nhẹ, u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B dương tính với CD20, có nang. Cơ chế *in vitro* của các nghiên cứu tác động chứng tỏ rằng rituximab có tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) (như đề cập trong M.E., et. al., Blood 83(2) (1994) 435-445). Ngoài ra, nó cũng thể hiện hoạt tính đáng kể trong các thử nghiệm để xác định tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Rituximab không phải là được afucosyl hóa.

Kháng thể	Lượng fucoza
Rituximab (không được afucosyl hóa)	> 85%
B-ly 1 được làm tương thích với người được biến đổi di truyền glyclo được afucosyl hóa loại chưa thuần (B-HH6-B-KV1) (không được afucosyl hóa)	> 85%
B-ly 1 được làm tương thích với người được biến đổi di truyền glyclo được afucosyl hóa (B-HH6-B-KV1 GE)	45 - 50%

Thuật ngữ “kháng thể B- Ly1 được làm tương thích với người” đề cập đến kháng thể B-ly1 được làm tương thích với người như được đề cập trong WO2005/044859 và WO2007/031875, kháng thể này thu được từ kháng thể đơn dòng chuột kháng CD20 B-Ly1 (vùng biến đổi của chuỗi nặng chuột (VH): SEQ

ID NO: 1; vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chuột (VL): SEQ ID NO: 2- xem tài liệu Poppema, S. và Visser, L., Biotest Bulletin 3 (1987) 131-139) bằng cách khảm hóa với miền ổn định người từ IgG1 và tiếp theo bằng cách tương thích với người (xem tài liệu WO2005/044859 và WO2007/031875). Các “kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người” được đề cập đến chi tiết trong WO2005/044859 và WO2007/031875.

Theo một phương án, “kháng thể B-ly1 được làm tương thích với người” có vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 20 (B-HH2 đến B-HH9 và B-HL8 đến B-HL17 của WO2005/044859 và WO2007/031875). Theo một phương án cụ thể, miền biến đổi được chọn từ nhóm bao gồm SEQ. ID No. 3, 4, 7, 9, 11, 13 và 15 (B-HH2, B-HH3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 và B-HL13 của WO2005/044859 và WO2007/031875). Tốt hơn là “kháng thể B-ly1 được làm tương thích với người” có vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 20 (B-KV1 của WO2005/044859 và WO2007/031875). Theo một phương án cụ thể, “kháng thể B-ly1 được làm tương thích với người” có vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 7 (B-HH6 của WO2005/044859 và WO2007/031875) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 20 (B-KV1 của WO2005/044859 và WO2007/031875). Ngoài ra, theo một phương án khác, kháng thể B-ly1 được làm tương thích với người là kháng thể IgG1. Theo sáng chế, các kháng thể B-ly1 được làm tương thích với người được afucosyl hóa được biến đổi di truyền glyco (GE) ở vùng Fc theo các phương pháp được mô tả trong WO2005/044859, WO2004/065540, WO2007/031875, Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 và WO1999/54342. B-ly1 được làm tương thích với người, được biến đổi di truyền glyco được afucosyl hóa là B-HH6-B-KV1 GE. Kháng thể B-ly1 được làm tương thích với người, được biến đổi di truyền glyco có kiểu glycosyl hóa biến đổi ở vùng Fc, tốt hơn là có mức độ các gốc fucoza giảm. Theo một phương án, lượng fucoza là 60% hoặc ít hơn tổng lượng các oligosacarit ở Asn297 (Theo một phương án lượng fucoza là giữa 40% và

60%, theo một phương án khác lượng fucoza là 50% hoặc ít hơn, và vẫn theo một phương án khác lượng fucoza là 30% hoặc ít hơn). Theo một phương án khác, các oligosacarit của vùng Fc được cắt đôi. Các kháng thể B-ly1 được làm tương thích với người được biến đổi di truyền glyclo có ADCC tăng.

Thành phần oligosacarit có thể tác động rất lớn đến các đặc tính có liên quan đến hiệu quả của glycoprotein chữa bệnh, bao gồm tính ổn định vật lý, kháng lại sự tấn công của proteaza, tương tác với hệ miễn dịch, được động lực, và hoạt tính sinh học đặc hiệu. Các đặc tính này có thể không phụ thuộc vào sự có mặt hoặc không có mặt, nhưng còn phụ thuộc vào các cấu trúc đặc hiệu của các oligosacarit. Một số quy tắc chung giữa cấu trúc oligosacarit và chức năng glycoprotein có thể được tạo ra. Ví dụ, các cấu trúc oligosacarit nhất định làm giải phóng nhanh glycoprotein khỏi dòng máu nhờ các tương tác với các protein gắn kết carbohydrat đặc hiệu, trong khi các cấu trúc khác có thể được gắn kết bởi các kháng thể và tạo ra các phản ứng miễn dịch mong muốn (Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981).

Các tế bào động vật có vú là các chủ vận được ưu tiên để tạo ra các glycoprotein chữa bệnh, do khả năng glycosylat hóa các protein của chúng ở phần lớn các dạng tương thích ứng dụng ở người (Cumming, D.A., et al., *Glycobiology* 1 (1991) 115-130; Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981). Vi khuẩn rất hiếm khi glycosylat hóa các protein, và giống như các loại khác của các vật chủ thông thường, như nấm men, nấm sợi, các tế bào côn trùng và thực vật, tạo ra các mẫu glycosylat hóa liên kết đến sự giải phóng nhanh khỏi dòng máu, các tương tác miễn dịch không mong muốn, và đối với một số trường hợp đặc biệt, làm giảm hoạt tính sinh học. Trong các tế bào động vật có vú, các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) thường được sử dụng nhiều nhất trong suốt hai thập kỷ cuối cùng. Hơn nữa, ngoài việc tạo ra các mẫu glycosylat hóa thích hợp, các tế bào đó cho phép tạo ra các dòng tế bào sinh sản vô tính cao, ổn định về mặt di truyền. Chúng còn có thể được nuôi cấy

với mật độ cao trong các bình phản ứng sinh học đơn giản nhờ sử dụng môi trường không chứa huyết thanh, và cho phép triển khai các quy trình sinh học an toàn và có thể sinh sản. Các tế bào động vật thường được sử dụng khác bao gồm các thể bào thận chuột đồng mới sinh (BHK), các tế bào u tủy NSO- và SP2/0. Mới đây hơn, quá trình tạo ra từ các động vật chuyển gen cũng được thử nghiệm (Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981).

Tất cả các kháng thể có chứa các cấu trúc carbohydrat tại các vị trí bảo toàn ở các vùng ổn định chuỗi nặng, với mỗi isotyp có dãy riêng biệt của các cấu trúc carbohydrat liên kết N, tác động thay đổi đến tập hợp protein, hoạt tính tiết xuất hoặc chức (Wright, A., và Monison, S.L., *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 26-32). Cấu trúc của carbohydrat liên kết N gắn kết thay đổi đáng kể, tùy thuộc vào mức độ xử lý, và có thể bao gồm mannoza cao, nhiều nhánh cũng như các oligosacarit phức hệ hai râu (Wright, A., and Morrison, S.L., *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 26-32). Thông thường, có sự xử lý không đồng nhất các cấu trúc oligosacarit nhân gắn kết tại điểm glycosylat hóa đặc biệt đến mức ngay cả các kháng thể đơn dòng cũng tồn tại như nhiều glycoform. Tương tự, nó chứng tỏ rằng các khác biệt cơ bản trong quá trình glycosylat hóa kháng thể xuất hiện giữa các dòng tế bào, và thậm chí các khác biệt nhỏ cũng được thấy đối với dòng tế bào đã cho được nuôi cấy trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau (Lifely, M.R., et al., *Glycobiology* 5(8) (1995) 813-822).

