

KHÁNG THỂ CHỐNG LẠI BỆNH UNG THƯ MÁU

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể chống lại bệnh ung thư máu, và cụ thể hơn là liên quan đến kháng thể nhận diện HLA-DR hoặc đoạn chức năng của nó. Sáng chế còn đề cập đến thụ thể kháng nguyên khảm có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó, hoặc tế bào miễn dịch biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm. Hơn nữa, sáng chế đề cập đến kháng thể đa đặc hiệu bao gồm kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó và vị trí nhận biết kháng nguyên đối với các tế bào miễn dịch. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa các kháng thể này và loại tương tự.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (acute myeloid leukemia, AML) là một trong số các bệnh ung thư máu điển hình. Nếu bệnh này không được chữa khỏi bằng biện pháp hóa trị, thì sẽ có chỉ định ghép tế bào mầm tạo máu dị sinh, và nhiều người được chữa khỏi bằng cách đó. Tuy nhiên, vẫn có nhiều người không thể được chữa khỏi. Một phương pháp đầy hứa hẹn để chữa khỏi cho các bệnh nhân này là liệu pháp miễn dịch bằng cách sử dụng các tế bào T mang thụ thể kháng nguyên khảm (CAR-T).

Các tế bào CD19 CAR-T thể hiện các tác dụng đáng kể chống lại bệnh bạch cầu tế bào B tái phát/kháng thuốc và u lympho ác tính (tài liệu phi sáng chế (Non patent literature, NPL) 1 và 2). Tuy nhiên, vẫn chưa có tế bào CAR-T nào chống lại AML một cách hiệu quả. Cho đến nay, các tế bào CAR-T hướng đích CD33, CD123, và tương tự dùng cho AML đã được phát triển, nhưng các vấn đề như độc tính mạnh đối với máu lại nảy sinh vì chúng được biểu hiện trong một số tế bào máu bình thường (NPL 3 và 4).

Do đó, các nỗ lực tìm kiếm các kháng nguyên bề mặt tế bào đặc hiệu AML có thể được sử dụng cho liệu pháp CAR-T đã được thực hiện ở nhiều nơi trên thế giới. Tuy nhiên, bất chấp những nỗ lực mạnh mẽ bằng cách sử dụng các phương pháp toàn diện

như phân tích phiên mã hoặc phân tích proteome, vẫn chưa tìm thấy một đích tốt nào (NPL 5).

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu phi sáng chế

NPL 1: Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2019; 380(1): 45-56

NPL 2: Park JH, Riviere I, Gonen M, Wang X, Senechal B, Curran KJ, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018; 378(5): 449-59

NPL 3: Wang, Q.S., Y. Wang, H.Y. Lv, Q.W. Han, H. Fan, B. Guo, L.L. Wang, and W.D. Han. 2015. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Mol Ther* 23: 184-191

NPL 4: Loff, S., J. Dietrich, J.E. Meyer, J. Riewaldt, J. Spehr, M. von Bonin, C. Grunder, M. Swayampakula, K. Franke, A. Feldmann, M. Bachmann, G. Ehninger, A. Ehninger, and M. Cartellieri. 2020. Rapidly Switchable Universal CAR-T Cells for Treatment of CD123-Positive Leukemia. *Mol Ther Oncolytics* 17: 408-420

NPL 5: Perna F, Berman SH, Soni RK, Mansilla-Soto J, Eyquem J, Hamieh M, et al. Integrating Proteomics and Transcriptomics for Systematic Combinatorial Chimeric Antigen Receptor Therapy of AML. *Cancer Cell*. 2017; 32(4): 506-19 e5

NPL 6: Hasegawa K, Ikeda S, Yaga M, Watanabe K, Urakawa R, Iehara A, et al. Selective targeting of multiple myeloma cells with a monoclonal antibody recognizing the ubiquitous protein CD98 heavy chain. *Sci Transl Med*. 2022; 14(632): eaax7706

NPL 7: Hosen N, Matsunaga Y, Hasegawa K, Matsuno H, Nakamura Y, Makita M, et al. The activated conformation of integrin beta7 is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy. Nat Med. 2017; 23(12): 1436-43

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Xét đến các thách thức đặt ra bởi lĩnh vực kỹ thuật có liên quan đã nêu ở trên, sáng chế hướng tới việc xác định kháng nguyên bề mặt tế bào đặc hiệu với các bệnh ung thư máu như AML và tương tự, và cung cấp kháng thể nhận diện kháng nguyên hoặc đoạn chức năng của nó cũng như phương pháp hiệu quả cho liệu pháp miễn dịch đối với bệnh ung thư máu bằng cách sử dụng kháng thể hoặc loại tương tự.

Giải pháp để giải quyết vấn đề

Trước đây, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng ngay cả khi bản thân một protein không đặc hiệu với ung thư, thì epitop đặc hiệu với ung thư được hình thành bởi sự thay đổi sau dịch mã của nó có thể là đích đối với liệu pháp miễn dịch (NPL 6 và 7).

Để đạt được mục đích đã nêu ở trên, vô số các kháng thể gắn kết với các tế bào AML được sản xuất, từ đó các kháng thể đặc hiệu AML được xác định để sau đó xác định kháng nguyên nhận biết của nó. Thông qua các phương pháp tiếp cận này, các tác giả sáng chế hướng tới việc phân lập các kháng thể đặc hiệu AML, phát triển các tế bào CAR-T dựa trên đó, và các nhiệm vụ khác.

Cụ thể, khoảng 14000 tế bào lai tiết ra các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody, mAb) gắn kết với các tế bào tủy xương (bone marrow, BM) của các bệnh nhân AML hoặc các dòng tế bào AML khác nhau được thiết lập. Tiếp theo, từ các mAb này, 1078 mAb không gắn kết với các tế bào khác ngoài các tế bào B trong các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) từ người cho khỏe mạnh được chọn. Hơn nữa, các tế bào BM của bệnh nhân AML được nhuộm bằng các

mAb ứng viên này, và 32 dòng vô tính của các mAb gắn kết đặc hiệu với AML cuối cùng được xác định.

Sau đó, liên quan đến một trong số các dòng vô tính này, KG2032, một nỗ lực đã được thực hiện để xác định kháng nguyên được nhận diện bởi kháng thể này bằng cách sử dụng hiện tượng mất gắn kết với các tế bào u lympho (các tế bào Daudi) cùng với việc làm bất hoạt gen toàn diện bằng hệ CRISPR-Cas9 làm chỉ số. Kết quả là, đã làm rõ được rằng kháng nguyên được nhận diện bởi KG2032 là HLA-DR. Ngoài ra, 8 dòng vô tính nằm trong số 32 dòng vô tính này và khác với KG2032, và cũng đã làm rõ được rằng kháng nguyên nhận diện bởi 8 dòng vô tính là HLA-DR.

Hơn nữa, vì HLA-DR là phân tử đa hình ở mức độ cao, việc alen nào của HLA-DR KG2032 có thể nhận diện đã được nghiên cứu. Kết quả là, đã phát hiện ra rằng KG2032 gắn kết với các dòng tế bào bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính (các tế bào K562) biểu hiện HLA-DRB1*0405, 0410, 0701, 0803, 0901, 1201, hoặc 1454, nhưng KG2032 không gắn kết với các tế bào K562 biểu hiện HLA-DRB1*0101, 0301, 0403, 0404, 0802, 1101, 1301, 1302, 1403, 1405, 1406, 1501, hoặc 1502.

Ngoài ra, cũng đã làm rõ rằng KG2032 không gắn kết với các tế bào đơn nhân và một số tế bào T biểu hiện HLA-DR.

Hơn nữa, trình tự axit amin của vùng biến đổi của KG2032 được xác định, và thụ thể kháng nguyên khả năng dung hợp với CD28 và CD3 ζ , hoặc CD8 α , 4-1BB, và CD3 ζ được thiết kế cho vùng này. Sau đó, các tế bào T biểu hiện thụ thể kháng nguyên khả năng này (các tế bào CAR-T) được chuẩn bị và được đồng nuôi cấy với dòng tế bào có nguồn gốc từ bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính ở người (các tế bào KG1a). Kết quả là, các tế bào CAR-T được phát hiện là tạo ra các cytokin như IFN- γ và IL-2, và chúng cũng biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào. Hơn nữa, khi các tế bào CAR-T được sử dụng cho chuột nhắt được cấy ghép các tế bào KG1a, đã quan sát thấy tác dụng kháng u rõ rệt.

Hơn nữa, vectơ để đồng biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm được dung hợp vào vùng biến đổi của KG2032 với CD28 và CD3 ζ và IL-15 được tạo ra. Sau đó, các tế bào NK biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm này (các tế bào CAR-NK) được chuẩn bị và được đồng nuôi cấy với dòng tế bào có nguồn gốc từ bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính ở người (các tế bào KG1a). Kết quả là, các tế bào CAR-NK được phát hiện thể hiện hoạt tính gây độc tế bào. Hơn nữa, khi các tế bào CAR-NK được sử dụng cho chuột nhắt đã được cấy ghép các tế bào KG1a, cũng đã quan sát thấy tác dụng kháng u rõ rệt.

Dựa trên các kết quả này, để điều trị bệnh ung thư máu, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các phương thức sử dụng (1) và (2) sau đây có sẵn bằng cách sử dụng các kháng thể như KG2032 nhận diện HLA-DR.

(1) Ở các bệnh nhân AML tái phát sau khi cấy ghép dị sinh không hợp đôi HLA-DR, nếu HLA-DR của người nhận (bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu) là loại dương tính với kháng thể kháng HLA-DR và loại HLA-DR của người cho là loại âm tính với kháng thể kháng HLA-DR, các tế bào CAR-T có nguồn gốc KG2032 và tương tự được tạo ra từ các tế bào T có nguồn gốc từ chính người nhận ghép hoặc người cho sẽ tấn công đặc hiệu vào bệnh bạch cầu của người nhận bằng cách sử dụng kháng thể kháng HLA-DR.

(2) Bằng cách sử dụng kháng thể kháng HLA-DR mà chỉ gắn kết với các tế bào nhất định như các tế bào B trong các tế bào máu bình thường, và nó không gắn kết với tất cả các tế bào mầm tạo máu đóng vai trò là nguồn của tất cả các tế bào máu, ngay cả khi các tế bào CAR-T tự thân thông thường được sử dụng để điều trị cho các bệnh nhân AML có loại HLA-DR dương tính với kháng thể kháng HLA-DR, các tế bào bệnh bạch cầu sẽ được loại bỏ, và sự tạo máu bình thường sẽ được duy trì bằng các tế bào âm tính với kháng thể kháng HLA-DR. Do đó, cho rằng đây là phương pháp điều trị khả thi.

Điều này dẫn đến hoàn thành sáng chế.

Cụ thể, sáng chế đề xuất các khía cạnh sau đây.

[1] Chế phẩm để điều trị bệnh ung thư máu, trong đó chế phẩm này bao gồm: kháng thể nhận diện HLA-DR hoặc đoạn chức năng của nó.

[2] Chế phẩm được sử dụng cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư máu đã được cấy ghép các tế bào mầm tạo máu,

trong đó chế phẩm này bao gồm kháng thể nhận diện HLA-DR hoặc đoạn chức năng của nó,

người cho các tế bào mầm tạo máu và bệnh nhân có các loại alen HLA-DR khác nhau, và

kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó gắn kết với HLA-DR của bệnh nhân nhưng không gắn kết với HLA-DR của người cho.

[3] Chế phẩm theo mục [1] hoặc [2], trong đó kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó nhận diện HLA-DRB.

[4] Chế phẩm theo mục [1] hoặc [2], trong đó kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó nhận diện HLA-DRB1.

[5] Chế phẩm theo mục [1] hoặc [2], trong đó kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó gắn kết với ít nhất một loại alen của HLA-DR được chọn từ nhóm gồm có HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0410, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0803, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1201, và HLA-DRB1*1454, HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0403, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1301, HLA-DRB1*1302, HLA-DRB1*1403, HLA-DRB1*1405, HLA-DRB1*1406, HLA-DRB1*1501, và HLA-DRB1*1502.

[6] Chế phẩm theo mục [1] hoặc [2], trong đó kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó gắn kết với loại alen của HLA-DRB1 trong đó vị trí 86 là axit amin khác với axit aspartic, nhưng không gắn kết với loại alen của HLA-DRB1 mà vị trí 86 là axit aspartic.

[7] Chế phẩm theo mục [1] hoặc [2], trong đó kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó gắn kết với ít nhất một loại alen của HLA-DR được chọn từ nhóm gồm có HLA-

DRB1*0405, HLA-DRB1*0410, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0803, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1201, và HLA-DRB1*1454, nhưng không gắn kết với ít nhất một loại alen của HLA-DR được chọn từ nhóm gồm có HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0403, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1301, HLA-DRB1*1302, HLA-DRB1*1403, HLA-DRB1*1405, HLA-DRB1*1406, HLA-DRB1*1501, và HLA-DRB1*1502.

[8] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7] bao gồm: tế bào miễn dịch biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó.

[9] Chế phẩm theo mục [8], trong đó tế bào miễn dịch được chuẩn bị từ tế bào có nguồn gốc từ người cho tế bào mầm tạo máu.

[10] Chế phẩm theo mục [9], trong đó tế bào có nguồn gốc từ người cho là tế bào mầm đa năng.

[11] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7] bao gồm: kháng thể đa đặc hiệu có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó và vị trí nhận biết kháng nguyên đối với tế bào miễn dịch.

[12] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó không gắn kết với một số tế bào bình thường.