Một cách để đạt được các mức gia tăng lớn về hiệu lực trong khi vẫn duy trì được quy trình sản sinh đơn giản và tránh được một cách hữu hiệu các tác dụng phụ không mong muốn, là tăng cường các chức năng tác động do tế bào tạo ra, tự nhiên của các kháng thể đơn dòng bằng cách biến đổi di truyền thành phần oligosacarit của chúng như được mô tả trong tài liệu Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 và US Pat. No. 6,602,684. Các kháng thể loại IgG1, các kháng thể thường được sử dụng nhất trong liệu pháp miễn dịch ung là các glycoprotein mà có điểm glycosylat hóa liên kết N bảo toàn tại

Asn297 ở mỗi miền CH2. Hai oligosacarit phức hệ hai râu gắn kết với Asn297 được chôn giữa các miền CH2, tạo ra các tiếp xúc mở rộng với khung chính polypeptit, và sự có mặt của chúng là cần thiết đối với kháng thể để tạo ra các chức năng tác động như tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (Lifely, M.R., et al., *Glycobiology* 5(8) (1995) 813-822; Jefferis, R., et al., *Immunol. Rev.* 163 (1998) 59-76; Wright, A., và Morrison, S.L., *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 26-32).

Đã được biết đến trước đây rằng việc biểu hiện quá mức ở các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) của $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferaza I11 ("GnTIII17y), glycosyltransferaza xúc tác quá trình hình thành các oligosacarit cắt đôi, làm tăng đáng kể hoạt tính ADCC *in vitro* của kháng thể đơn dòng dạng khảm chống u nguyên bào thần kinh (chCE7) được tạo ra bởi các tế bào CHO biến đổi di truyền (xem Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180; và WO1999/54342, toàn bộ nội dung của các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Kháng thể chCE7 thuộc lớp lớn của các kháng thể đơn dòng không kết hợp mà có ái lực và tính đặc hiệu với khối u cao, nhưng có hiệu lực quá nhỏ để có tác dụng lâm sàng khi được tạo ra trong các dòng tế bào công nghiệp chuẩn thiếu enzym GnTIII (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180). Nghiên cứu này trước tiên chỉ ra rằng các mức gia tăng lớn về hoạt tính ADCC có thể đạt được bằng cách biến đổi di truyền các tế bào tạo ra kháng thể để biểu hiện GnTIII, nó cũng dẫn đến sự gia tăng tỷ lệ vùng ổn định (Fc) liên quan, các oligosacarit cắt đôi, bao gồm các oligosacarit không fucosyl hóa, cắt đôi, cao hơn các mức được thấy ở các kháng thể xuất hiện tự nhiên.

Thuật ngữ "bệnh ung thư" được sử dụng ở đây bao gồm u bạch huyết, bệnh bạch cầu limpho bào, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCL), bệnh ung thư phổi tế bào phế nang phế quản, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư da, bệnh ung thư đầu hoặc cổ, u hắc sắc tố

da hoặc trong mắt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vùng hậu môn, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung, caxinom các ống dẫn trứng, caxinom nội mạc tử cung, caxinom cổ tử cung, caxinom âm đạo, caxinom âm hộ, bệnh Hodgkin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột nhỏ, bệnh ung thư hệ nội tiết, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư tuyến giáp cận, bệnh ung thư tuyến thượng thận, xacôm mô mềm, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư dương vật, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thận hoặc niệu quản, caxinom tế bào trong thận, caxinom bề thận, u trung biểu mô, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư mật, mô ung thư hệ thần kinh trung ương (CNS), các khối u cột sống, u thần kinh đệm thân não, u nguyên bào xốp đa dạng, u tế bào hình sao, u bao sợi thần kinh, u tế bào màng, u nguyên thủy bào, u màng não, caxinom tế bào có vảy, u tuyến yên, bao gồm các biến thái dai dẳng của bất kỳ bệnh ung thư nào trong số các bệnh ung thư nêu trên. Theo một phương án, thuật ngữ bệnh ung thư đề cập đến bệnh ung thư biểu hiện CD20.

Thuật ngữ kháng nguyên "biểu hiện CD20" biểu thị mức biểu hiện đáng kể của kháng nguyên CD20 ở tế bào, tốt hơn là trên bề mặt tế bào của tế bào T hoặc B, tốt hơn là tế bào B, từ khối u hoặc bệnh ung thư tương ứng, tốt hơn là không phải khối u rắn. Các bệnh nhân có "bệnh ung thư biểu hiện CD20" có thể được xác định bằng các thử nghiệm chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, biểu hiện kháng thể CD20 được xác định nhờ sự phát hiện hóa học mô miễn dịch (IHC), FACS hoặc bằng phát hiện dựa vào PCR của ARN thông tin tương ứng.

Thuật ngữ "Bệnh ung thư biểu hiện CD20" theo sáng chế đề cập đến tất cả các bệnh ung thư trong đó các tế bào ung thư thể hiện biểu hiện của kháng nguyên CD20. Tốt hơn là bệnh ung thư biểu hiện CD20 theo sáng chế là đề cập đến u bạch huyết (tốt hơn là u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B (NHL)) và bệnh bạch cầu limpho. Các u bạch huyết và bệnh bạch cầu limpho này bao gồm ví dụ

a) u bạch huyết có nang, b) u bạch huyết tế bào không phân cắt nhỏ/u bạch huyết Burkitt (bao gồm u bạch huyết Burkitt đặc hữu, u bạch huyết Burkitt phân tán và u bạch huyết Non-Burkitt) c) u bạch huyết vùng rìa (bao gồm u bạch huyết tế bào B ngoài nút vùng rìa (u bạch huyết liên quan đến niêm mạc, MALT), u bạch huyết tế bào B nút vùng rìa và u bạch huyết vùng rìa lách), d) u bạch huyết tế bào lớp bọc(MCL), e) u bạch huyết tế bào lớn (bao gồm u bạch huyết tế bào lớn lan tỏa tế bào B (DLCL), u bạch huyết tế bào hỗn hợp lan tỏa, u bạch huyết nguyên bào miễn dịch, u bạch huyết tế bào B trung thất sơ cấp, u bạch huyết mạch chính - u bạch huyết tế bào B phổi) f) bệnh bạch cầu tế bào tóc, g) u bạch huyết limpho, macroglobulin huyết Waldenstrom, h) bệnh bạch cầu limpho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu limpho mãn tính (CLL)/u bạch huyết limpho nhỏ (SLL), bệnh bạch cầu tiền limpho tế bào B, i) các mô mới bạch cầu, u tủy bạch cầu, u tủy nhiều chỗ, u xương bào j) bệnh Hodgkin.

Theo một phương án, Bệnh ung thư biểu hiện CD20 là u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B (NHL). Theo một phương án khác, bệnh ung thư biểu hiện CD20 là u bạch huyết tế bào lớp bọc (MCL), bệnh bạch cầu limpho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu limpho mãn tính (CLL), u bạch huyết tế bào lớn lan tỏa tế bào B (DLCL), u bạch huyết Burkitt, bệnh bạch cầu tế bào tóc, u bạch huyết có nang, u tủy nhiều chỗ, u bạch huyết vùng rìa, rối loạn tăng sinh limpho bào sau cấy ghép (PTLD), u bạch huyết liên quan đến HIV, macroglobulin huyết Waldenstrom, hoặc u bạch huyết CNS.

Thuật ngữ "phương pháp điều trị" hoặc tương tự, khi áp dụng đến, ví dụ, bệnh ung thư đề cập đến quy trình hoặc tiến trình tác động được đưa vào để làm giảm hoặc loại bỏ một số tế bào ung thư ở người bệnh, hoặc để làm giảm bớt các triệu chứng của bệnh ung thư. "phương pháp điều trị" bệnh ung thư hoặc rối loạn tăng sinh không nhất thiết là các tế bào ung thư hoặc rối loạn khác, trên thực tế, bị loại bỏ, là số lượng các tế bào hoặc rối loạn, trên thực tế, được giảm, hoặc là các triệu chứng của bệnh ung thư hoặc rối loạn, trên thực tế, được giảm bớt.

Trong nhiều trường hợp, phương pháp điều trị bệnh ung thư sẽ được tiến hành ngay cả với khả năng thành công có thể thấp, nhưng nó đưa ra lịch sử bệnh lý và ước lượng triển vọng sống sót của bệnh nhân, tuy nhiên được cho rằng để kích thích toàn bộ tiến trình tác động có lợi.

Các thuật ngữ “đồng sử dụng” hoặc “đồng cung cấp” đề cập đến việc sử dụng như đã nêu ở kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa, và bendamustin như là chế phẩm đơn hoặc như là hai chế phẩm riêng biệt. Việc đồng sử dụng có thể là sử dụng cùng một lúc hoặc liên tiếp, trong đó tốt hơn là có khoảng thời gian khi cả hai (hoặc toàn bộ) hoạt chất sử dụng đồng thời các hoạt tính sinh học của chúng. Kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa và bendamustin này được cùng sử dụng đồng thời hoặc liên tiếp (ví dụ sử dụng qua tĩnh mạch (i.v.) nhờ truyền lực liên tục (đầu tiên là kháng thể kháng CD20 và cuối cùng là bendamustin). Khi cả hai tác nhân điều trị được sử dụng nối tiếp thì liệu được cung cấp hoặc vào cùng ngày ở hai chu kỳ sử dụng riêng biệt, hoặc một trong hai tác nhân đó được dùng vào ngày 1 và tác nhân thứ hai được cùng sử dụng vào ngày 2 đến ngày 7, tốt hơn là vào ngày 2 đến ngày 4. Vì vậy, thuật ngữ “liên tiếp” có nghĩa là trong 7 ngày sau liệu kháng thể thứ nhất (bendamustin hoặc kháng thể), tốt hơn là trong 4 ngày sau liệu kháng thể thứ nhất; và thuật ngữ “đồng thời” có nghĩa là cùng một lúc. Các thuật ngữ “đồng sử dụng” đối với các liệu duy trì đã nêu trên là kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa và bendamustin có nghĩa là các liệu duy trì có thể hoặc cùng sử dụng đồng thời, nếu chu kỳ điều trị là thích hợp cho cả hai dược chất, ví dụ hàng tuần. Hoặc bendamustin ví dụ được sử dụng hàng ngày thứ nhất đến ngày thứ ba và kháng thể được afucosyl hóa đã nêu được sử dụng hàng tuần. Hoặc các liệu duy trì được sử dụng liên tiếp, hoặc trong một hoặc trong vài ngày.

Hiển nhiên là các kháng thể được cung cấp cho bệnh nhân với một “lượng điều trị hữu hiệu” (hoặc đơn giản là “lượng hữu hiệu”) đó là lượng hợp chất tương ứng hoặc hỗn hợp tương ứng sẽ tạo ra đáp ứng sinh học hoặc y học của

mô, hệ thống, động vật hoặc người mà nhà nghiên cứu, bác sỹ thú y, bác sỹ y khoa hoặc bác sỹ lâm sàng khác chỉ định.

Liều lượng đồng cung cấp của kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa và bendamustin và thời gian cung cấp sẽ tùy thuộc vào loại (loài, giống, tuổi, trọng lượng, v.v..) và tùy thuộc vào điều kiện của bệnh nhân đang được điều trị và mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc điều kiện đang được điều trị. Kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa và bendamustin này được đồng cung cấp phù hợp cho bệnh nhân tại một thời điểm hoặc trong một loạt các phương pháp điều trị.

Nếu cung cấp qua tĩnh mạch thời gian truyền ban đầu của kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa hoặc bendamustin có thể kéo dài hơn so với các lần truyền tiếp theo, ví dụ khoảng 90 phút để truyền ban đầu, và khoảng 30 phút cho các lần truyền tiếp theo (nếu lần truyền ban đầu được dung nạp tốt nhất).

Tùy thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1µg/kg đến 50mg/kg (ví dụ 0,1 - 20mg/kg) kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa đã nêu và 1µg/kg đến 50mg/kg (ví dụ 0,1 - 20mg/kg) bendamustin là liều dự định đưa ra ban đầu để cùng cung cấp cả hai dược chất cho bệnh nhân. Theo một phương án, tốt hơn là liều lượng của kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa này (tốt hơn là kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người được afucosyl hóa) sẽ nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến khoảng 30mg/kg. Vì vậy, một hoặc nhiều liều lượng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg, 10mg/kg hoặc 30mg/kg (hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng) có thể được cùng cung cấp cho bệnh nhân. Theo một phương án, liều lượng bendamustin này sẽ nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến khoảng 30 mg/kg, ví dụ 0,1mg/kg đến 10,0mg/kg. Tùy thuộc vào loại (loài, giống, tuổi, trọng lượng, v.v..) và tình trạng của bệnh nhân và loại kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa, liều lượng và phác đồ điều trị của kháng thể được afucosyl hóa đã nêu và bendamustin có thể khác nhau, ví dụ, kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa đã nêu có thể được sử dụng, ví dụ từ một đến ba

tuần và bendamustin đã nêu có thể được sử dụng hàng ngày hoặc 2 đến 10 ngày. Liệu điều trị ban đầu cao hơn, tiếp theo là một hoặc nhiều liều thấp hơn cũng có thể được cung cấp.

Theo một phương án, liều lượng kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa đã nêu (ví dụ, kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người được afucosyl hóa) sẽ là từ 800 đến 1200mg vào ngày 1, 8, 15 với chu kỳ liều lượng 6 tuần và sau đó từ 800 đến 1200mg vào ngày 1 đến 5 với chu kỳ liều lượng 4 tuần và tốt hơn là liều bendamustin sẽ là, ví dụ, 80mg/m² đến 110mg/m² (theo một phương án 110mg/m², theo một phương án khác 90mg/m²) vào ngày 1 và 2 (truyền vào tĩnh mạch trên 30 phút vào các ngày 1 và 2) với chu kỳ liều lượng 4 tuần. Ngoài ra, lượng kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa đã nêu có thể từ 800 đến 1200mg (ví dụ, 1000mg) vào ngày 1 đến 8 với chu kỳ liều lượng 3 tuần.

Theo một phương án, dược phẩm được sử dụng để phòng ngừa hoặc giảm sự di căn hoặc sự lây lan thêm ở bệnh nhân bị bệnh ung thư, tốt hơn là bệnh ung thư biểu hiện CD20. Dược phẩm được sử dụng để tăng khoảng thời gian sống của bệnh nhân, kéo dài thời gian sống không tiến triển bệnh của bệnh nhân, tăng thời gian đáp ứng, tạo ra sự cải thiện và cải thiện đáng kể về mặt lâm sàng của bệnh nhân được điều trị khi được xác định bằng khoảng thời gian, thời gian sống không tiến triển bệnh, tốc độ đáp ứng hoặc thời gian đáp ứng. Theo một phương án ưu tiên, dược phẩm được sử dụng để làm tăng tốc độ đáp ứng ở nhóm các bệnh nhân.

Trong phạm vi của sáng chế này, các tác nhân gây độc tế bào, hóa liệu pháp hoặc kháng bệnh ung thư, hoặc các hợp chất khác bổ sung tăng cường hiệu ứng của các tác nhân này (ví dụ. cytokin) có thể được sử dụng trong kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa và bendamustin kết hợp trong điều trị bệnh ung thư. Các phân tử này có mặt một cách thích hợp dưới dạng kết hợp với lượng hữu hiệu cho mục đích đã dự tính. Theo một phương án, kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa và bendamustin điều trị kết hợp được sử dụng mà không cần

các tác nhân gây độc tế bào, hóa liệu pháp hoặc kháng bệnh ung thư, hoặc các hợp chất bổ sung tăng cường hiệu quả của các tác nhân này.