[13] Chế phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó không gắn kết với các tế bào đơn nhân.

[14] Chế phẩm theo mục [13] bao gồm: tế bào miễn dịch biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó.

[15] Chế phẩm theo mục [13] bao gồm: kháng thể đa đặc hiệu có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó và vị trí nhận biết kháng nguyên đối với tế bào miễn dịch.

[16] Kháng thể nhận diện HLA-DR hoặc đoạn chức năng của nó, mà

gắn kết với vùng chứa trình tự axit amin từ các vị trí 74 đến 89 của HLA-DRB1, trong đó axit amin ở vị trí 86 là axit amin khác với axit aspartic, nhưng

không gắn kết với vùng chứa trình tự axit amin từ các vị trí 74 đến 89 của HLA-DRB1, trong đó axit amin ở vị trí 86 là axit aspartic.

[17] Kháng thể nhận diện HLA-DR hoặc đoạn chức năng của nó, có dấu hiệu được mô tả trong một trong số các mục từ (a) đến (i) sau đây:

(a) bao gồm

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến 3, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 5 đến 7, tương ứng;

(b) bao gồm

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 34 đến 36, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 38 đến 40, tương ứng;

(c) bao gồm

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 42 đến 44, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 46 đến 48, tương ứng;

(d) bao gồm

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 50 đến 52, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 54 đến 56, tương ứng;

(e) bao gồm

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 58 đến 60, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64, tương ứng;

(f) bao gồm

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 66 đến 68, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64, tương ứng;

(g) bao gồm

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 70 đến 72, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64, tương ứng;

(h) bao gồm

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 74 đến 76, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64, tương ứng; và

(i) bao gồm

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 66 đến 68, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62, 78 và 64, tương ứng.

[18] Thụ thể kháng nguyên khảm có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo mục [16] hoặc [17].

[19] Tế bào miễn dịch biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo mục [16] hoặc [17].

[20] Tế bào miễn dịch theo mục [19], mà không gắn kết với kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo mục [16] hoặc [17].

[21] Tế bào miễn dịch theo mục [19] hoặc [20], là ít nhất một tế bào miễn dịch được chọn từ nhóm gồm có tế bào T, tế bào NK và tế bào NKT.

[22] Dược phẩm bao gồm: kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo mục [16] hoặc [17], hoặc tế bào miễn dịch theo mục bất kỳ trong số các mục từ [19] đến [21].

[23] Dược phẩm theo mục [22], là dược phẩm để điều trị bệnh ung thư máu.

[24] Dược phẩm theo mục [23], trong đó tế bào miễn dịch được chuẩn bị từ tế bào có nguồn gốc từ người không phải là bệnh nhân mắc bệnh ung thư máu được điều trị bằng dược phẩm.

[25] Dược phẩm theo mục [23], trong đó tế bào miễn dịch được chuẩn bị từ tế bào được thu thập từ bệnh nhân mắc bệnh ung thư máu được điều trị bằng dược phẩm.

[26] Phương pháp sản xuất dược phẩm theo mục [23], bao gồm bước cải biến tế bào miễn dịch mà không gắn kết với kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo mục [16] hoặc [17], để biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm theo mục [18].

[27] Phương pháp theo mục [26], trong đó tế bào miễn dịch được chuẩn bị từ tế bào có nguồn gốc từ người không phải là bệnh nhân mắc bệnh ung thư máu được điều trị bằng dược phẩm.

[28] Phương pháp theo mục [26], trong đó tế bào miễn dịch được chuẩn bị từ tế bào được thu thập từ bệnh nhân mắc bệnh ung thư máu được điều trị bằng dược phẩm.

[29] Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ [26] đến [28], trong đó tế bào miễn dịch là ít nhất một tế bào miễn dịch được chọn từ nhóm gồm có tế bào T, tế bào NK và tế bào NKT.

Tác dụng có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, bằng cách hướng đích HLA-DR, là kháng nguyên bề mặt tế bào đặc hiệu với bệnh ung thư máu, nên có thể điều trị bệnh này bằng cách sử dụng các kháng thể nhận diện kháng nguyên này hoặc các đoạn chức năng của nó, hoặc bằng cách sử dụng thụ thể kháng nguyên khảm hoặc loại tương tự có nó.

Đặc biệt là, các kháng thể như vậy có thể thể hiện tính đặc hiệu alen đối với HLA-DR. Đối với các bệnh nhân ung thư máu tái phát sau khi cấy ghép dị sinh không hợp đôi HLA-DR, nếu HLA-DR của người nhận (bệnh nhân ung thư máu) là loại dương tính mà gắn kết với kháng thể của sáng chế, và loại HLA-DR của người cho là loại âm tính mà không gắn kết với kháng thể của sáng chế, thì các tế bào CAR-T có nguồn gốc từ kháng thể của sáng chế được tạo ra từ các tế bào có nguồn gốc từ người cho chứa các tế bào mầm đa năng có thể tấn công đặc hiệu bệnh ung thư máu của người nhận.

Hơn nữa, ngay cả khi các tế bào CAR-T tự thân bình thường và tương tự được sử dụng cho phương pháp điều trị bằng kháng thể của sáng chế ở các bệnh nhân ung thư máu với HLA-DR dương tính gắn kết với kháng thể của sáng chế, các tế bào ung thư máu được loại bỏ, sự tạo máu bình thường được duy trì bởi các tế bào âm tính không gắn kết với kháng thể của sáng chế, làm cho việc điều trị trở nên khả thi.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích gắn kết của KG2032 với máu ngoại vi của những người khỏe mạnh bằng cách phân tích tế bào dòng chảy. Trong hình

vẽ này, T biểu thị các tế bào T, B biểu thị các tế bào B, Mo biểu thị các tế bào đơn nhân, và Neu biểu thị các bạch cầu trung tính.

Fig.1B là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích gắn kết của KG2032 với các mẫu AML bằng cách phân tích tế bào dòng chảy. Mã số bệnh nhân duy nhất (Unique patient number, UPN) từ 1 đến 14 cho biết các tế bào bệnh bạch cầu có nguồn gốc từ mỗi bệnh nhân AML.

Fig.2A là sơ đồ minh họa tổng quan về bước xác định kháng nguyên nhận diện bởi KG2032 bằng cách sử dụng thư viện ARN hướng dẫn CRISPR (CRISPR guide RNA, gRNA).

Fig.2B là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích gắn kết của KG2032 với các tế bào Daudi biểu hiện Cas9 được thể hiện trên Fig.2A bằng cách phân tích tế bào dòng chảy. Cụ thể hơn, sau khi đưa thư viện gRNA vào như được thể hiện trên Fig.2A, các phân đoạn tế bào có sự gắn kết KG2032 giảm được phân loại. Hình vẽ này thể hiện các kết quả phân tích KG2032 gắn kết với các tế bào trước và sau khi phân loại.

Fig.2C là sơ đồ biểu diễn tần suất của gRNA được đưa vào trong các tế bào trước và sau quá trình phân loại nêu trên.

Fig.2D là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích sự gắn kết của KG2032 hoặc kháng thể kháng HLA-DR hiện có (L243) với các tế bào Daudi có phân tử HLA-DR đã được bất hoạt gen bằng cách phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.2E là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích sự gắn kết của KG2053, KG1982, KG19122, KG19130, KG19214, KG19833, aAML191870 hoặc aAML191872 với các tế bào Daudi có phân tử HLA-DR đã được bất hoạt gen bằng cách phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.3 là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích gắn kết của KG2032 hoặc L243 với các tế bào K562 biểu hiện các phân tử HLA-DRB1 khác nhau bằng cách phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.4A là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích sự gắn kết của KG2032 hoặc L243 với các phân đoạn máu ngoại vi của người khỏe mạnh (người cho 1) có HLA-DRB1 âm tính với KG2032 (0403/0802) hoặc các phân đoạn máu ngoại vi của người khỏe mạnh (người cho 2) có HLA-DRB1 dương tính với KG2032 (0403/0901) bằng cách phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.4B là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích gắn kết của KG2032 với các tế bào tủy xương của các bệnh nhân AML có HLA-DRB1 dương tính với KG2032 bằng cách phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.4C là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích gắn kết của KG2032 với các phân đoạn của các tế bào tủy xương của người khỏe mạnh có HLA-DRB1 dương tính với KG2032 bằng cách phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.5A là sơ đồ minh họa mô tả chung về phương thức sử dụng KG2032 trong quá trình điều trị AML.

Fig.5B là sơ đồ minh họa mô tả chung về một phương thức sử dụng KG2032 khác trong quá trình điều trị AML.

Fig.6 là sơ đồ minh họa các kết quả so sánh các trình tự axit amin của DRB1*1454 (dương tính với KG2032) và DRB1*1502 (âm tính với KG2032). Trong hình vẽ này, mỗi trong số các vùng từ 1 đến 5 biểu thị vùng có nhiều sự khác biệt về trình tự axit amin.

Fig.7A là sơ đồ minh họa mô tả chung về protein khả năng được dung hợp một phần với HLA-DRB1*1454 (dương tính với KG2032) và HLA-DRB1*1502 (âm tính với KG2032).

Fig.7B là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích gắn kết của KG2032 hoặc L243 với các tế bào K562 biểu hiện các protein khả năng khác nhau bằng cách phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.7C là sơ đồ minh họa các kết quả so sánh các trình tự axit amin của vùng 3 đối với các phân tử HLA-DRB1 khác nhau được biểu hiện trong các tế bào K562, giữa các phân tử mà KG2032 gắn kết và các phân tử mà nó không gắn kết.

Fig.7D là sơ đồ minh họa các kết quả so sánh sự gắn kết của KG2032 hoặc L243 khi biểu hiện thể đột biến trong các tế bào K562 trong đó axit amin serin (S) ở vị trí 86 của DRB1*0405 (dương tính với KG2032) được thay thế bằng axit aspartic (D).

Fig.8A là sơ đồ minh họa mô tả chung về thụ thể kháng nguyên khảm (KG2032-CAR) chứa vùng biến đổi của KG2032.

Fig.8B là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích tỷ lệ đưa KG2032-CAR vào.

Fig.8C là đồ thị thể hiện tỷ lệ tăng sinh của các tế bào T biểu hiện KG2032-CAR (các tế bào KG2032-CAR-T). Trong hình vẽ này, “Đối chứng” biểu thị các tế bào T không trải qua quá trình đưa gen vào.

Fig.8D là đồ thị thể hiện các kết quả phân tích sự sản sinh xytokin sau khi đồng nuôi cấy các tế bào KG2032-CAR-T và các dòng tế bào bệnh bạch cầu KG1a (dương tính với KG2032) hoặc THP-1 (âm tính với KG2032) trong 24 giờ.

Fig.8E là đồ thị thể hiện các kết quả phân tích hoạt tính gây độc tế bào sau khi đồng nuôi cấy các tế bào KG2032-CAR-T và các dòng tế bào bệnh bạch cầu KG1a hoặc THP-1 trong 4 giờ.

Fig.8F là đồ thị thể hiện các kết quả phân tích sự tăng sinh của các tế bào KG2032-CAR-T có và không bổ sung dasatinib. Lưu ý rằng trong các hình vẽ từ FIG.8F về trước, các kết quả khi sử dụng “BBζ” được thể hiện trên Fig.8A được trình bày là KG2032-CAR-T.

Fig.8G là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích sự biểu hiện của các dấu hiệu suy yếu tế bào T (PD-1, LAG3, và Tim-3) trong các tế bào KG2032-CAR-T có và không bổ sung dasatinib bằng cách phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.8H là đồ thị thể hiện các kết quả phân tích sự sản sinh IL2 trong quá trình đồng nuôi cấy các tế bào KG2032-CAR-T và các tế bào KG1a có và không bổ sung dasatinib.

Fig.8I là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích các tác dụng của việc sử dụng các tế bào KG2032-CAR-T trong mô hình ghép ngoại lai trong đó các tế bào KG1a biểu hiện luxiferaza được cấy ghép vào chuột nhắt NOG, bằng cách phát hiện sự phát quang sinh học bằng cách sử dụng hệ chụp ảnh in vivo (in vivo imaging system, IVIS).

Fig.8J là đồ thị minh họa các kết quả phân tích các tác dụng của việc sử dụng các tế bào KG2032-CAR-T trong mô hình ghép ngoại lai trong đó các tế bào KG1a biểu hiện luxiferaza được cấy ghép vào chuột nhắt NOG. Đồ thị này thể hiện xu hướng của cường độ phát quang được phát hiện bởi IVIS.

Fig.9A là sơ đồ minh họa mô tả chung của KG2032-CAR-T2A-IL-15 và quy trình sản xuất các tế bào NK được tải nạp bằng CAR.

Fig.9B là đồ thị thể hiện các kết quả phân tích sự tăng sinh của các tế bào NK được tải nạp bằng KG2032-CAR-T2A-IL15 (KG2032 CAR-NK) hoặc đối chứng (các tế bào NK không được tải nạp (non-transduced, NT)) trong quá trình nuôi cấy in vitro bằng cách phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.9C là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích sự biểu hiện của CD56, CD3, và KG2032 CAR trong KG2032 CAR-NK bằng cách phân tích tế bào dòng chảy.

Fig.9D là đồ thị thể hiện các kết quả đo mức mất hạt CD107a trong các tế bào KG2032 CAR-NK hoặc NK đối chứng khi đồng nuôi cấy với các tế bào đích đã chỉ định.

Fig.9E là sơ đồ minh họa các kết quả đo mức phân giải đặc hiệu của các tế bào KG2032 CAR-NK hoặc NK đối chứng khi đồng nuôi cấy với các tế bào đích đã chỉ định bằng xét nghiệm giải phóng ^{51}Cr .