Các tác nhân đã nêu bao gồm, ví dụ: các tác nhân alkylat hóa hoặc các tác nhân với sự tác dụng của alkylat hóa, như là cyclophosphamid (CTX; ví dụ cytoxan[®]), chlorambucil (CHL; ví dụ leukeran[®]), cisplatin (CisP; ví dụ platinol[®]) busulfan (ví dụ myleran[®]), melphalan, carmustin (BCNU), streptozotocin, triethylenemelamin (TEM), mitomycin C, và các loại tương tự; các chất chống chuyển hóa, như là methotrexat (MTX), etoposid (VP16; ví dụ vepesid[®]), 6-mercaptopurin (6MP), 6-thioguanin (6TG), cytarabin (Ara-C), 5-fluorouracil (5-FU), capecitabin (ví dụ Xeloda[®]), dacarbazin (DTIC), và các loại tương tự; các chất kháng sinh, như là actinomycin D, doxorubicin (DXR; ví dụ adriamycin[®]), daunorubicin (daunomycin), bleomycin, mithramycin và các loại tương tự; các alkaloid, như là các vinca alkaloid như là vincristin (VCR), vinblastin, và các loại tương tự; các tác nhân kháng u, như là paclitaxel (ví dụ taxol[®]) và các dẫn xuất của paclitaxel, các tác nhân cytostatic, các glucocorticoid như là dexamethason (DEX; ví dụ decadron[®]) và các corticosteroid như là prednison, các chất ức chế enzym nucleosit như là hydroxyurea, amino axit làm suy giảm các enzym như là asparaginaza, leucovorin và các dẫn xuất của axit folic khác, và tương tự, các tác nhân kháng u đa dạng. Các tác nhân sau đây có thể được sử dụng như là các tác nhân bổ sung: arnifostin (ví dụ ethylol[®]), dactinomycin, mechlorethamine (hạt cải nitơ), streptozocin, cyclophosphamid, lomustin (CCNU), doxorubicin lipo (ví dụ doxil[®]), gemcitabin (ví dụ gemzar[®]), daunorubicin lipo (ví dụ daunoxome[®]), procarbazine, mitomycin, docetaxel (ví dụ taxotere[®]), aldesleukin, carboplatin, oxaliplatin, cladribin, camptothecin, CPT 11 (irinotecan), 10-hydroxy 7-ethyl-camptothecin (SN38), floxuridin, fludarabin, ifosfamid, idarubicin, mesna, interferon beta, interferon alpha, mitoxantron, topotecan, leuprolit, megestrol, melphalan, mercaptopurin, plicamycin, mitotan, pegaspargase, pentostatin, pipobroman, plicamycin, tamoxifen, teniposid, testolacton, thioguanin, thiotepa, hạt cải uracil, vinorelbin,

chlorambucil. Tốt hơn là điều trị kết hợp kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa và fludarabin và/hoặc mitoxantron được sử dụng mà không cần các tác nhân bổ sung.

Việc sử dụng các tác nhân gây độc tế bào và kháng bệnh ung thư được mô tả trên đây cũng như các dược chất kháng bệnh ung thư đặc hiệu đích kháng tăng sinh cũng như các chất ức chế kinaza protein trong chế độ hóa liệu pháp thường được mô tả trong các lĩnh vực điều trị bệnh ung thư, và việc sử dụng chúng ở đây thuộc cùng các mong muốn để kiểm tra mức độ dung nạp và hiệu quả và để kiểm soát các tuyến cung cấp và liều dùng, với một số điều chỉnh. Ví dụ, liều lượng các tác nhân gây độc tế bào thực tế có thể thay đổi tùy thuộc vào đáp ứng tế bào nuôi cấy của bệnh nhân được xác định bằng cách sử dụng phương pháp nuôi cấy mô. Nói chung, liều lượng sẽ được giảm so với lượng sử dụng không có các tác nhân bổ sung khác.

Các liều lượng của tác nhân gây độc tế bào hữu hiệu thông thường có thể nằm trong các giới hạn được đề nghị bởi nhà sản xuất, và trong đó được chỉ ra bằng các đáp ứng *in vitro* hoặc các đáp ứng trong các kiểu động vật, có thể được giảm lên đến khoảng một bậc độ lớn nồng độ hoặc lượng. Vì vậy, liều lượng thực tế sẽ phụ thuộc vào quyết định của bác sỹ, tình trạng của bệnh nhân, và hiệu quả của phương pháp điều trị dựa vào đáp ứng *in vitro* của các tế bào ác tính nuôi cấy sơ cấp hoặc mẫu mô nuôi cấy mô, hoặc các đáp ứng được thấy ở các kiểu động vật thích hợp.

Trong phạm vi của sáng chế này, một lượng bức xạ ion hóa hữu hiệu có thể được tiến hành và/hoặc thuốc phóng xạ có thể được dùng cùng với kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa và bendamustin kết hợp trị liệu của bệnh ung thư biểu hiện CD20. Khi nguồn bức xạ ở bên ngoài bệnh nhân, thì liệu pháp được biết là liệu pháp bức xạ tia bên ngoài (EBRT). Khi nguồn bức xạ ở bên trong bệnh nhân, thì việc điều trị được gọi là liệu pháp ngắn brachytherapy (BT). Các nguyên tử phóng xạ sử dụng trong phạm vi của sáng chế có thể được chọn

từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, radi, xesi-137, iridi-192, amerixi-241, vàng-198, coban-57, đồng-67, tecneti-99, iot-123, iot-131, và indi-111. Cũng có thể đánh dấu kháng thể bằng các đồng vị phóng xạ này. Tốt hơn là kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa và bendamustin kết hợp điều trị được sử dụng mà không cần sự bức xạ ion hóa này.

Liệu pháp bức xạ là phương pháp điều trị chuẩn để không chế các khối u không thể cắt bỏ hoặc các khối u không mổ và/hoặc các di căn khối u. Các kết quả cải thiện được thấy khi liệu pháp bức xạ được kết hợp với hóa liệu pháp. Liệu pháp bức xạ dựa vào nguyên tắc bức xạ liều cao bắn ra đến các khu vực đích sẽ làm chết các tế bào sinh sản ở cả các mô bình thường và khối u. Chế độ liều bức xạ thường được xác định về mặt liều lượng hấp thụ bức xạ (Gy), thời gian và sự phân đoạn, và phải được xác định thận trọng bởi bác sỹ chuyên khoa ung thư. Liều bức xạ mà bệnh nhân nhận được sẽ tùy thuộc vào các cân nhắc khác nhau, nhưng hai vấn đề quan trọng nhất là vị trí khối u liên quan đến các cấu trúc hoặc các cơ quan quan trọng khác của cơ thể, và phạm vi mà khối u lan đến. Tiến trình điều trị thông thường cho bệnh nhân điều trị liệu pháp bức xạ sẽ là chu kỳ điều trị trong giai đoạn 1 đến 6 tuần, với liều lượng tổng là giữa 10 và 80Gy được cung cấp cho bệnh nhân với phần hàng ngày đơn là khoảng 1.8 đến 2.0Gy, 5 ngày một tuần. Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, có tính tổng hợp khi các khối u ở các bệnh nhân được điều trị với điều trị kết hợp theo sáng chế và bức xạ. Nói cách khác, việc ức chế sự phát triển của khối u bằng các tác nhân bao gồm sự kết hợp của sáng chế được nâng cao khi kết hợp với bức xạ, tùy thuộc với hóa liệu pháp hoặc các tác nhân kháng ung thư bổ sung. Các thông số về các liệu pháp bức xạ bổ sung, ví dụ có trong WO1999/60023.

Các kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa được cung cấp cho bệnh nhân theo các phương pháp đã biết, ví dụ bằng cách sử dụng trong tĩnh mạch như tiêm một lượng thuốc lớn hoặc bằng cách truyền liên tục trong một khoảng thời gian, bằng cách theo các tuyến tiêm bắp, phúc mạc, não tủy sống, dưới da,

nội khớp, hoạt dịch, hoặc trong mô bao bọc. Theo một phương án, các kháng thể được cung cấp bằng tĩnh mạch hoặc dưới da.

Bendamustin có thể được cung cấp cho bệnh nhân theo các phương pháp đã biết, ví dụ bằng cách cung cấp qua tĩnh mạch như tiêm tĩnh mạch một lượng thuốc lớn hoặc bằng cách truyền liên tục trong một khoảng thời gian, bằng các tuyến tiêm bắp, phúc mạc, não tủy sống, dưới da, nội khớp, hoạt dịch, hoặc mô bao bọc. Được ưu tiên là sử dụng các tác nhân hóa liệu pháp trong tĩnh mạch hoặc dưới da.

Theo sáng chế, "chất mang được dụng" bao gồm bất kỳ và tất cả các chất tương thích với việc cung cấp được phẩm bao gồm các dung môi, môi trường phân tán, chất bao, các tác nhân kháng vi khuẩn và kháng nấm, các tác nhân làm chậm đẳng trương và hấp thu, và các chất khác và các hợp chất tương thích với việc cung cấp được phẩm. Ngoại trừ trong phạm vi khi môi trường thông thường hoặc tác nhân bất kỳ tương thích với hoạt chất, thì việc sử dụng chúng trong các chế phẩm theo sáng chế cũng được dự tính. Các hoạt chất bổ sung này cũng có thể được đưa vào các chế phẩm.

Các chế phẩm được

Các chế phẩm được có thể thu được bằng cách xử lý kháng thể kháng CD20 và/hoặc bendamustin theo sáng chế với các chất mang vô cơ hoặc hữu cơ, được dụng. Lactosa, tinh bột ngô hoặc các dẫn xuất của chúng, bột talc, các axit stearic hoặc các muối của chúng và các loại tương tự có thể được sử dụng, ví dụ, các chất mang cho các viên nén, các viên nén bọc, viên hình kẹo trứng chim và các viên nang gelatin cứng. Các chất mang thích hợp cho các viên nang gelatin mềm, ví dụ, dầu thực vật, sáp, chất béo, các polyol bán rắn và lỏng và các loại tương tự. Tùy thuộc vào tính chất của hoạt chất mà có thể không cần các chất mang, tuy nhiên, thường cần đối với trường hợp các viên nang gelatin mềm. Các chất mang thích hợp để bào chế các dung dịch và xiro là, ví dụ, nước, các polyol, glyxerol, dầu thực vật và các loại tương tự. Các chất mang thích hợp cho

viên thuốc đạn là, ví dụ, dầu tự nhiên hoặc hóa rắn, sáp, chất béo, Các polyol bán rắn và lỏng và các loại tương tự.

Ngoài ra, các chế phẩm dược còn chứa các chất bảo quản, các chất hòa tan, các chất làm ổn định, các tác nhân thẩm ướt, các chất nhũ hóa, các chất làm ngọt, các chất tạo màu, các chất tạo hương vị, các muối để làm thay đổi áp suất thẩm thấu, các chất đệm, các chất che mùi vị hoặc các chất chống oxy hóa. Chúng có thể còn chứa các chất có tác dụng điều trị khác.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm dược bao gồm cả hai kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa với lượng fucoza là 60% hoặc ít hơn (tốt hơn là kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người được afucosyl hóa) và bendamustin được sử dụng để điều trị bệnh ung thư, cụ thể là bệnh ung thư biểu hiện CD20.

Chế phẩm dược có thể còn bao gồm một hoặc nhiều chất mang dược dụng.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm dược, ví dụ, sử dụng để điều trị bệnh ung thư, bao gồm (i) một lượng hữu hiệu thứ nhất của kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa với lượng fucoza là 60% hoặc ít hơn (theo một phương án, là kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người được afucosyl hóa), và (ii) một lượng hữu hiệu thứ hai của bendamustin. Chế phẩm dược này tùy ý còn bao gồm các chất mang dược dụng và/hoặc các tá dược.

Các chế phẩm dược của kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa sử dụng riêng rẽ theo sáng chế được bào chế để cất giữ bằng cách trộn kháng thể có độ tinh khiết mong muốn với các chất mang, các tá dược hoặc các chất làm ổn định dược dụng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), dưới dạng các chế phẩm đông khô nhanh hoặc các dung dịch nước. Các chất mang, các tá dược, hoặc các chất làm ổn định chấp nhận được không độc cho người nhận với các liều lượng và nồng độ sử dụng, và bao gồm các chất đệm như là phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; các chất bảo quản (như

octadexyldimethylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzathoni clorua, benzethoni clorua; phenol, butyl hoặc rượu benzyl; alkyl paraben như methyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; cyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc) ; các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidone; các axit amin như glyxin, glutami, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; các monosacarit, các disacarit, và các carbohydrat bao gồm glucoza, mannoza, hoặc các dextrin; các tác nhân tạo chelat như là EDTA; các đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion ngược tạo dạng muối như natri; các phức chất kim loại (ví dụ các phức chất. Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như TWEENTM, PLURONICSTM hoặc polyetylen glycol (PEG).

Các chế phẩm dược của bendamustin có thể là tương tự như được mô tả ở trên như kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa và bendamustin được chế thành hai chế phẩm dược riêng biệt..

Các hoạt chất có thể cũng được giữ dưới dạng các vi nang bào chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng quá trình polyme hóa giữa các loại, ví dụ, các vi nang hydroxymethylxenluloza hoặc gelatin và các vi nang poly-(methylmetaxylat) tương ứng, trong các hệ phân phối dược chất dạng keo (ví dụ, liposom, các vi cầu albumin, các vi nhũ tương, các hạt nano và các vi nang nano) hoặc trong nhũ tương lớn. Các kỹ thuật này được mô tả trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Các chế phẩm giải phóng duy trì có thể được bào chế. Các ví dụ thích hợp về các chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm các chất nền bán thấm thấu của các polyme kỵ nước dạng rắn chứa kháng thể, các chất rắn nền đó có dạng các vật phẩm có hình dạng ví dụ các màng, hoặc các vi nang. Các ví dụ về các chất nền giải phóng duy trì bao gồm các polyeste, các hydrogel (ví dụ, poly(2-

hydroxyethyl-metacrylat), hoặc poly(rượu vinyl), các polylactit (US 3,773,919), các copolyme của axit L-glutamic và gama-ethyl-L-glutamat, các etylene-vinyl axetat không thể thoái biến, các copolyme của axit lactic axit-glycolic có thể thoái biến như LUPRON DEPOTTM (các vi cầu có thể tiêm được bao gồm các copolyme của axit lactic- axit glycolic và leuprolit axetat), và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric.

Các chế phẩm để sử dụng *in vivo* phải tiệt trùng. Điều này được thực hiện dễ dàng bằng cách lọc qua các màng lọc tiệt trùng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để điều trị bệnh ung thư, bao gồm cung cấp cho bệnh nhân cần điều trị này (i) một lượng hữu hiệu thứ nhất của kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa với một lượng fucoza là 60% hoặc ít hơn, (theo một phương án, là kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người được afucosyl hóa); và (ii) một lượng hữu hiệu thứ hai của bendamustin.

Theo một phương án, lượng fucoza nằm trong khoảng từ 40% đến 60%.

Tốt hơn là bệnh ung thư đã nêu là bệnh ung thư biểu hiện CD20.

Tốt hơn là bệnh ung thư biểu hiện CD20 đã nêu là u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B (NHL).

Tốt hơn là kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa đã nêu là kháng thể kháng CD20 typ II.

Tốt hơn là kháng thể đã nêu là kháng thể được làm tương thích với người B-ly1.

Tốt hơn là kháng thể được làm tương thích với người B-ly1 được sử dụng với liều lượng từ 800 đến 1200mg vào ngày 1, 8, 15 với chu kỳ liều lượng 6 tuần và sau đó với liều lượng từ 800 đến 1200mg vào ngày 1 đến 5 với chu kỳ liều lượng 4 tuần, và bendamustin được sử dụng với liều lượng từ 80mg/m² đến 110mg/m² vào ngày 1 và 2 đến 6 với chu kỳ liều lượng 4 tuần.

Theo sáng chế, thuật ngữ "bệnh nhân" tốt hơn là đề cập đến người cần điều trị bằng kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa (ví dụ bệnh nhân bị bệnh ung thư biểu hiện CD20) vì mục đích bất kỳ, và tốt hơn nữa là người cần sự điều trị này để điều trị bệnh ung thư, hoặc tình trạng hoặc tổn thương tiền ung thư. Tuy nhiên, thuật ngữ "bệnh nhân" còn có thể đề cập đến động vật không phải là người, tốt hơn là động vật có vú như chó, mèo, ngựa, bò, lợn, cừu và động vật linh trưởng, bao gồm các loại khác.