Fig.9F là sơ đồ minh họa khi cấy chuyển các tế bào KG1a AML (KG1a-luc) vào trong chuột nhất thiếu hụt miễn dịch và truyền KG2032 CAR-NK cho chuột nhất.

Fig.9G là đồ thị thể hiện tỷ lệ sống của chuột nhất đã được cấy ghép KG1a mà đã được sử dụng KG2032 CAR-NK.

Fig.9H là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích chuột nhất được truyền KG2032 CAR-NK hoặc các tế bào NK đối chứng bằng cách phát hiện sự phát quang sinh học (n=4 trong mỗi nhóm).

Fig.10A là sơ đồ minh họa khi cấy chuyển các tế bào BM từ các bệnh nhân AML vào trong chuột nhất thiếu hụt miễn dịch và truyền các tế bào KG2032-CAR-T cải biến cho chuột nhất.

Fig.10B là sơ đồ minh họa các kết quả phân tích các tế bào BM của chuột nhất đã được truyền các tế bào KG2032 CAR-T cải biến hoặc các tế bào T đối chứng bằng cách phân tích tế bào dòng chảy. Các biểu đồ được tiền lọc là các tế bào sống âm tính với mCD45.

Fig.10C là sơ đồ chấm thể hiện các tỷ lệ phần trăm của các tế bào AML dương tính với hCD45 âm tính với hCD3 dương tính với hCD34 trong số các tế bào BM âm tính với mCD45 vào 31 ngày sau khi cấy ghép các tế bào AML.

Mô tả chi tiết sáng chế

Kháng thể kháng HLA-DR

Sáng chế đề cập đến kháng thể nhận diện HLA-DR, mà là một trong số các phức chất tương hợp mô chính (major histocompatibility complex, MHC) nhóm II, hoặc đoạn chức năng của nó. Theo sáng chế, “nhận diện HLA-DR” có nghĩa là gắn kết với ít nhất một loại alen trong HLA-DR và còn bao gồm gắn kết với ít nhất một loại alen trong HLA-DR trong lúc không gắn kết với ít nhất một loại alen khác.

Các ví dụ về loại alen của HLA-DR bao gồm HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR6, HLA-DR7, HLA-DR8, HLA-DR9, HLA-DR10,

HLA-DR11, HLA-DR12, HLA-DR13, HLA-DR14, HLA-DR15, HLA-DR52, và HLA-DR53. HLA-DR có thể là, chẳng hạn, phức chất của chuỗi α và chuỗi β . Cụ thể hơn, các ví dụ về chuỗi α bao gồm HLA-DRA như HLA-DRA1, và các ví dụ về chuỗi β bao gồm HLA-DRB như HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4, hoặc HLA-DRB5. Hơn nữa, các ví dụ về HLA-DRB1 bao gồm HLA-DRB1*0405 (SEQ ID NO: 11), HLA-DRB1*0410 (SEQ ID NO: 12), HLA-DRB1*0701 (SEQ ID NO: 13), HLA-DRB1*0803 (SEQ ID NO: 14), HLA-DRB1*0901 (SEQ ID NO: 15), HLA-DRB1*1201 (SEQ ID NO: 16), HLA-DRB1*1454 (SEQ ID NO: 17), HLA-DRB1*0101 (SEQ ID NO: 18), HLA-DRB1*0301 (SEQ ID NO: 19), HLA-DRB1*0403 (SEQ ID NO: 20), HLA-DRB1*0404 (SEQ ID NO: 21), HLA-DRB1*0802 (SEQ ID NO: 22), HLA-DRB1*1101 (SEQ ID NO: 23), HLA-DRB1*1301 (SEQ ID NO: 24), HLA-DRB1*1302 (SEQ ID NO: 25), HLA-DRB1*1403 (SEQ ID NO: 26), HLA-DRB1*1405 (SEQ ID NO: 27), HLA-DRB1*1406 (SEQ ID NO: 28), HLA-DRB1*1501 (SEQ ID NO: 29), và HLA-DRB1*1502 (SEQ ID NO: 30).

Chẳng hạn, kháng thể của sáng chế là kháng thể gắn kết với loại alen của HLA-DRB1 trong đó vị trí 86 là axit amin khác với axit aspartic. Hơn nữa, kháng thể như vậy có thể là kháng thể không gắn kết với loại alen của HLA-DRB1 mà vị trí 86 là axit aspartic. Lưu ý rằng “axit amin khác với axit aspartic” ở vị trí 86 tốt hơn là serin, valin, hoặc alanin.

Các ví dụ cụ thể hơn bao gồm các kháng thể gắn kết với ít nhất một (chẳng hạn, 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7) HLA-DR được chọn từ nhóm gồm có HLA-DRB1*0405 (SEQ ID NO: 11), HLA-DRB1*0410 (SEQ ID NO: 12), HLA-DRB1*0701 (SEQ ID NO: 13), HLA-DRB1*0803 (SEQ ID NO: 14), HLA-DRB1*0901 (SEQ ID NO: 15), HLA-DRB1*1201 (SEQ ID NO: 16), và HLA-DRB1*1454 (SEQ ID NO: 17). Mặt khác, các ví dụ của nó có thể còn bao gồm các kháng thể không gắn kết với ít nhất một (chẳng

hạn, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, hoặc 13) HLA-DR được chọn từ nhóm gồm có HLA-DRB1*0101 (SEQ ID NO: 18), HLA-DRB1*0301 (SEQ ID NO: 19), HLA-DRB1*0403 (SEQ ID NO: 20), HLA-DRB1*0404 (SEQ ID NO: 21), HLA-DRB1*0802 (SEQ ID NO: 22), HLA-DRB1*1101 (SEQ ID NO: 23), HLA-DRB1*1301 (SEQ ID NO: 24), HLA-DRB1*1302 (SEQ ID NO: 25), HLA-DRB1*1403 (SEQ ID NO: 26), HLA-DRB1*1405 (SEQ ID NO: 27), HLA-DRB1*1406 (SEQ ID NO: 28), HLA-DRB1*1501 (SEQ ID NO: 29), và HLA-DRB1*1502 (SEQ ID NO: 30). Hơn nữa, như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả sau đây, kháng thể của sáng chế có thể nhận diện vùng chứa trình tự axit amin gồm các vị trí 74 đến 89 của HLA-DRB1. Ngoài ra, kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể không gắn kết với các tế bào đơn nhân hoặc một số tế bào T.

Sự có mặt hoặc vắng mặt của sự gắn kết của kháng thể có thể được phân tích bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng các phương pháp miễn dịch học. Chẳng hạn, như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả sau đây, trong phép phân tích kháng nguyên bằng cách phân tích tế bào dòng chảy, nếu một đỉnh có nguồn gốc từ kháng thể thử nghiệm dịch chuyển sang phía có cường độ huỳnh quang mạnh hơn so với đỉnh có nguồn gốc từ kháng thể đối chứng isotype của nó, có thể xác định được rằng kháng thể thử nghiệm gắn kết (gần như) với kháng nguyên. Trong lúc đó, nếu không quan sát thấy sự dịch chuyển như vậy, có thể xác định được rằng kháng thể thử nghiệm không gắn kết (gần như) với kháng nguyên.

Hơn nữa, mức gắn kết của kháng thể của sáng chế tốt hơn là nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-7} theo K_D (hằng số phân ly), và tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng 10^{-8} . K_D được tính từ k_a (hằng số tốc độ gắn kết) và k_d (hằng số tốc độ phân ly) ($K_D = k_d/k_a$). Các thuật ngữ k_a và k_d là các hằng số tốc độ trong các phản ứng gắn kết và phân ly giữa hai phân tử, và, chẳng hạn, có thể được xác định bằng các phép đo bằng cách sử dụng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance, SPR). Phép đo SPR về sự gắn

kết giữa kháng thể và kháng nguyên là đã biết, và người có kỹ năng trong lĩnh vực này có thể xác định ka và kd của kháng thể dựa trên kỹ thuật đã biết như vậy, và hơn nữa, có thể tính K_D .

Theo sáng chế, thuật ngữ “kháng thể” bao gồm tất cả các nhóm và các phân nhóm của các globulin miễn dịch. “Kháng thể” bao gồm các kháng thể đa dòng và các kháng thể đơn dòng. “Kháng thể đa dòng” là chế phẩm kháng thể chứa các kháng thể khác nhau chống lại các epitop khác nhau. Ngược lại, “kháng thể đơn dòng” dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể gần như đồng nhất của các kháng thể. Không giống như các kháng thể đa dòng, các kháng thể đơn dòng nhận diện chỉ một yếu tố xác định trên kháng nguyên. Kháng thể của sáng chế tốt hơn là kháng thể đơn dòng. Kháng thể của sáng chế là kháng thể đã được tách và/hoặc thu hồi (nghĩa là, được phân lập) từ các thành phần trong môi trường tự nhiên.

Kháng thể của sáng chế có thể có ít nhất một hoạt tính gây độc tế bào được chọn từ hoạt tính ADCC và hoạt tính CDC, và có thể có cả hoạt tính ADCC và hoạt tính CDC.

Theo sáng chế, “hoạt tính độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC)” dùng để chỉ hoạt tính trong đó, khi kháng thể gắn kết với kháng nguyên bề mặt tế bào của các tế bào đích, các tế bào hiệu ứng (các tế bào miễn dịch như các tế bào NK và các tế bào đơn nhân) gắn kết thêm nữa với vùng Fc của kháng thể đó, hoạt hóa tế bào, sau đó giải phóng các yếu tố để tiêu diệt các tế bào đích. Trong lúc đó, “Hoạt tính độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (Complement-Dependent Cytotoxicity, CDC)” dùng để chỉ hoạt tính trong đó, khi kháng thể gắn kết với các tế bào đích, hệ thống bổ thể được hoạt hóa, dẫn đến sự phân giải của các tế bào đích.

Kháng thể của sáng chế có thể còn có hoạt tính kháng u. Theo sáng chế, “hoạt tính kháng u” có nghĩa là bất kỳ một trong số các hoạt tính ức chế sự tăng sinh của các tế bào ung thư, gây chết các tế bào ung thư, và ức chế sự di căn của các tế bào ung thư. Hoạt tính kháng u có thể được đánh giá, chẳng hạn, bằng cách phân tích có sử dụng mô

hình mang khối u như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả sau đây. Hơn nữa, ngay cả khi không trong hệ thống in vivo như vậy, nếu các tế bào khối u được nuôi cấy với sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng thể thử nghiệm, và số lượng của các tế bào khối u trong trường hợp có mặt kháng thể thử nghiệm giảm so với khối lượng khối u trong trường hợp vắng mặt kháng thể thử nghiệm, có thể xác định được rằng kháng thể có hoạt tính kháng u.

Kháng thể của sáng chế chỉ cần nhận diện HLA-DR, và nguồn gốc, loại, hình dạng của nó, và tương tự không bị giới hạn đặc biệt. Các ví dụ cụ thể về nó bao gồm các kháng thể có nguồn gốc từ các động vật không phải là người (như các kháng thể chuột nhắt, các kháng thể thỏ, các kháng thể chuột đồng, và các kháng thể lạc đà), các kháng thể có nguồn gốc từ người, các kháng thể khảm, và các kháng thể nhân hóa.

Theo sáng chế, là một ví dụ của “các kháng thể có nguồn gốc từ các động vật không phải là người”, KG2032, KG2053, KG1982, KG19130, KG19214, KG19833, aAML191870, aAML191872, và KG19122 có thể được đề cập đến, như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả sau đây. Cụ thể hơn, các kháng thể mà có vùng biến đổi chứa trình tự axit amin sau đây có thể được đề cập đến:

(a) kháng thể có vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8;

(b) kháng thể có vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 37, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 41;

(c) kháng thể có vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 49;

(d) kháng thể có vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 53, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 57;

(e) kháng thể có vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 61, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 65;

(f) kháng thể có vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 69, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 65;

(g) kháng thể có vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 73, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 65;

(h) kháng thể có vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 77, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 65;

(i) kháng thể có vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 69, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 79.

Hơn nữa, các kháng thể nhận diện HLA-DR và có các vùng quyết định tính bổ trợ (các CDR) sau đây có thể cũng được đưa ra làm ví dụ:

(a) kháng thể có các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4, và các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8;

(b) kháng thể có các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 37, và các CDR

từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 41;

(c) kháng thể có các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45, và các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 49;

(d) kháng thể có các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 53, và các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 57;

(e) kháng thể có các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 61, và các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 65;

(f) kháng thể có các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 69, và các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 65;

(g) kháng thể có các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 73, và các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 65;

(h) kháng thể có các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 77, và các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 65;

(i) kháng thể có các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 69, và các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ được xác định từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 79.

Lưu ý rằng liên quan đến các kháng thể như vậy, không có giới hạn cụ thể về phương pháp xác định CDR dựa trên trình tự axit amin của vùng biến đổi. Tuy nhiên, các sơ đồ đánh số đã biết như Kabat, Chothia, IMGT, và Aho có thể được đề cập đến. Cụ thể hơn, một ví dụ được xác định bởi Kabat, các kháng thể nhận diện HLA-DR và có CDR sau đây có thể cũng được đưa ra làm các ví dụ:

(a) kháng thể có các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến 3 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng, và các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 5 đến 7 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ;

(b) kháng thể có các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 34 đến 36 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng, và các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 38 đến 40 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ;

(c) kháng thể có các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 42 đến 44 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng, và các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 46 đến 48 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ;

(d) kháng thể có các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 50 đến 52 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng, và các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 54 đến 56 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ;

(e) kháng thể có các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 58 đến 60 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng, và các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ;

(f) kháng thể có các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 66 đến 68 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng, và các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ;

(g) kháng thể có các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 70 đến 72 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng, và các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ;

(h) kháng thể có các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 74 đến 76 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng, và các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ;

(i) kháng thể có các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 66 đến 68 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nặng, và các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62, 78 và 64 tương ứng là các CDR từ 1 đến 3 của chuỗi nhẹ.