Sáng chế còn mô tả kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa, để điều trị bệnh ung thư kết hợp với bendamustin.

Sáng chế còn mô tả kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa với lượng fucoza là 60% hoặc ít hơn, và bendamustin để điều trị bệnh ung thư.

Tốt hơn là kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa đã nêu là kháng thể được làm tương thích với người B-ly1.

Tốt hơn là bệnh ung thư là bệnh ung thư biểu hiện CD20, tốt hơn nữa là u bạch huyết non-Hodgkin tế bào B (NHL).

Tốt hơn là kháng thể được làm tương thích với người B-ly1 đã được sử dụng với liều lượng từ 800 đến 1200mg vào ngày 1, 8, 15 với chu kỳ liều lượng 6 tuần và sau đó được sử dụng với liều lượng từ 800 đến 1200mg vào ngày 1 đến 5 với chu kỳ liều lượng 4 tuần, và bendamustin được sử dụng với liều lượng 80mg/m² đến 110mg/m² vào ngày 1 và 2 đến 6 với chu kỳ liều lượng 4 tuần.

Các ví dụ, danh sách trình tự, và các hình vẽ dưới đây được đưa vào nhằm giúp hiểu rõ hơn về sáng chế, phạm vi thực của sáng chế được nêu trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Cần hiểu rằng các cải biến có thể được thực hiện theo các phương pháp đã nêu mà không đi trệch khỏi ý tưởng của sáng chế.

Danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1: trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD20 B-Ly1.

SEQ ID NO: 2: trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD20 B-Ly1.

SEQ ID NO: 3-19: trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của các kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HH2 đến B-HH9, B-HL8, và B-HL10 đến B-HL17).

SEQ ID NO: 20: trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người B-KV1.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương pháp thử nghiệm

Hoạt tính chống u của điều trị kết hợp kháng thể kháng CD20 typ II được afucosyl hóa (B-HH6-B-KV1 GE) với bendamustin

Các tác nhân thử nghiệm

Kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa B-HH6-B-KV1 GE (B-Ly1 được làm tương thích với người được afucosyl hóa, B-HH6-B-KV1 biến đổi di truyền glyco, xem tài liệu WO 2005/044859 và WO 2007/031875) được GlycArt, Schlieren, Switzerland cung cấp làm dung dịch gốc (9.4 mg/ml). Chất đệm kháng thể bao gồm histidin, trehaloza và polysorbat 20. Dung dịch kháng thể được pha loãng một cách thích hợp trong PBS từ nguyên liệu để tiêm truyền trước.

Lâm sàng cấp Rituximab (Mabthera) thu được từ Hoffmann La Roche, Basel.

Bendamustin (Ribomustin®) được mua từ Mundipharma GmbH, Limburg an der Lahn, Germany. Các dung dịch được pha loãng theo yêu cầu được điều chỉnh theo dung dịch gốc sản xuất là 25mg/ml.

Các dòng tế bào và các điều kiện nuôi cấy

Dòng tế bào u bạch huyết tế bào lớp bọc Z138 trên người được nuôi cấy thường xuyên trong DMEM bổ sung với 10% huyết thanh thai bò (PAA Laboratories, Austria) và 2mM L-glutamin ở 37°C trong không khí bão hòa nước với 8% CO₂. Công đoạn 4 được sử dụng để cấy ghép. Các tế bào được cùng tiêm với Matrigel.

Động vật thử nghiệm

Chuột cái màu be SCID; 3 - 4 tuần tuổi khi mới đến (được mua từ Charles River, Sulzfeld, Germany) được duy trì ở tình trạng không có mầm bệnh đặc trưng với các chu kỳ mỗi ngày 12 giờ sáng /12 giờ tối theo hướng dẫn điều trị (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp thử nghiệm được xem xét và chuẩn y bởi chính quyền địa phương. Sau khi các động vật mới đến được giữ lại bộ phận kiểm dịch của cơ sở động vật trong một tuần để làm quen với môi trường mới và để quan sát. Thường xuyên tiến hành theo dõi sức khỏe liên tục. Thức ăn (Provimi Kliba 3337) và nước (axit hóa độ pH 2.5-3) được cung cấp tùy ý.

Kiểm tra

Các động vật thử nghiệm được kiểm soát hàng ngày về các triệu chứng lâm sàng và phát hiện các tác dụng phụ. Để kiểm tra từ đầu đến cuối, trong lượng cơ thể của các động vật thử nghiệm được dẫn chứng hai lần mỗi tuần và thể tích khối u được xác định bằng thước cặp sau giai đoạn xử lý.

Điều trị cho động vật thử nghiệm

Việc điều trị cho động vật thử nghiệm được bắt đầu vào ngày của 19 ngày ngẫu nhiên sau khi cấy tế bào u. Kháng thể kháng CD20 typ II được afucosyl hóa được làm tương thích với người B-HH6-B-KV1 GE hoặc Rituximab được cung cấp dưới dạng các tác nhân đơn đương lượng q7d vào ngày thử nghiệm 19 và 26 với liều lượng chỉ định là 1mg/kg. Chất dẫn tương ứng được cung cấp vào các ngày tương tự. Bendamustin được sử dụng tiêm khoang bụng vào ngày thử nghiệm 19, 20, 21, và 22 với liều lượng chỉ định là 3mg/kg. Ở các nhóm điều trị kết hợp, tác nhân hóa liệu pháp được sử dụng 8 tiếng sau cả hai kháng thể vào ngày thử nghiệm 19.

Thử nghiệm ức chế sự phát triển của khối u *in vivo*

Vào ngày 36 sau khi tiêm tế bào u, có mức ức chế sự phát triển của khối u (TGI) như được đưa ra trong Bảng 1 tương ứng ở các động vật sử dụng rituximab, kháng thể kháng CD20 B-HH6-B-KV1 GE, kết hợp giữa rituximab và bendamustin hoặc kết hợp giữa kháng thể kháng CD20 và bendamustin, so với nhóm đối chứng. Điều trị với riêng bendamustin không hiển thị bất kỳ hoạt tính kháng u trong thử nghiệm.

Có nhiều hơn một hiệu ứng phụ bằng cách so sánh nhóm kết hợp kháng thể kháng CD20 B-HH6-B-KV1 GE/bendamustin với điều trị của riêng kháng thể kháng CD20 B-HH6-B-KV1 GE.

Đánh giá thống kê

Thử nghiệm được chấm dứt vào ngày 33. Đánh giá thống kê được dựa trên sAUC. Sự phát triển của khối u được thống kê ức chế đánh kể trong nhóm 2 (B-HH6-B-KV1 GE, 1mg/kg, mỗi lần trong tuần, tiêm khoang bụng) chỉ định bởi TCR của 0.72 (CI 0,59-0,86), trong nhóm 3 (Rituximab, 1mg/kg, mỗi lần trong tuần, tiêm khoang bụng) chỉ định bởi TCR của 0,78 (CI 0,65-0,93), trong nhóm 5 (B-HH6-B-KV1 GE, 1mg/kg, mỗi lần trong tuần, tiêm khoang bụng kết hợp với bendamustin, 3mg/kg, thử nghiệm các ngày 19-22, tiêm khoang bụng) chỉ định bởi TCR là 0.46 (CI 0.34-0.59) và trong nhóm 6 (Rituximab, 1mg/kg, mỗi

lần trong tuần, tiêm khoang bụng kết hợp với bendamustin, 3mg/kg, thử nghiệm các ngày 19-22, tiêm khoang bụng) chỉ định bởi TCR là 0,67 (CI 0.54-0.81) so với tá dược lỏng nhóm (nhóm 1). Nhóm 4 (bendamustin, 3mg/kg, thử nghiệm các ngày 19-22, tiêm khoang bụng) cho thấy sự phát triển của khối u so sánh như một nhóm đối chứng ở phần cuối thử nghiệm.