Sáng chế cũng bao gồm không chỉ các kháng thể có các trình tự axit amin cụ thể như vậy tạo ra các vùng biến đổi và/hoặc các CDR, mà còn bao gồm các kháng thể có trình tự axit amin được cải biến mà không làm giảm hoạt tính mong muốn (như khả năng phản ứng chống lại các kháng nguyên). Các biến thể của trình tự axit amin như vậy có thể được chuẩn bị, chẳng hạn, bằng cách đưa các đột biến vào trong ADN mã hóa các vùng biến đổi đã nêu ở trên, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các biến thể như vậy bao gồm, chẳng hạn, thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc xen các gốc trong trình tự axit amin của kháng thể. Vị trí cải biến trong trình tự axit amin của kháng thể có thể là trong vùng không đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể, miễn là nó có hoạt tính tương đương với kháng thể trước khi cải biến, hoặc có thể còn nằm trong vùng biến đổi (vùng khung (framework region, FR) và CDR). Các cải biến đối với các axit amin khác ngoài CDR thường được thực hiện đối với FR vì chúng được cho là có tác động tương đối nhỏ lên khả năng phản ứng với kháng nguyên. Tuy nhiên, đã biết được rằng hiện tại các phương pháp cải biến các axit amin của các CDR và sàng lọc các kháng thể có ái

lực gia tăng đối với các kháng nguyên là có sẵn (PNAS, 102: 8466-8471 (2005), Protein Engineering, Design & Selection, 21: 485-493 (2008), Công bố đơn quốc tế số WO2002/051870, J. Biol. Chem., 280: 24880-24887 (2005), Protein Engineering, Design & Selection, 21: 345-351 (2008), MAbs, Mar-Apr; 6(2): 437-45 (2014)). Ngoài ra, bằng cách sử dụng hệ thống hóa học tính toán tích hợp (như Môi trường hoạt động phân tử (Molecular Operating Environment) được sản xuất bởi CCG ở Canada), có thể mô hình hóa các kháng thể có ái lực gia tăng đối với các kháng nguyên (xem <http://www.rsi.co.jp/kagaku/cs/ccg/products/application/protein.html>). Hơn nữa, như được mô tả trong Protein Eng Des Sel. 2010 Aug; 23(8): 643-51, có một ví dụ đã biết trong đó về mặt ái lực đối với các kháng nguyên, CDR1 của vùng biến đổi của chuỗi nặng và CDR3 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ không liên quan. Tương tự, có báo cáo trong Molecular Immunology 44: 1075-1084 (2007) rằng trong hầu hết các kháng thể, CDR2 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ không liên quan đến ái lực đối với kháng nguyên. Theo cách này, xét về ái lực của kháng thể đối với các kháng nguyên, không phải tất cả CDR1 đến 3 của cả vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ đều cần thiết thể hiện hoạt tính tương đương. Trên thực tế, các ví dụ trong đó ái lực đối với các kháng nguyên được duy trì bằng cách có ít nhất một CDR của kháng thể ban đầu đã được báo cáo trong Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jul 18; 307(1): 198-205, J Mol Biol. 2004 Jul 9; 340(3): 525-42, và J Mol Biol. 2003 Aug 29; 331(5): 1109-20.

Liên quan đến kháng thể của sáng chế, số lượng của các axit amin được cải biến trong vùng biến đổi tốt hơn là trong vòng 10 axit amin, tốt hơn nữa là trong vòng 5 axit amin, và tốt hơn nữa là trong vòng 3 axit amin (chẳng hạn, trong vòng 2 axit amin, hoặc 1 axit amin). Hơn nữa, tất cả các biến thể như vậy tốt hơn là được tạo ra trong các vùng khác ngoài CDR, nghĩa là trong FR, từ quan điểm tối thiểu hóa tác động lên sự gắn kết với kháng nguyên. Ngoài ra, số lượng của các axit amin được cải biến trong CDR tốt hơn là trong vòng 5 axit amin, và tốt hơn nữa là trong vòng 3 axit amin (chẳng hạn, trong vòng 2 axit amin, hoặc 1 axit amin).

Sự cải biến của các axit amin tốt hơn là thay thế bảo toàn. Theo sáng chế, “thay thế bảo toàn” dùng để chỉ sự thay thế bằng một gốc axit amin khác tương tự (có mạch nhánh tương đương về mặt hóa học). Các nhóm của các gốc axit amin có các mạch nhánh tương tự về mặt hóa học là đã biết trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc về. Chẳng hạn, chúng có thể được phân loại là các axit amin có tính axit (axit aspartic và axit glutamic), các axit amin có tính bazơ (lysin, arginin, và histidin), và các axit amin trung tính, nghĩa là các axit amin có các mạch nhánh hydrocacbon (glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, và prolin), các axit amin có các nhóm hydroxyl (serin và threonin), các axit amin chứa lưu huỳnh (xystein và metionin), các axit amin có các nhóm amit (asparagin và glutamin), các axit amin có nhóm imino (prolin), và các axit amin có các nhóm thơm (phenylalanin, tyrosin, và tryptophan).

Ngoài ra, liên quan đến trình tự axit amin sau khi cải biến, các kháng thể của sáng chế còn bao gồm kháng thể có vùng biến đổi chứa trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất ở mức trình tự axit amin lớn hơn hoặc bằng 80% với trình tự axit amin đặc hiệu đã nêu ở trên, miễn là nó có hoạt tính tương đương với kháng thể trước khi cải biến. Độ tương đồng hoặc độ đồng nhất như vậy có thể ít nhất bằng 80%, nhưng tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng 85%, tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 90%, và tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 95% (chẳng hạn, lớn hơn hoặc bằng 96%, lớn hơn hoặc bằng 97%, lớn hơn hoặc bằng 98%, hoặc lớn hơn hoặc bằng 99%). Lưu ý rằng các cải biến trong vùng biến đổi của các kháng thể như vậy tốt hơn là được thực hiện trong các vùng khác ngoài CDR, nghĩa là trong FR, từ quan điểm tối thiểu hóa tác động lên sự gắn kết với kháng nguyên. Ngoài ra, “độ đồng nhất” có nghĩa là tỷ lệ của các loại axit amin giống nhau giữa các trình tự axit amin được so sánh, và “độ tương đồng” có nghĩa là tổng của tỷ lệ của các axit amin tương tự và tỷ lệ của các axit amin giống hệt nhau. Độ tương đồng hoặc độ đồng nhất trình tự có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình BLASTP (mức axit amin) (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410, 1990). Chương trình này được dựa trên thuật toán BLAST bởi Karlin và Altschul (Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 87: 2264-2268, 1990; và Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877, 1993). Khi phân tích các trình tự axit amin bằng BLASTP, các thông số có thể được thiết lập, chẳng hạn, điểm = 50 và độ dài từ = 3. Ngoài ra, các trình tự axit amin có thể được phân tích bằng cách sử dụng chương trình Gapped BLAST như được mô tả bởi Altschul và các đồng tác giả (Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997). Khi sử dụng các chương trình BLAST và Gapped BLAST, các thông số mặc định của mỗi chương trình có thể được sử dụng. Các cách tiến hành cụ thể cho các phương pháp phân tích này là đã biết.

Hơn nữa, “có hoạt tính tương đương” có nghĩa là, chẳng hạn, sự gắn kết với kháng nguyên là tương đương (chẳng hạn, lớn hơn hoặc bằng 70%, tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng 80%, tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 90%) với kháng thể đích (chẳng hạn, KG2032, KG2053, KG1982, KG19130, KG19214, KG19833, aAML191870, aAML191872, hoặc KG19122).

Sự cải biến kháng thể của sáng chế có thể bao gồm, chẳng hạn, các cải biến đối với các quy trình sau dịch mã của kháng thể, như thay đổi số lượng hoặc vị trí của các vị trí glycosyl hóa. Điều này có thể, chẳng hạn, gia tăng hoạt tính ADCC của kháng thể. Quá trình glycosyl hóa kháng thể thường liên quan đến liên kết N hoặc liên kết O. Quá trình glycosyl hóa kháng thể phần lớn phụ thuộc vào tế bào chủ được sử dụng để biểu hiện kháng thể. Các cải biến đối với kiểu glycosyl hóa có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết, như đưa vào hoặc làm mất đi các enzym đặc hiệu liên quan đến quá trình sản xuất đường (công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2008-113663, Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5047335, Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5510261, Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5278299, và công bố đơn quốc tế số WO99/54342). Hơn nữa, theo sáng chế, quá trình loại amit của axit amin hoặc axit amin liền kề với axit amin đã được loại amit có thể được ức chế bằng cách thay thế bằng một axit amin khác để tăng độ ổn định của kháng thể hoặc cho các mục đích khác. Cũng có

thể thay thế axit glutamic bằng một axit amin khác để tăng độ ổn định của kháng thể. Sáng chế còn cung cấp các kháng thể được làm ổn định như vậy.

Theo sáng chế, “kháng thể khảm” dùng để chỉ kháng thể được hình thành bằng cách gắn kết vùng biến đổi của một kháng thể nhất định với vùng không đổi của một kháng thể khác. Chẳng hạn, kháng thể khảm có thể thu được bằng cách tạo miễn dịch chuột nhất bằng kháng nguyên, tách ra phần biến đổi (vùng biến đổi) của kháng thể gắn kết với kháng nguyên từ các gen của kháng thể đơn dòng chuột nhất, gắn kết nó với phần không đổi (vùng không đổi) của gen của kháng thể có nguồn gốc từ tủy xương người, kết hợp nó vào trong véc tơ biểu hiện, và đưa nó vào trong vật chủ để sản xuất (công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số Hei 8-280387, Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 4816397, Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 4816567, và Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5807715).

Thông thường, vùng không đổi của kháng thể khảm được sử dụng là vùng của kháng thể có nguồn gốc từ người. Chẳng hạn, trong chuỗi nặng, C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4, C μ , C δ , C α 1, C α 2, và C ϵ có thể được sử dụng làm các vùng không đổi. Trong chuỗi nhẹ, C κ và C λ có thể được sử dụng làm các vùng không đổi. Các trình tự axit amin của các vùng không đổi này, cũng như trình tự bazơ mã hóa chúng, là đã biết. Hơn nữa, để cải thiện độ ổn định của bản thân kháng thể hoặc để sản xuất ổn định kháng thể, một hoặc một vài axit amin trong vùng không đổi của kháng thể có nguồn gốc từ người có thể được thay thế, được xóa, được bổ sung, và/hoặc được xen.

Theo sáng chế, “kháng thể nhân hóa” dùng để chỉ kháng thể trong đó trình tự di truyền của CDR của kháng thể có nguồn gốc từ động vật không phải là người đã được cấy ghép vào gen kháng thể có nguồn gốc từ người (ghép CDR), và phương pháp sản xuất của nó là đã biết, như PCR kéo dài chồng lặp (chẳng hạn, công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số 239400, công bố đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số 125023, công bố đơn quốc tế số WO90/07861, và công bố đơn

quốc tế số WO96/02576). Vùng biến đổi của kháng thể thường được tạo nên bởi ba CDR được bao quanh bởi bốn FR. CDR là vùng gần như xác định tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể. Trong lúc trình tự axit amin của CDR đa dạng, trình tự axit amin tạo ra FR thường thể hiện độ tương đồng hoặc độ đồng nhất cao ngay cả giữa các kháng thể có tính đặc hiệu gắn kết khác nhau. Do đó, thường nói rằng bằng cách cấy ghép CDR, tính đặc hiệu gắn kết của một kháng thể có thể được chuyển sang một kháng thể khác. Từ quan điểm duy trì các chức năng của CDR, khi cấy ghép CDR có nguồn gốc không phải từ người vào FR người, FR người có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất cao với FR có nguồn gốc từ động vật không phải là người được chọn. Nghĩa là, các axit amin trong CDR không chỉ nhận diện kháng nguyên mà còn phối hợp với các axit amin trong FR gần CDR và cũng tham gia vào việc duy trì cấu trúc vòng của CDR, nên tốt hơn là sử dụng FR người được tạo nên bởi trình tự axit amin có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất cao với trình tự axit amin của FR liền kề với CDR cần được cấy ghép.

Việc tìm kiếm FR người đã biết có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất cao với FR có nguồn gốc từ động vật không phải là người có thể được thực hiện, chẳng hạn, bằng cách sử dụng hệ thống tìm kiếm đặc hiệu kháng thể có sẵn trên internet (<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>). Để phù hợp với trình tự của FR người thu được như vậy, các đột biến có thể được đưa vào trong các trình tự khác ngoài CDR của kháng thể có nguồn gốc không phải từ người. Theo cách khác, nếu gen (ADN bổ trợ) mã hóa trình tự axit amin của FR người thu được bằng cách tìm kiếm là có sẵn, CDR có nguồn gốc không phải từ người có thể được đưa vào trong trình tự đó. Các đột biến có thể được đưa vào bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, như tổng hợp axit nucleic và đột biến đặc hiệu vị trí.