Sự kết hợp của B-HH6-B-KV1 GE với bendamustin cho thấy có hiệu quả hiệp đồng và hiệu quả đáng kể về mặt thống kê với sự ức chế phát triển khối u so với các phương pháp điều trị riêng rẽ được phân tích bởi thử nghiệm Tukey-Kramer ($p < 0,001$) (xem bảng 1 và hình 1)

Bảng 1: Tham số TCR với khoảng tin cậy (CI) thấp và cao dựa trên sAUC và TGI (%)

Nhóm	Lịch điều trị	TCR	95 % CI so với nhóm 1	TGI (%)
2	B-HH6-B-KV1 GE (một lần trong tuần, 1 mg/kg)	0,72	[0,59-0,86]	47
3	Rituximab (một lần trong tuần, 1 mg/kg)	0,78	[0,65-0,93]	29
4	bendamustin thử nghiệm các ngày 19-22, 3 mg/kg	0,9	[0,76-1,06]	0
5	B-HH6-B-KV1 GE (mỗi lần trong tuần, 1 mg/kg) + bendamustin (thử nghiệm các ngày 19-22, 3 mg/kg)	0,46	[0,34-0,59]	72
6	Rituximab (một lần trong tuần, 1 mg/kg) + bendamustin (thử nghiệm các ngày 19-22, 3 mg/kg)	0,67	[0,54-0,81]	42

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa với một lượng fucoza là 60% hoặc ít hơn tổng số lượng oligosacarit (đường) ở Asn297 và bendamustin để điều trị bệnh ung thư, trong đó kháng thể kháng CD20 này là kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người và bao gồm các trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) nêu trong SEQ ID NO: 7, và các trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) nêu trong SEQ ID NO: 20.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Roche Glycart AG

<120> Chế phẩm chứa kháng thể kháng CD20 được afucosyl hóa

<130> 26255

<150> EP 09010489.4

<151> 2009-08-14

<160> 27

<170> Bảng sáng chế phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD20 B-Ly1

<400> 1

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys

1 5 10 15

Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu

20 25 30

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp

35 40 45

Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr

50 55 60

Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr

65 70 75 80

Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly

85 90 95

Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

100 105 110

<210> 2

<211> 103

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể đơn dòng chuột kháng CD20 B-Ly1

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HH2)

<400> 3

```

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

```

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

$\langle 210 \rangle$ 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HH3)

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HH4)

<400> 5

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

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HH5)

<400> 6

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

```
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
            85                90                95  
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
        100                105                110  
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
    115
```

$\langle 210 \rangle$ 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HH6)

<400> 7

[illegible]

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tao

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HH7)

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HH8)

<400> 9

```

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

```

```
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
      85              90              95  
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
      100            105            110  
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
      115
```

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HH9)

<400> 10

[illegible]

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HL8)

<400> 11

```

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

```

<210> 12

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HL10)

<400> 12

```

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

```

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HL11)

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tao

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HL12)

<400> 14

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

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HL13)

<400> 15

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HL14)

<400> 16.

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của các kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HL15)

<400> 17

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

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của các kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HL16)

<400> 18

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của các kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người (B-HL17)

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

$\langle 210 \rangle$ 20

<211> 115

<212> PRT

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của các kháng thể B-Ly1 được làm tương thích với người B-KV1

<400> 20

```

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

```

<210> 21

<211> 144

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

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

```

	100		105		110										
Cys	Ala	Thr	Gln	Ile	Ile	Thr	Phe	Glu	Ser	Phe	Lys	Glu	Asn	Leu	Lys
	115		120		125										
Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Ile	Pro	Phe	Asp	Cys	Trp	Glu	Pro	Val	Gln	Glu
	130		135		140										

<210> 22

<211> 144

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

<210> 23

<211> 152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met	Ser	Arg	Leu	Pro	Val	Leu	Leu	Leu	Gln	Leu	Leu	Val	Arg	Pro	
1			5					10				15			
Gly	Leu	Gln	Ala	Pro	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Pro	Leu	Lys	Thr	Ser	Trp

	20		25		30										
Val	Asn	Cys	Ser	Asn	Met	Ile	Asp	Glu	Ile	Ile	Thr	His	Leu	Lys	Gln
	35						40					45			
Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu	Asp	Phe	Asn	Asn	Leu	Asn	Gly	Glu	Asp	Gln
	50					55					60				
Asp	Ile	Leu	Met	Glu	Asn	Asn	Leu	Arg	Arg	Pro	Asn	Leu	Glu	Ala	Phe
65				70				75				80			
Asn	Arg	Ala	Val	Lys	Ser	Leu	Gln	Asn	Ala	Ser	Ala	Ile	Glu	Ser	Ile
			85					90				95			
Leu	Lys	Asn	Leu	Leu	Pro	Cys	Leu	Pro	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Pro	Thr
		100						105				110			
Arg	His	Pro	Ile	His	Ile	Lys	Asp	Gly	Asp	Trp	Asn	Glu	Phe	Arg	Arg
	115						120					125			
Lys	Leu	Thr	Phe	Tyr	Leu	Lys	Thr	Leu	Glu	Asn	Ala	Gln	Ala	Gln	Gln
	130						135					140			
Thr	Thr	Leu	Ser	Leu	Ala	Ile	Phe								
145					150										

<210> 24

<211> 152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

115 120 125
 Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln
 130 135 140
 Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile Phe
 145 150

<210> 25

<211> 152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val Arg Pro
 1 5 10 15
 Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Ser Leu Lys Thr Ser Trp
 20 25 30
 Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr Arg Leu Lys Gln
 35 40 45
 Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln
 50 55 60
 Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe
 65 70 75 80
 Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile
 85 90 95
 Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr
 100 105 110
 Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg
 115 120 125
 Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln
 130 135 140
 Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile Phe
 145 150

<210> 26

<211> 554

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu

1					5					10					15				
Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Leu	Ala	Ser	Arg	Ser	Ile	Thr				
				20				25				30							
Glu	Glu	Val	Ser	Glu	Tyr	Cys	Ser	His	Met	Ile	Gly	Ser	Gly	His	Leu				
				35				40				45							
Gln	Ser	Leu	Gln	Arg	Leu	Ile	Asp	Ser	Gln	Met	Glu	Thr	Ser	Cys	Gln				
				50				55				60							
Ile	Thr	Phe	Glu	Phe	Val	Asp	Gln	Glu	Gln	Leu	Lys	Asp	Pro	Val	Cys				
65				70				75				80							
Tyr	Leu	Lys	Lys	Ala	Phe	Leu	Leu	Val	Gln	Asp	Ile	Met	Glu	Asp	Thr				
				85				90				95							
Met	Arg	Phe	Arg	Asp	Asn	Thr	Pro	Asn	Ala	Ile	Ala	Ile	Val	Gln	Leu				
				100				105				110							
Gln	Glu	Leu	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Ser	Cys	Phe	Thr	Lys	Asp	Tyr	Glu				
				115				120				125							
Glu	His	Asp	Lys	Ala	Cys	Val	Arg	Thr	Phe	Tyr	Glu	Thr	Pro	Leu	Gln				
				130				135				140							
Leu	Leu	Glu	Lys	Val	Lys	Asn	Val	Phe	Asn	Glu	Thr	Lys	Asn	Leu	Leu				
145				150				155				160							
Asp	Lys	Asp	Trp	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Asn	Cys	Asn	Asn	Ser	Phe	Ala				
				165				170				175							
Glu	Cys	Ser	Ser	Gln	Asp	Val	Val	Thr	Lys	Pro	Asp	Cys	Asn	Cys	Leu				
				180				185				190							
Tyr	Pro	Lys	Ala	Ile	Pro	Ser	Ser	Asp	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Pro	His				
				195				200				205							
Gln	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Met	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Leu	Thr	Trp	Glu				
				210				215				220							
Asp	Ser	Glu	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Ser	Leu	Leu	Pro	Gly	Glu	Gln	Pro				
225				230				235				240							
Leu	His	Thr	Val	Asp	Pro	Gly	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Pro	Pro	Arg	Ser				
				245				250				255							
Thr	Cys	Gln	Ser	Phe	Glu	Pro	Pro	Glu	Thr	Pro	Val	Val	Lys	Asp	Ser				
				260				265				270							
Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Pro	Gln	Pro	Arg	Pro	Ser	Val	Gly	Ala	Phe	Asn				
				275				280				285							
Pro	Gly	Met	Glu	Asp	Ile	Leu	Asp	Ser	Ala	Met	Gly	Thr	Asn	Trp	Val				
				290				295				300							
Pro	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Glu	Ala	Ser	Glu	Ile	Pro	Val	Pro	Gln	Gly				

Thr	Glu	Leu	Ser	Pro	Ser	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Met	Gln	Thr	Glu
				310							315	320			
				325							330	335			
Pro	Ala	Arg	Pro	Ser	Asn	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Leu	Pro	Ala
				340							345	350			
Ser	Ala	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Asp	Val	Thr	Gly	Thr	Ala	Leu	Pro
				355							360	365			
Arg	Val	Gly	Pro	Val	Arg	Pro	Thr	Gly	Gln	Asp	Trp	Asn	His	Thr	Pro
				370							375	380			
Gln	Lys	Thr	Asp	His	Pro	Ser	Ala	Leu	Leu	Arg	Asp	Pro	Pro	Glu	Pro
				385							390	395			
Gly	Ser	Pro	Arg	Ile	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro	Gln	Gly	Leu	Ser	Asn	Pro
				405							410	415			
Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Gln	Pro	Gln	Leu	Ser	Arg	Ser	His	Ser	Ser	Gly
				420							425	430			
Ser	Val	Leu	Pro	Leu	Gly	Glu	Leu	Glu	Gly	Arg	Arg	Ser	Thr	Arg	Asp
				435							440	445			
Arg	Arg	Ser	Pro	Ala	Glu	Pro	Glu	Gly	Gly	Pro	Ala	Ser	Glu	Gly	Ala
				450							455	460			
Ala	Arg	Pro	Leu	Pro	Arg	Phe	Asn	Ser	Val	Pro	Leu	Thr	Asp	Thr	Gly
				465							470	475			
His	Glu	Arg	Gln	Ser	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser
				485							490	495			
Val	Phe	His	Leu	Leu	Val	Pro	Ser	Val	Ile	Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Val
				500							505	510			
Gly	Gly	Leu	Leu	Phe	Tyr	Arg	Trp	Arg	Arg	Arg	Ser	His	Gln	Glu	Pro
				515							520	525			
Gln	Arg	Ala	Asp	Ser	Pro	Leu	Glu	Gln	Pro	Glu	Gly	Ser	Pro	Leu	Thr
				530							535	540			
Gln	Asp	Asp	Arg	Gln	Val	Glu	Leu	Pro	Val						
				545							550				

<210> 27

<211> 554

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu

1		5		10		15									
Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Leu	Ala	Ser	Arg	Ser	Ile	Thr
		20						25					30		
Glu	Glu	Val	Ser	Glu	Tyr	Cys	Ser	His	Met	Ile	Gly	Ser	Gly	His	Leu
		35						40					45		
Gln	Ser	Leu	Gln	Arg	Leu	Ile	Asp	Ser	Gln	Met	Glu	Thr	Ser	Cys	Gln
		50						55					60		
Ile	Thr	Phe	Glu	Phe	Val	Asp	Gln	Glu	Gln	Leu	Lys	Asp	Pro	Val	Cys
65					70					75					80
Tyr	Leu	Lys	Lys	Ala	Phe	Leu	Leu	Val	Gln	Asp	Ile	Met	Glu	Asp	Thr
				85					90					95	
Met	Arg	Phe	Arg	Asp	Asn	Thr	Pro	Asn	Ala	Ile	Ala	Ile	Val	Gln	Leu
			100					105					110		
Gln	Glu	Leu	Ser	Leu	Arg	Leu	Lys	Ser	Cys	Phe	Thr	Lys	Asp	Tyr	Glu
		115						120					125		
Glu	His	Asp	Lys	Ala	Cys	Val	Arg	Thr	Phe	Tyr	Glu	Thr	Pro	Leu	Gln
		130						135					140		
Leu	Leu	Glu	Lys	Val	Lys	Asn	Val	Phe	Asn	Glu	Thr	Lys	Asn	Leu	Leu
145					150					155					160
Asp	Lys	Asp	Trp	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Asn	Cys	Asn	Asn	Ser	Phe	Ala
				165					170					175	
Glu	Cys	Ser	Ser	Gln	Asp	Val	Val	Thr	Lys	Pro	Asp	Cys	Asn	Cys	Leu
			180					185					190		
Tyr	Pro	Lys	Ala	Ile	Pro	Ser	Ser	Asp	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Pro	His
		195						200					205		
Gln	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Met	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Leu	Thr	Trp	Glu
		210						215					220		
Asp	Ser	Glu	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Ser	Leu	Leu	Pro	Gly	Glu	Gln	Pro
225					230					235					240
Leu	His	Thr	Val	Asp	Pro	Gly	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Pro	Pro	Arg	Ser
				245					250					255	
Thr	Cys	Gln	Ser	Phe	Glu	Pro	Pro	Glu	Thr	Pro	Val	Val	Lys	Asp	Ser
			260					265					270		
Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Pro	Gln	Pro	Arg	Pro	Ser	Val	Gly	Ala	Phe	Asn
		275						280					285		
Pro	Gly	Met	Glu	Asp	Ile	Leu	Asp	Ser	Ala	Met	Gly	Thr	Asn	Trp	Val
		290						295					300		
Pro	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Glu	Ala	Ser	Glu	Ile	Pro	Val	Pro	Gln	Gly

305		310		315		320									
Thr	Glu	Leu	Ser	Pro	Ser	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Met	Gln	Thr	Glu
				325					330					335	
Pro	Ala	Arg	Pro	Ser	Asn	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Leu	Pro	Ala
				340					345					350	
Ser	Ala	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Asp	Val	Thr	Gly	Thr	Ala	Leu	Pro
				355					360					365	
Arg	Val	Gly	Pro	Val	Arg	Pro	Thr	Gly	Gln	Asp	Trp	Asn	His	Thr	Pro
				370					375					380	
Gln	Lys	Thr	Asp	His	Pro	Ser	Ala	Leu	Leu	Arg	Asp	Pro	Pro	Glu	Pro
				385					390					395	
Gly	Ser	Pro	Arg	Ile	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro	Gln	Gly	Leu	Ser	Asn	Pro
				405					410					415	
Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Gln	Pro	Gln	Leu	Ser	Arg	Ser	His	Ser	Ser	Gly
				420					425					430	
Ser	Val	Leu	Pro	Leu	Gly	Glu	Leu	Glu	Gly	Arg	Arg	Ser	Thr	Arg	Asp
				435					440					445	
Arg	Arg	Ser	Pro	Ala	Glu	Pro	Glu	Gly	Gly	Pro	Ala	Ser	Glu	Gly	Ala
				450					455					460	
Ala	Arg	Pro	Leu	Pro	Arg	Phe	Asn	Ser	Val	Pro	Leu	Thr	Asp	Thr	Gly
				465					470					475	
His	Glu	Arg	Gln	Ser	Glu	Gly	Ser	Phe	Ser	Pro	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser
				485					490					495	
Val	Phe	His	Leu	Leu	Val	Pro	Ser	Val	Ile	Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Val
				500					505					510	
Gly	Gly	Leu	Leu	Phe	Tyr	Arg	Trp	Arg	Arg	Arg	Ser	His	Gln	Glu	Pro
				515					520					525	
Gln	Arg	Ala	Asp	Ser	Pro	Leu	Glu	Gln	Pro	Glu	Gly	Ser	Pro	Leu	Thr
				530					535					540	
Gln	Asp	Asp	Arg	Gln	Val	Glu	Leu	Pro	Val						
545									550						

Fig.1