Hoạt tính gắn kết của kháng thể nhân hóa được sản xuất theo cách này với các kháng nguyên có thể được đo và đánh giá định tính hoặc định lượng, do đó có thể lựa chọn một cách thích hợp kháng thể có nguồn gốc từ FR người trong đó, khi được gắn

kết quả CDR, CDR tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên tốt. Nếu cần thiết, các gốc axit amin của FR của kháng thể nhân hóa có thể được thay thế để CDR tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên thích hợp như được mô tả trong các phương pháp như các phương pháp trong Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856, và hơn nữa, bằng cách đo và đánh giá hoạt tính gắn kết của kháng thể đột biến có axit amin được thay thế với các kháng nguyên, có thể chọn trình tự FR đột biến có các đặc tính mong muốn.

Hơn nữa, kháng thể của sáng chế có thể ở dạng kháng thể cạnh tranh trong việc gắn kết với HLA-DR có kháng thể có vùng biến đổi hoặc CDR chứa trình tự axit amin đặc hiệu đã nêu ở trên hoặc biến thể của nó. Nói cách khác, kháng thể có thể ở dạng kháng thể gắn kết với epitop thể hiện các đặc tính gắn kết với kháng thể có vùng biến đổi hoặc CDR chứa trình tự axit amin đặc hiệu đã nêu ở trên hoặc biến thể của nó.

Theo sáng chế, thuật ngữ “epitop” dùng để chỉ yếu tố xác định kháng nguyên có mặt trong kháng nguyên, nghĩa là, vị trí trên kháng nguyên mà miền gắn kết kháng nguyên trong kháng thể gắn kết vào. Do đó, epitop theo sáng chế có thể là polypeptit được tạo nên bởi nhiều axit amin liên tục trong trình tự axit amin gốc (epitop mạch thẳng) hoặc polypeptit được hình thành bởi các axit amin không liên tiếp trong trình tự axit amin gốc lại gần nhau do cấu trúc ba chiều như peptit hoặc protein gấp nếp (epitop không liên tiếp hoặc epitop cấu trúc). Epitop như vậy thường được tạo nên bởi ít nhất 3 (chẳng hạn, 4) axit amin, và phổ biến nhất là được tạo nên bởi ít nhất 5 (chẳng hạn, 6-20, 7-15, 8-10) axit amin.

Ngoài ra, nếu thu được kháng thể, người có kỹ năng trong lĩnh vực này có thể xác định vùng peptit (epitop) trên kháng nguyên tại đó kháng thể thể hiện khả năng phản ứng và có thể chuẩn bị các kháng thể khác gắn kết với vùng peptit đó. Hơn nữa, liệu hai kháng thể có gắn kết với cùng một epitop hoặc các epitop chồng lặp về mặt không gian hay không có thể được xác định bằng xét nghiệm cạnh tranh.

Theo sáng chế, “đoạn chức năng” của kháng thể dùng để chỉ phần (đoạn riêng phần) của kháng thể nhận diện HLA-DR. Cụ thể, đoạn này bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, đoạn biến đổi (Fv), Fv gắn kết disulfit, đoạn biến đổi của chuỗi đơn (chuỗi đơn Fv, scFv), sc(Fv)₂, và các polyme của chúng, trong số các loại khác.

Ở đây, “Fab” dùng để chỉ đoạn liên kết kháng nguyên đơn hóa trị của globulin miễn dịch được tạo nên bởi một chuỗi nhẹ và một phần của chuỗi nặng. Nó có thể thu được bằng cách tiêu hóa kháng thể bằng papain hoặc bằng các phương pháp tái tổ hợp. “Fab” khác với Fab ở chỗ nó bao gồm một hoặc nhiều xystein trong vùng bản lề của kháng thể và một số lượng nhỏ các gốc được bổ sung ở đầu tận cùng carboxy của miền CH1 của chuỗi nặng. “F(ab')₂” dùng để chỉ đoạn liên kết kháng nguyên hóa trị hai của globulin miễn dịch được tạo nên bởi các phần của cả hai chuỗi nhẹ và cả hai chuỗi nặng.

“Đoạn biến đổi (variable fragment, Fv)” là đoạn kháng thể nhỏ nhất có vị trí nhận diện và gắn kết kháng nguyên. Fv là một dime trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được gắn kết mạnh bởi các liên kết không cộng hóa trị. “Đoạn biến đổi của chuỗi đơn (single-chain Fv, scFv)” chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể, và các vùng này tồn tại trên chuỗi polypeptit đơn. “sc(Fv)₂” được tạo nên bởi hai vùng biến đổi của chuỗi nặng và hai vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được gắn kết với nhau thành chuỗi đơn bằng các đoạn liên kết hoặc tương tự.

Kháng thể của sáng chế có thể được sản xuất bằng phương pháp tế bào lai và có thể còn được sản xuất bằng phương pháp ADN tái tổ hợp. Đối với phương pháp tế bào lai, phương pháp đại diện là phương pháp của Köhler và Milstein (Köhler & Milstein, Nature, 256: 495 (1975)). Các tế bào sản sinh kháng thể được sử dụng trong bước dung hợp tế bào trong phương pháp này là các tế bào lá lách, các tế bào hạch bạch huyết, các tế bào bạch cầu máu ngoại vi, và các tế bào khác của các động vật (như chuột nhắt, chuột đồng, chuột hamster, thỏ, khỉ, và dê) được gây miễn dịch bằng kháng nguyên (như HLA-

DR, các peptit riêng phần của nó, các protein thu được bằng cách dung hợp chúng với protein Fc hoặc tương tự, hoặc các tế bào biểu hiện chúng). Cũng có thể sử dụng các tế bào sản sinh kháng thể thu được bằng cách hoạt hóa kháng nguyên trên các tế bào ở trên hoặc các lympho bào được phân lập trước từ các động vật không được gây miễn dịch trong môi trường nuôi cấy. Các dòng tế bào đã biết khác có thể được sử dụng là các tế bào u tủy. Các tế bào sản sinh kháng thể và các tế bào u tủy có thể có nguồn gốc từ các loài động vật khác nhau miễn là chúng có thể dung hợp, nhưng tốt hơn là, chúng có nguồn gốc từ cùng một loài động vật. Tế bào lai có thể được sản xuất bằng cách dung hợp tế bào giữa các tế bào lá lách thu được từ chuột nhắt được gây miễn dịch bằng kháng nguyên và các tế bào u tủy chuột nhắt, và sau đó, bằng cách sàng lọc, có thể thu được tế bào lai tạo ra các kháng thể đơn dòng nhận diện HLA-DR. Các kháng thể đơn dòng nhận diện HLA-DR có thể thu được bằng cách nuôi cấy tế bào lai hoặc từ dịch cổ trướng của động vật có vú mà tế bào lai đã được sử dụng.

Phương pháp ADN tái tổ hợp là kỹ thuật để tách dòng ADN mã hóa kháng thể của sáng chế từ tế bào lai, các tế bào B, hoặc tương tự, kết hợp nó vào trong vector thích hợp, đưa nó vào trong tế bào chủ (như các dòng tế bào của động vật có vú như các tế bào HEK, E. coli, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, và các tế bào thực vật), và tạo ra kháng thể của sáng chế dưới dạng kháng thể tái tổ hợp (chẳng hạn, P. J. Delves, *Antibody Production: Essential Techniques*, 1997; WILEY, P. Shepherd and C. Dean *Monoclonal Antibodies*, 2000, OXFORD UNIVERSITY PRESS; and Vandamme A. M. et al., *Eur. J. Biochem.* 192: 767-775 (1990)). Trong quá trình biểu hiện của ADN mã hóa kháng thể của sáng chế, ADN mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ có thể được kết hợp một cách riêng rẽ vào trong các vector biểu hiện để biến đổi các tế bào chủ, hoặc ADN mã hóa cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được kết hợp vào trong một vector biểu hiện duy nhất để biến đổi các tế bào chủ (xem công bố đơn quốc tế số WO94/11523). Kháng thể của sáng chế có thể thu được ở dạng gần như tinh khiết và đồng đều bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ và tách và tinh chế nó từ trong các tế bào chủ hoặc từ dịch

nuôi cấy. Quá trình tách và tinh chế kháng thể có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp thường được sử dụng để tinh chế polypeptit. Bằng cách sử dụng các kỹ thuật tạo ra động vật chuyển gen, nếu động vật chuyển gen (như bò, dê, cừu hoặc lợn) chứa gen kháng thể được tạo ra, các kháng thể đơn dòng có nguồn gốc từ gen kháng thể có thể còn thu được với các lượng lớn từ sữa của động vật chuyển gen đó.

Sáng chế có thể cũng đề xuất ADN mã hóa kháng thể của sáng chế, vectơ chứa ADN, tế bào chủ có ADN, và phương pháp sản xuất các kháng thể bao gồm các bước nuôi cấy tế bào chủ và thu hồi các kháng thể.

Thụ thể kháng nguyên khảm

Như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả sau đây, đích của kháng thể của sáng chế, HLA-DR, trở thành kháng nguyên bề mặt tế bào đặc hiệu với bệnh ung thư máu. Ngoài ra, vùng biến đổi của kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng trong thụ thể kháng nguyên khảm (CAR) và các tế bào T biểu hiện nó (còn được gọi là CAR-T). Do đó, sáng chế có thể cũng có thể ở dạng CAR mà bao gồm kháng thể hoặc vùng biến đổi của kháng thể gắn kết với HLA-DR, miền xuyên màng, và miền truyền tín hiệu nội bào.

Theo sáng chế, “thụ thể kháng nguyên khảm (CAR)” có nghĩa là protein khảm trong đó vùng gắn kết với HLA-DR vùng ngoại bào, miền xuyên màng, và miền truyền tín hiệu nội bào được sắp xếp theo thứ tự đó từ phía đầu tận cùng N, được nối trực tiếp hoặc gián tiếp.

Theo sáng chế, “vùng gắn kết với HLA-DR (miền gắn kết kháng nguyên)” có thể, chẳng hạn, sử dụng kháng thể đã nêu ở trên hoặc đoạn chức năng của nó, nhưng scFv thường được sử dụng trong CAR.

Như đã đề cập đến ở trên, “scFv” là cấu trúc trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng (globulin miễn dịch) được gắn kết nhờ đoạn liên kết, và giữ lại được khả năng gắn kết với kháng nguyên. Trong

scFv, thứ tự từ phía đầu tận cùng N có thể là vùng biến đổi của chuỗi nhẹ, đoạn liên kết, và vùng biến đổi của chuỗi nặng, hoặc nó có thể là vùng biến đổi của chuỗi nặng, đoạn liên kết, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Là “đoạn liên kết” trong scFv, chẳng hạn, đoạn liên kết peptit có thể được sử dụng. Chiều dài của đoạn liên kết không bị giới hạn cụ thể. Chẳng hạn, đoạn liên kết có số lượng của các axit amin nằm trong khoảng từ 5 đến 25 có thể được sử dụng. Chiều dài của đoạn liên kết tốt hơn là nằm trong khoảng từ 8 đến 25 axit amin, và tốt hơn nữa là từ 15 đến 20 axit amin. Các ví dụ thích hợp về các đoạn liên kết peptit bao gồm các đoạn liên kết peptit chứa glyxin hoặc glyxin và serin (như đoạn liên kết GGS, đoạn liên kết GS, đoạn liên kết GGG, và đoạn liên kết Whitlow/218). Các axit amin mà tạo thành các đoạn liên kết này, glyxin và serin, có lợi thế là chúng có kích thước nhỏ và khó tạo ra cấu trúc bậc cao hơn trong đoạn liên kết.

Đối với kháng thể đơn dòng tạo ra cơ sở của scFv, không có giới hạn cụ thể, nhưng các ví dụ về nó bao gồm các kháng thể có nguồn gốc từ động vật không phải là người đã nêu ở trên, các kháng thể người, và các kháng thể nhân hóa. Các ví dụ thích hợp về chúng cũng như đã đề cập đến ở trên.

Theo sáng chế, thuật ngữ “miền xuyên màng” không bị giới hạn cụ thể miễn là nó dùng để chỉ polypeptit có chức năng xuyên qua màng tế bào và có thể neo CAR vào màng tế bào. Các protein từ đó polypeptit mang miền xuyên màng có nguồn gốc bao gồm, chẳng hạn, CD28, CD3 ζ , CD3 ϵ , 4-1BB, CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD8 β , CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, GITR, và các chuỗi α và β của thụ thể tế bào T.

Theo sáng chế, thuật ngữ “miền truyền tín hiệu nội bào” dùng để chỉ khu vực nằm bên trong tế bào khi CAR được định vị trên màng tế bào, và khu vực này có khả năng truyền các tín hiệu cần thiết cho chức năng hiệu ứng của các tế bào miễn dịch, nghĩa là, khi miền gắn kết kháng nguyên gắn kết với kháng nguyên (HLA-DR), nó có

thể truyền tín hiệu (còn được gọi là tín hiệu chính) cần thiết cho sự hoạt hóa các tế bào miễn dịch. Các ví dụ về các miền truyền tín hiệu nội bào như vậy thường bao gồm các miền chỉ có miền truyền tín hiệu hoạt hóa, như thụ thể tế bào T (T-cell receptor, TCR) và phức chất CD3 (CAR thế hệ thứ nhất), các vùng, ngoài miền truyền tín hiệu hoạt hóa, có miền truyền tín hiệu đồng kích thích có nguồn gốc từ các phân tử đồng kích thích (như miền nội bào của CD28 hoặc 4-1BB) (CAR thế hệ thứ hai), và các vùng, ngoài miền truyền tín hiệu hoạt hóa, có nhiều miền truyền tín hiệu đồng kích thích (như các miền nội bào của CD28 và 4-1BB) (CAR thế hệ thứ ba). Còn có các loại bao gồm các miền nội bào của CD79A và CD40 (xem Mol Ther 2021 Sep 1; 29(9): 2677-2690).

“Miền truyền tín hiệu nội bào,” như đã đề cập đến ở trên, chỉ cần có khả năng truyền tín hiệu chính, và có thể sử dụng miền truyền tín hiệu hoạt hóa của các protein tham gia vào việc truyền tín hiệu như vậy. Đã biết được rằng motif hoạt hóa trên cơ sở thụ thể miễn dịch tyrosin (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) tham gia vào quá trình truyền tín hiệu chính. Các protein có ITAM bao gồm, chẳng hạn, CD3 ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, DAP10, và DAP12.

Theo sáng chế, số lượng của các miền truyền tín hiệu nội bào được bao gồm trong CAR không bị giới hạn ở 1 và có thể bao gồm nhiều miền truyền tín hiệu nội bào (chẳng hạn, 1 đến 5, 1 đến 3, hoặc 1 hoặc 2 yếu tố truyền tín hiệu). Trong trường hợp này, nhiều miền truyền tín hiệu nội bào được bao gồm có thể giống hoặc khác nhau.

CAR của sáng chế, ngoài miền gắn kết kháng nguyên, miền xuyên màng, và miền truyền tín hiệu nội bào đã nêu ở trên, có thể còn bao gồm các miền khác. Các ví dụ về các miền khác bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các miền truyền đồng kích thích, các trình tự đoạn đệm, và các peptit tín hiệu.

Các phân tử đồng kích thích được biểu hiện trên các tế bào T là đã biết để hỗ trợ hoạt hóa các tế bào T bằng cách truyền tín hiệu đồng kích thích bên trong tế bào thông

qua gắn kết với các phối tử, đặc hiệu với mỗi phân tử đồng kích thích, được biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên (truyền tín hiệu thứ cấp). Theo sáng chế, thuật ngữ “miền truyền đồng kích thích” dùng để chỉ miền nội bào tham gia vào việc truyền tín hiệu đồng kích thích của các phân tử đồng kích thích như vậy. Các ví dụ về các phân tử đồng kích thích bao gồm CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), ICOS, CD2, CD4, CD5, CD8 α , CD8 β , CD154, v.v.. CAR của sáng chế có thể bao gồm miền truyền đồng kích thích của các phân tử đồng kích thích này.

Số lượng của các miền truyền đồng kích thích mà CAR của sáng chế có thể chứa không bị giới hạn ở một và có thể là nhiều. CAR của sáng chế có thể bao gồm, chẳng hạn, từ 1 đến 5, từ 1 đến 3, hoặc 1 hoặc 2 miền truyền đồng kích thích. Khi CAR của sáng chế chứa nhiều miền truyền tín hiệu đồng kích thích, các miền này có thể giống hoặc khác nhau.

Theo sáng chế, thuật ngữ “đoạn đệm” dùng để chỉ trình tự kết nối giữa mỗi vùng, v.v.. Không có giới hạn cụ thể miền là nó không ức chế chức năng của mỗi vùng, và không có giới hạn cụ thể về số lượng của các axit amin. Tuy nhiên, số lượng này thường giữa 1 và 500 axit amin, tốt hơn là từ 5 đến 300 axit amin, và tốt hơn nữa là từ 10 đến 100 axit amin.

Trong lúc trình tự của đoạn đệm không bị giới hạn cụ thể, đoạn đệm được sử dụng có thể là, chẳng hạn, phần bản lề của IgG, tốt hơn là IgG người (như kiểu phụ IgG1 hoặc IgG4), hoặc một phần của nó, phần bản lề và một phần của CH2, hoặc một phần của yếu tố (chẳng hạn, CD28) được sử dụng cho miền xuyên màng. Biết trước được rằng bằng cách sử dụng trình tự của phần bản lề hoặc một phần của nó sẽ tạo ra một đoạn đệm linh hoạt.

Theo sáng chế, thuật ngữ “peptit tín hiệu” dùng để chỉ peptit để thúc đẩy tiết CAR hoặc hướng sự định vị của nó đến màng tế bào và còn được gọi là trình tự dẫn đầu. Tín hiệu peptit có thể thường được gắn một cách trực tiếp hoặc gián tiếp vào đầu tận cùng

N của miền gắn kết kháng nguyên. Tùy ý, tín hiệu peptit có thể được tách ra từ miền gắn kết kháng nguyên trong quá trình xử lý tế bào và định vị CAR vào màng tế bào. Các ví dụ về các tín hiệu peptit như vậy bao gồm các tín hiệu peptit từ globulin miễn dịch (như IgK), thụ thể GM-CSF người, chuỗi alpha và beta của thụ thể tế bào T, CD8 α , CD8 β , CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, GITR, v.v..

Ở trên, các ví dụ về mỗi vùng và tương tự trong CAR của sáng chế đã được mô tả. Các trình tự axit amin cụ thể liên quan đến các vùng này và tương tự có thể thu được một cách thích hợp bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này bằng cách tìm kiếm các tài liệu chuyên ngành hoặc các cơ sở dữ liệu đã biết như NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>). Hơn nữa, các trình tự cụ thể cũng được bộc lộ trong danh sách trình tự của sáng chế. Bên cạnh các trình tự axit amin điển hình này (chẳng hạn, các trình tự tham chiếu NCBI), các vùng và tương tự theo sáng chế có thể bao gồm các biến thể và các đồng đẳng của các trình tự axit amin điển hình này miễn là chúng duy trì các chức năng của các vùng tương ứng. Các biến thể và các đồng đẳng như vậy thường có độ tương đồng hoặc độ đồng nhất cao với các trình tự axit amin điển hình. Độ tương đồng hoặc độ đồng nhất cao thường lớn hơn hoặc bằng 60%, tốt hơn là lớn hơn hoặc bằng 70%, tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 80%, và tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 90% (chẳng hạn, lớn hơn hoặc bằng 95%, lớn hơn hoặc bằng 96%, lớn hơn hoặc bằng 97%, lớn hơn hoặc bằng 98%, và lớn hơn hoặc bằng 99%).

Hơn nữa, CAR của sáng chế có thể là phân tử được tạo nên bởi một loại polypeptit hoặc có thể là phân tử được tạo nên bởi phức chất của hai hoặc nhiều polypeptit. Ngoài ra, CAR của sáng chế có thể là phân tử được tạo nên bởi polypeptit hoặc phức chất của nó, hoặc có thể là phân tử được hình thành bằng cách kết nối các chất khác (ví dụ như, các chất huỳnh quang, các chất có hoạt tính phóng xạ, và các hạt vô cơ) với polypeptit hoặc phức chất của nó.

CAR của sáng chế có thể được cải biến về mặt hóa học. Polypeptit tạo nên CAR của sáng chế có thể có đầu tận cùng C là nhóm carboxyl (-COOH), carboxylat (-COO-), amit (-CONH₂), hoặc este (-COOR). Ở đây, các ví dụ về R trong este được sử dụng bao gồm các nhóm C1-6 alkyl như metyl, etyl, n-propyl, isopropyl, và n-butyl; các nhóm C3-8 xycloalkyl như xyclopentyl và xyclohexyl; các nhóm C6-12 aryl như phenyl và α -naphthyl; các nhóm phenyl-C1-2 alkyl như benzyl và phenetyl; các nhóm α -naphthyl-C1-2 alkyl như α -naphthylmetyl và các nhóm C7-14 aralkyl khác; và các nhóm pivaloyloxymetyl. Polypeptit tạo nên CAR của sáng chế có thể có nhóm carboxyl của nó (hoặc carboxylat) khác với đầu tận cùng C đã được amit hóa hoặc este hóa. Trong trường hợp này, các este như các este đã được nêu đối với đầu tận cùng C được sử dụng. Hơn nữa, polypeptit tạo nên CAR của sáng chế còn bao gồm các nhóm trong đó nhóm amin của gốc axit amin có đầu tận cùng N được bảo vệ bằng nhóm bảo vệ (chẳng hạn, nhóm formyl, nhóm axetyl, và các nhóm C1-6 axyl khác như các nhóm C1-6 alkanoyl), các nhóm trong đó gốc glutamin đầu tận cùng N, mà có thể được tách ra và được sản xuất in vivo, đã trải qua quá trình oxy hóa pyroglutamic, và các nhóm trong đó các nhóm thế trên mạch nhánh của các axit amin trong phân tử (như -OH, -SH, các nhóm amin, các nhóm imidazol, các nhóm indol, hoặc các nhóm guanidino) được bảo vệ một cách thích hợp bởi các nhóm bảo vệ (chẳng hạn, nhóm formyl, nhóm axetyl, và các nhóm C1-6 axyl khác kiểu các nhóm C1-6 alkanoyl).

Hơn nữa, CAR của sáng chế có thể có các protein chức năng bổ sung. Không có giới hạn cụ thể về các protein chức năng bổ sung, và chúng được chọn một cách thích hợp theo chức năng cần được truyền cho CAR của sáng chế. Chẳng hạn, các protein chức năng được sử dụng để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế và phát hiện CAR bao gồm Myc tag, His tag, HA tag, FLAG tag (nhãn hiệu hàng hóa đã được đăng ký, Sigma-Aldrich), các tag protein huỳnh quang (như GFP).

Thụ thể kháng nguyên khảm của sáng chế có thể còn ở dạng muối được dụng với axit hoặc bazơ. Miễn là muối này là muối được dụng, nó không bị giới hạn cụ thể và có thể sử dụng hoặc muối axit hoặc bazơ. Các ví dụ về các muối axit bao gồm các muối axit vô cơ như hydroclorua, hydrobromua, sulfat, nitrat, và phosphat; các muối axit hữu cơ như axetat, propionat, tartrat, fumarat, maleat, malat, xitrat, metansulfonat, p-toluensulfonat; và các muối axit amin như aspartat và glutamat. Ngoài ra, các ví dụ về các muối bazơ bao gồm các muối kim loại kiềm như các muối natri và các muối kali; các muối kim loại kiềm thổ như các muối canxi và các muối magie. Thụ thể kháng nguyên khảm của sáng chế có thể còn ở dạng solvat. Các dung môi không bị giới hạn đặc biệt miễn là chúng được dụng, và các ví dụ về nó bao gồm nước, etanol, glyxerol, và axit acetic.

Hơn nữa, đã có một số báo cáo về các thí nghiệm và nghiên cứu lâm sàng sử dụng CAR (như Rossig C, et al., Mol Ther 10: 5-18, 2004; Dotti G, et al., Hum Gene Ther 20: 1229-1239, 2009; Ngo MC, et al., Hum Mol Genet 20(R1): R93-99, 2011; Ahmed N, et al., Mol Ther 17: 1779-1787, 2009; Pule MA, et al., Nat Med 14: 1264-1270, 2008; Louis CU, et al., Blood 118: 6050-6056, 2011; Kochenderfer JN, et al., Blood 116: 4099-4102, 2010; Kochenderfer JN, et al., Blood 119: 2709-2720, 2012; Porter DL, et al., N Engl J Med 365: 725-733, 2011; Kalos M, et al., Sci Transl Med 3: 95ra73, 2011; Brentjens RJ, et al., Blood 118: 4817-4828, 2011; Brentjens RJ, et al., Sci Transl Med 5: 177 ra38, 2013), và các báo cáo này có thể được sử dụng làm cơ sở để xây dựng CAR của sáng chế. Ngoài ra, nhờ các trình tự cụ thể được cung cấp trong các ví dụ được mô tả sau đây, CAR của sáng chế có thể được xây dựng bằng cách tham khảo chúng.

Nucleotit mã hóa thụ thể kháng nguyên khảm

Sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa CAR của sáng chế. Thông tin về các trình tự nucleotit mã hóa các miền gắn kết kháng nguyên, như scFv, có thể thu được, chẳng

hạn, bằng cách phân tích các trình tự nucleotit của tế bào lai tạo ra các kháng thể đơn dòng mà chúng dựa trên.

Ngoài ra, các trình tự nucleotit cụ thể mã hóa các vùng khác ngoài miền gắn kết kháng nguyên trong CAR của sáng chế có thể thu được một cách thích hợp bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này bằng cách tìm kiếm các tài liệu chuyên ngành hoặc các cơ sở dữ liệu đã biết như NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>). Hơn nữa, các trình tự nucleotit mã hóa các vùng đã nêu ở trên không bị giới hạn ở các trình tự đã biết, và các trình tự nucleotit bất kỳ mã hóa các vùng đó và tương tự có thể được sử dụng. Do sự thoái hóa của mã di truyền, nhiều codon tồn tại cho một axit amin. Do đó, nhiều trình tự nucleotit tồn tại mã hóa cùng một trình tự axit amin. Trình tự nucleotit của polynucleotit của sáng chế có thể là trình tự bất kỳ trong số nhiều trình tự nucleotit tạo ra từ sự thoái hóa của mã di truyền miễn là nó mã hóa CAR của sáng chế. Ngoài ra, để tối ưu sự biểu hiện trong các tế bào biểu hiện CAR, các codon được chọn để mã hóa các axit amin trong các trình tự nucleotit mã hóa mỗi vùng trong CAR của sáng chế có thể được cải biến.

Hơn nữa, người có kỹ năng trong lĩnh vực này có thể tạo ra các polynucleotit mã hóa mỗi vùng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết dựa trên thông tin trình tự nucleotit như vậy, như các phương pháp tổng hợp hóa học (như phương pháp phosphoramidit) hoặc các phương pháp khuếch đại PCR. Hơn nữa, các polynucleotit thu được như vậy, mã hóa mỗi vùng, có thể được nối trực tiếp hoặc thông qua đoạn đệm để tạo ra polynucleotit mã hóa CAR của sáng chế. Việc kết nối các polynucleotit mã hóa mỗi vùng có thể được thực hiện, như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả sau đây, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết như phương pháp PCR kéo dài chồng lặp.

Vectơ chứa polynucleotit mã hóa thụ thể kháng nguyên khảm

Sáng chế đề xuất vectơ chứa polynucleotit đã nêu ở trên. Vectơ của sáng chế có thể là mạch thẳng hoặc mạch vòng, và các ví dụ về nó bao gồm các vectơ virus, các

vector plasmit, các vector dạng episome, các vector nhiễm sắc thể nhân tạo, và các vector transposon.

Các ví dụ về các vector virus bao gồm các vector retrovirus như lentivirus, các vector Sendai virus, các vector adenovirus, các vector virus gắn kết với adeno, các vector herpes virus, các vector vaccinia virus, các vector poxvirus, các vector poliovirus, các vector Sindbis virus, các vector rabies virus, các vector paramyxovirus, và các vector orthomyxovirus.

Đối với các vector plasmit, chẳng hạn, các vector plasmit biểu hiện tế bào động vật như pcDNA3.1, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, và pcDNA1/Neo được đề cập đến.

Vector dạng episome là vector có khả năng sao chép độc lập bên ngoài nhiễm sắc thể. Các phương pháp cụ thể sử dụng các vector dạng episome là đã biết (xem Yu et al., Science, 2009, 324, pp. 797 - 801). Các ví dụ về các vector dạng episome bao gồm các vector chứa các trình tự cần thiết để tự sao chép có nguồn gốc từ EBV, SV40, và tương tự làm các yếu tố vector. Là các yếu tố vector cần thiết cho sự tự sao chép, cụ thể, chúng là các nguồn sao chép và gen mã hóa các protein gắn kết với nguồn sao chép để kiểm soát quá trình sao chép, chẳng hạn, trong EBV, nguồn sao chép oriP và gen EBNA-1, và trong SV40, nguồn sao chép ori và gen SV40LT được đề cập đến.

Các ví dụ về các vector nhiễm sắc thể nhân tạo bao gồm các vector nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (Yeast artificial chromosome, YAC), các vector nhiễm sắc thể nhân tạo của vi khuẩn (Bacterial artificial chromosome, BAC), và các vector nhiễm sắc thể nhân tạo có nguồn gốc từ P1 (P1-derived artificial chromosome, PAC).

Trong các vector này, ngay cả trong các tế bào có sự tăng sinh chậm, các gen có thể được đưa vào với hiệu quả cao. Ngoài ra, từ quan điểm dễ thiết lập các chủng biểu hiện ổn định, các vector retrovirus là được ưu tiên.

Vectơ của sáng chế có thể chứa, ngoài polynucleotit mã hóa CAR đã nêu ở trên, các trình tự kiểm soát biểu hiện như các trình tự gen khởi đầu, trình tự tăng cường, các tín hiệu bổ sung poly(A), và các trình tự kết thúc, các nguồn sao chép cũng như các trình tự nucleotit mã hóa các protein gắn kết với các nguồn sao chép để kiểm soát quá trình sao chép, và các trình tự nucleotit mã hóa các protein khác.

Theo cách có thể thực hiện được, bằng cách đặt polynucleotit mã hóa CAR đã nêu ở trên hoặc nucleotit mã hóa các protein khác được mô tả sau đây xuôi dòng gen khởi đầu, thì có thể phiên mã một cách có hiệu quả mỗi polynucleotit. Các ví dụ về “các gen khởi đầu” như vậy bao gồm gen khởi đầu CMV (cytomegalovirus), gen khởi đầu $SR\alpha$, gen khởi đầu sớm SV40, LTR retrovirus, gen khởi đầu RSV (virus Rous sarcoma), gen khởi đầu HSV-TK (thymidin kinaza của virus herpes), gen khởi đầu EF1 α , gen khởi đầu metanlothionein, gen khởi đầu sốc nhiệt, và các loại khác.

Các ví dụ về “các nucleotit mã hóa các protein khác” bao gồm các gen mã hóa các gen protein huỳnh quang, các gen thông báo, các gen kháng thuốc và các gen đánh dấu khác, và các phân tử tham gia vào quá trình hoạt hóa tế bào T như các cytokin. Ngoài ra, EGFR mà không có vùng nội bào (EGFR bị cắt ngắn, (truncated EGFR, tEGFR), như được thể hiện trong các ví dụ nêu sau đây, có thể được đề cập đến. Hơn nữa, bằng cách sử dụng ADN mã hóa IRES, trình tự 2A peptit (như 2A peptit có nguồn gốc từ *Thossea asigna* (T2A)) hoặc tương tự, trở nên có thể biểu hiện đa xis-tron các protein khác cùng với CAR đã nêu ở trên.

Hơn nữa, trong cơ thể của đối tượng (như bệnh nhân mắc bệnh ung thư máu) mà các tế bào biểu hiện CAR đã được sử dụng, để gây ra một cách thích hợp sự chết tế bào tiền định của các tế bào biểu hiện CAR đã được sử dụng, vectơ của sáng chế có thể chứa “nucleotit mã hóa các protein khác” làm gen tự diệt. Các ví dụ về các gen tự diệt bao gồm thymidin kinaza của virus herpes (HSV-TK) và caspaza 9 có thể cảm ứng (iCasp9). Các thuốc mà hoạt hóa chức năng của các gen như vậy bao gồm ganciclovir đối với

HSV-TK và AP1903, chất cảm ứng hóa học của sự dime hóa (chemical inducer of dimerization, CID), đối với iCasp9 (xem Cooper LJ. et al., *Cytotherapy*. 2006; 8(2): pp. 105 đến 17, Jensen M. C. et al., *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Sep; 16(9): pp. 1245 đến 56, Jones BS., *Front Pharmacol*. 2014 Nov 27; 5: 254., Minagawa K., *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015 May 8; 8(2): pp. 230 đến 49, Bole-Richard E., *Front Pharmacol*. 2015 Aug 25; 6: 174).

Các tế bào biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm

Sáng chế đề xuất các tế bào biểu hiện CAR của sáng chế. Các tế bào của sáng chế có thể thu được bằng cách đưa polynucleotit hoặc vector mã hóa CAR đã nêu ở trên của sáng chế vào trong các tế bào.

“Tế bào” mà polynucleotit hoặc vector của sáng chế được đưa vào tốt hơn là có nguồn gốc từ động vật có vú, như các tế bào có nguồn gốc từ người, hoặc các tế bào có nguồn gốc từ các động vật có vú không phải là người như loài gặm nhấm (như chuột nhắt và chuột đồng), bò, cừu, ngựa, chó, lợn, và khỉ. Loại của tế bào không bị giới hạn cụ thể, và có thể sử dụng dịch cơ thể như máu và tủy xương, hoặc từ mô như lá lách, tuyến ức, và hạch bạch huyết, hoặc các tế bào được thu thập từ khối u hoặc cổ trướng ác tính. Ví dụ được ưu tiên là các tế bào miễn dịch được sử dụng làm các tế bào để biểu hiện CAR.

Các ví dụ về “các tế bào miễn dịch” bao gồm các tế bào T dương tính với CD4 âm tính với CD8, các tế bào T âm tính với CD4 dương tính với CD8, các tế bào T, các tế bào $\alpha\beta$ -T, các tế bào $\gamma\delta$ -T, các tế bào NK, và các tế bào NKT. Các tế bào miễn dịch như vậy bao gồm các tế bào được chuẩn bị từ các tế bào mầm đa năng như các tế bào iPS. Nếu chúng bao gồm các lympho bào hoặc các tế bào tiền thân đã nêu ở trên, các nhóm tế bào khác nhau có thể được sử dụng. Nghĩa là, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) được thu thập từ máu ngoại vi có thể cũng có thể được trích dẫn làm ví dụ về các tế bào miễn dịch.

Trước khi đưa polynucleotit của sáng chế vào, các tế bào để biểu hiện CAR có thể được hoạt hóa. Chẳng hạn, chúng có thể được kích thích bằng kháng thể kháng CD3 và kháng thể kháng CD28 để hoạt hóa các tế bào để biểu hiện CAR. Cụ thể hơn, bằng cách nuôi cấy trong hộp nuôi cấy (như đĩa nuôi cấy) được phủ kháng thể kháng CD3 và kháng thể kháng CD28 trên bề mặt nuôi cấy, việc kích thích có thể được bổ sung bởi kháng thể kháng CD3 và kháng thể kháng CD28. Cũng có thể thực hiện việc kích thích này bằng cách sử dụng các hạt từ được phủ kháng thể kháng CD3 và kháng thể kháng CD28 (chẳng hạn, Dynabeads T-Activator CD3/CD28 được cung cấp bởi VERITAS).

Hơn nữa, như được thể hiện trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế sau đây, để ngăn chặn sự cạn kiệt của các tế bào của sáng chế, chất ức chế tyrosin kinaza có thể được bổ sung vào môi trường trong quá trình sản xuất các tế bào này. Một ví dụ về chất ức chế tyrosin kinaza như vậy là dasatinib.

Để tăng tỷ lệ sống/tỷ lệ tăng sinh của các tế bào, dịch nuôi cấy được bổ sung yếu tố phát triển tế bào T có thể được sử dụng trong quá trình xử lý hoạt hóa. IL-2, IL-15, IL-7, và tương tự có thể được sử dụng làm các yếu tố phát triển tế bào T. Các yếu tố phát triển tế bào T như IL-2, IL-15, IL-7, và tương tự có thể được chuẩn bị theo các phương pháp thông thường. Các sản phẩm có sẵn trên thị trường có thể cũng được sử dụng. Mặc dù việc sử dụng các yếu tố phát triển tế bào T từ các loài động vật không phải là người không bị loại trừ, thông thường, các yếu tố phát triển tế bào T có nguồn gốc từ người (ngay cả khi chúng là loại tái tổ hợp) vẫn được sử dụng.

Thông thường, để sử dụng nó (sử dụng cho đối tượng), các tế bào sau khi đưa vào polynucleotit của sáng chế được tăng sinh. Chẳng hạn, các tế bào đã được đưa vào polynucleotit của sáng chế được nuôi cấy bằng cách sử dụng dịch nuôi cấy được bổ sung yếu tố phát triển tế bào T (và được nuôi cấy nếu cần thiết). Ngoài quá trình nuôi cấy này, có thể thực hiện quá trình xử lý tương tự (hoạt hóa lại) như trong trường hợp hoạt hóa các tế bào biểu hiện CAR.

Hơn nữa, trong quá trình nuôi cấy các tế bào của sáng chế, môi trường được bổ sung huyết thanh (như huyết thanh người hoặc huyết thanh bào thai bò) có thể được sử dụng. Tuy nhiên, bằng cách sử dụng môi trường không chứa huyết thanh, có thể chuẩn bị các tế bào có ưu điểm là độ an toàn cao hơn khi được sử dụng trong lâm sàng và ít có khả năng thể hiện các khác biệt giữa các lô huyết thanh. Khi sử dụng huyết thanh, tốt hơn là sử dụng huyết thanh tự thân, nghĩa là, huyết thanh được thu thập từ đối tượng sẽ được nhận các tế bào của sáng chế.

Hơn nữa, các tế bào của sáng chế có thể là các tế bào trong đó chức năng của các protein ức chế các phản ứng miễn dịch quá mức và tương tự (như các chất kiểm soát miễn dịch) được ức chế. Các ví dụ về các protein như vậy bao gồm Programmed Death 1 (PD-1), PD-L1, PD-L2, CTLA-4, TIM-3, CEACAM (như CEACAM-1, CEACAM-3, và CEACAM-5), LAG-3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 hoặc CD270), KIR, A2aR, MHC nhóm I, MHC nhóm II, và GAL9.

Hơn nữa, tế bào của sáng chế có thể là tế bào trong đó chức năng của TCR nội sinh, HLA, và các protein khác được ức chế để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình cấy ghép dị sinh.

Là phương pháp ức chế các chức năng của protein, có phương pháp bất hoạt gen hướng đích gen mã hóa protein đã nêu ở trên, phương pháp sử dụng ARN sợi kép (double-stranded RNA, dsRNA), chẳng hạn, siRNA) bổ sung cho các sản phẩm phiên mã của gen đã nêu ở trên, phương pháp sử dụng ARN đối nghĩa bổ sung vào các sản phẩm phiên mã, và phương pháp sử dụng ARN có hoạt tính ribozyme cắt cụ thể các sản phẩm phiên mã đã nêu ở trên. Ngoài ra, các phương pháp chỉnh sửa hệ gen cải biến gen đích bằng cách sử dụng các nucleaza đặc hiệu vị trí (chẳng hạn, các nucleaza ngón tay kẽm (zinc finger nucleases, ZFN), các nucleaza hiệu ứng giống chất hoạt hóa phiên mã (transcription activator-like effector nuclease, TALEN), các enzym phá vỡ sợi kép ADN

như CRISPR-Cas9) được sử dụng một cách thích hợp để ức chế các chức năng của các chất đã nêu ở trên.

Là phương pháp đưa polynucleotit hoặc vector của sáng chế vào trong tế bào, các ví dụ về nó bao gồm các phương pháp như công nghệ chuyển gen lipofection, vi tiêm, phương pháp canxi phosphat, phương pháp DEAE-dextran, điện di, và phương pháp súng hạt. Ngoài ra, nếu vector của sáng chế là vector retrovirus, một tế bào đóng gói thích hợp có thể được chọn dựa trên trình tự LTR và đóng gói trình tự tín hiệu mà vector đó sở hữu, và các hạt retrovirus có thể được điều chế bằng cách sử dụng này. Các ví dụ về các tế bào đóng gói bao gồm PG13, PA317, GP+E-86, GP+envAm-12, và Psi-Crip. Ngoài ra, các tế bào 293 và các tế bào 293T có hiệu suất chuyển nhiễm cao có thể được sử dụng làm các tế bào đóng gói.

Hơn nữa, sau khi đưa polynucleotit hoặc vector của sáng chế vào trong tế bào, sự biểu hiện của CAR trong tế bào đó có thể được xác nhận bằng các phương pháp đã biết như phân tích tế bào dòng chảy, RT-PCR, thâm tách Northern, thâm tách Western, ELISA, và nhuộm miễn dịch huỳnh quang.

Kháng thể đa đặc hiệu

Như được thể hiện trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế được mô tả sau đây, đích của kháng thể của sáng chế, HLA-DR, trở thành kháng nguyên bề mặt tế bào đặc hiệu với bệnh ung thư máu. Do đó, nếu có thể tạo ra các tế bào miễn dịch đối với các tế bào ung thư máu bằng cách sử dụng kháng nguyên này làm chất đánh dấu và đạt được việc làm tổn thương tế bào hoặc tương tự, có thể góp phần điều trị bệnh. Là một phương thức cho phép liệu pháp miễn dịch như vậy, kháng thể đa đặc hiệu được đề cập đến.

“Kháng thể đa đặc hiệu” có nghĩa là kháng thể đơn dòng có nhiều vị trí nhận biết kháng nguyên và có tính đặc hiệu gắn kết với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau.

Theo sáng chế, kháng thể đa đặc hiệu có kháng thể của sáng chế hoặc đoạn chức năng của nó và vị trí nhận biết kháng nguyên đối với các tế bào miễn dịch. Các tế bào

miễn dịch như vậy không bị giới hạn đặc biệt, và là như đã được lấy ví dụ trong phần Các tế bào biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm đã nêu ở trên, nhưng từ quan điểm là có khả năng gây tổn thương tế bào hoặc tương tự lên các tế bào đích như các tế bào ung thư máu, các tế bào hiệu ứng là được ưu tiên. Các ví dụ về các tế bào hiệu ứng bao gồm các tế bào tiêu diệt tự nhiên (natural killer, NK), các tế bào đơn nhân, các đại thực bào, và các bạch cầu ái nhân. Hơn nữa, các kháng nguyên mà kháng thể đa đặc hiệu của sáng chế có thể nhận diện trên các tế bào như vậy bao gồm các thụ thể kích thích hoặc ức chế có mặt trên bề mặt của các tế bào. Các ví dụ cụ thể hơn về nó bao gồm CD3, CD16, B7-H4, BTLA, CD4, CD8, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG-3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM-3, VISTA, 4-1BB, KIR được biểu hiện bởi NK, B7-1, B7-2, B7H3, PD-L1, PD-L2, và TNFSF9.

Phương án được ưu tiên của kháng thể đa đặc hiệu của sáng chế là kháng thể đặc hiệu kép, và các ví dụ cụ thể hơn về nó bao gồm diabody đặc hiệu kép (bispecific diabody, BsDb), BsDb chuỗi đơn (single-chain BsDb, scBsDb), miền biến đổi nối tiếp đặc hiệu kép chuỗi đơn (single-chain bispecific tandem variable domain, scBsTafv), Fab hóa trị ba được tạo ra bằng công nghệ Dock-and-Lock (dock-and-lock trivalent Fab, DNL-(Fab)₃), kháng thể miền đơn (single domain antibody, sdAb), phức chất kháng thể chuỗi đơn đặc hiệu kép (bispecific single-stranded antibody complex, BssdAb), IgG BsAb được tạo ra bằng kỹ thuật knobs-into-holes, loại dung hợp Ig-scFv, lại dung hợp diabody-Fc, kháng thể miền biến đổi kép (dual variable domain antibody, DVD-IgG).

Hơn nữa, các kháng thể đặc hiệu kép như vậy có thể được sản xuất bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp đã biết. Các ví dụ về các phương pháp đã biết như vậy bao gồm các phương pháp sản xuất từ một tế bào dung hợp khác giữa tế bào lai tạo ra kháng thể và tương tự, nhận diện HLA-DR, và tế bào lai mà tạo ra kháng thể và tương tự, nhận diện tế bào miễn dịch (phương pháp quadroma). Các phương pháp ví dụ còn bao gồm phương pháp gắn kết hóa học các đoạn

chức năng của các kháng thể khác nhau này (như Fab). Ví dụ các phương pháp này còn bao gồm phương pháp dung hợp ADN mã hóa các đoạn chức năng của các kháng thể khác nhau này thông qua đoạn liên kết, đưa cấu trúc ADN tạo ra vào trong tế bào chủ, và tạo ra đích kháng thể đặc hiệu kép từ tế bào. Hơn nữa, các phương pháp ví dụ bao gồm các phương pháp thúc đẩy quá trình dị dimer hóa của các kháng thể khác nhau hoặc các đoạn chức năng của nó, như Knob-into-Hole (Genentech), Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), CrossMAb (Roche), ghép tĩnh điện thích ứng (Amgen), LUZ-Y (Genentech), kháng thể miễn được thao tác kỹ thuật di truyền trao đổi sợi (Strand Exchange Engineered Domain body, SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus), và Duo Body (GenmabA/S), và phương pháp trao đổi Fab-ARM kiểm soát (controlled Fab-ARM exchange method, CFAF method) được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2008/119353 và công bố đơn quốc tế số WO2011/131746, và phương pháp được mô tả trong Chengbin Wu et al., Generation and Characterization of dual Variable Domain Globulin Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, Springer Nature Experiments, 2010.

Chất liên hợp kháng thể-dược chất

Như được thể hiện trong các ví dụ được mô tả sau đây, đích của kháng thể của sáng chế, HLA-DR, trở thành kháng nguyên bề mặt tế bào đặc hiệu với bệnh ung thư máu. Do đó, sáng chế có thể còn bao gồm một phương án về chất liên hợp kháng thể-dược chất (antibody-drug conjugate, ADC) được hình thành bằng cách phối hợp kháng thể của sáng chế (đặc biệt là, các kháng thể nhân hóa) hoặc đoạn chức năng của nó với dược chất.

Trong ADC của sáng chế, “dược chất” có thể được kết hợp với kháng thể không bị giới hạn cụ thể, và các ví dụ về nó bao gồm các chất gây độc tế bào đã biết trong lĩnh vực này. Các ví dụ về “các chất gây độc tế bào” bao gồm các chất chống ung thư như irinotecan (CPT-11), chất chuyển hóa irinotecan SN-38 (10-hydroxy-7-

etyncamptothecin), adriamycin, taxol, 5-fluorouracil, nimustine, ranimustine, temozolomide, và các chất alkyl hóa khác, gemcitabine, hydroxycarbamide, và các chất đối kháng chuyển hóa khác, etoposide, vincristine, và các alkaloid thực vật khác, mitomycin, bleomycin, và các kháng sinh chống ung thư khác, cisplatin và các thuốc platin khác, sorafenib, erlotinib, và các tác nhân phân tử hướng đích khác, methotrexate, cytosine arabinoside, 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, cyclophosphamide, ifosfamide, busulfan, MMAE (monomethyl auristatin E), DM1 (mertansine), và calicheamicin. Các ví dụ về các chất gây độc tế bào còn bao gồm các chất đồng vị phóng xạ như ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{10}B , ^{111}In , và ^{90}Y . Các chất gây độc tế bào có thể là các chất nhạy cảm với ánh sáng sử dụng hoạt tính gây độc tế bào, cụ thể, các chất mà bản thân chúng, khi được hoạt hóa bằng cách chiếu ánh sáng, sẽ thay đổi thành dạng thể hiện độc tính tế bào (tính độc đối với tế bào), hoặc các chất gây sản sinh các chất gây độc tế bào (các chất có tính độc đối với tế bào). Các ví dụ về chúng bao gồm các chlorin, chlorin e6, porfimer natri, talaporfin natri, verteporfin, và các tiền chất và các dẫn xuất của nó. Ngoài ra, các chất gây độc tế bào bao gồm các peptit độc, như saporin, ricin, và các protein làm bất hoạt ribosome (ribosome-inactivating protein, RIP) như độc tố Shiga.

Hơn nữa, gắn kết giữa kháng thể và chất gây độc tế bào có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, và cả gắn kết trực tiếp và gián tiếp đều có thể được chấp nhận. Đối với gắn kết trực tiếp, gắn kết đồng hóa trị có thể được sử dụng. Đối với gắn kết gián tiếp, gắn kết qua đoạn liên kết có thể được sử dụng. Các kỹ thuật thông thường liên quan đến các đoạn liên kết được mô tả, chẳng hạn, trong Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996; Harris, J. M. and Zalipsky, S. (Eds.), Poly(etylen glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS Symposium Series, 1997; Veronese, F. and Harris, J. M. (Eds.), Peptid and protein PEGylation. Advanced Drug Delivery Review 54(4), 2002. Ngoài ra, đoạn liên kết có thể là đoạn liên kết mạch thẳng (đoạn liên kết hóa trị hai) hoặc đoạn liên kết mạch nhánh (đoạn liên kết hóa trị ba hoặc lớn hơn).

Dược phẩm

Sáng chế liên quan đến dược phẩm chứa, làm thành phần hoạt tính của nó, kháng thể của sáng chế hoặc vùng biến đổi của nó, hoặc cấu trúc kháng thể có nó (các tế bào biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm đã nêu ở trên, các kháng thể đa đặc hiệu, các chất liên hợp kháng thể-dược chất (ADC), và tương tự) (sau đây đơn giản được gọi là “kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế”). Sáng chế còn đề xuất các phương pháp để điều trị bệnh (chẳng hạn, bệnh ung thư máu như bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính) bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế cho đối tượng.

“Các bệnh” mà sáng chế nhắm đến không bị giới hạn đặc biệt miễn là chúng là các bệnh liên quan đến các tế bào có HLA-DR là kháng nguyên bề mặt đặc hiệu, và các ví dụ về các bệnh này bao gồm bệnh ung thư máu. Các ví dụ cụ thể hơn về các bệnh này bao gồm bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính và các bệnh có liên quan của nó (hội chứng loạn sản tủy (myelodysplastic syndrome, MDS), bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (acute lymphoblastic leukemia, ALL), u lympho tế bào B ác tính, và đa u tủy). “Các bệnh ung thư máu” có thể bệnh ung thư nguyên phát, bệnh ung thư tái phát, bệnh ung thư thứ phát, hoặc bệnh ung thư di căn. “Bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML)” dùng để chỉ khối u máu rải rác được đặc trưng bởi sự tăng sinh tự sinh vô tính của các tế bào dòng tủy chưa trưởng thành có sự biệt hóa và trưởng thành bị suy yếu. Đây cũng là bệnh ung thư dòng tủy của các tế bào máu, được đặc trưng bởi sự tăng sinh nhanh chóng của các tế bào bệnh bạch cầu bất thường trong tủy xương, và kết quả là, chức năng tạo máu bình thường bị ức chế đáng kể. Điều này dẫn đến các triệu chứng như giảm bạch cầu, thiếu máu, và giảm tiểu cầu.

“Dược phẩm” của sáng chế có thể chứa, ngoài kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế, các thành phần dược dụng bổ sung. Các ví dụ về các thành phần bổ sung như vậy bao gồm chất mang, chất nhũ hóa, chất thẩm ướt, chất đệm pH, môi trường, tá dược,

chất phân rã, chất đệm, chất đẳng trương, chất huyền phù hóa, chất hòa tan, chất làm dịu, chất ổn định, chất bảo quản và chất kháng khuẩn. Cụ thể hơn, các thành phần được dung bổ sung khác có thể bao gồm, đối với các chế phẩm dạng lỏng như thuốc tiêm, dung dịch nước (như nước muối sinh lý, nước dùng cho thuốc tiêm, nước muối đệm phosphat, dung dịch glucoza, và dung dịch glyxerol), và nhôm hydroxit, chẳng hạn. Đối với các chế phẩm dạng đông khô, các ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, đường (như manitol, lactoza, và sucroza) và albumin. Hơn nữa, dược phẩm của sáng chế có thể ở dạng bộ kit trong đó các thành phần nêu trên có thể được trộn trước khi sử dụng. Trong trường hợp sử dụng làm thuốc tiêm, nó có thể còn ở dạng thuốc tiêm được đưa vào trong ống tiêm.

Dược phẩm của sáng chế có thể chứa chỉ kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế làm thành phần hoạt tính, hoặc nó có thể chứa kháng thể hoặc loại tương tự và ít nhất một chất trị ung thư khác. Ngoài ra, kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế có thể được sử dụng phối hợp với các chất chống ung thư khác, do đó gia tăng tác dụng kháng u. Các chất chống ung thư khác được sử dụng cho mục đích như vậy có thể được sử dụng cho đối tượng đồng thời với kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế, một cách riêng rẽ, hoặc liên tiếp, và khoảng cách dùng thuốc có thể được điều chỉnh. Các ví dụ về “các chất chống ung thư” như vậy bao gồm venetoclax, azacitidine, dasatinib, cytarabine (Ara-C, Cytosar-U), enocitabine, quizartinib (AC220), sorafenib (BAY 43-906), lestaurtinib (CEP-701), midostaurin (PKC412), carboplatin, carmustine, chlorambucil, dacarbazine, ifosfamid, lomustine, mechlorethamine, procarbazine, pentostatin, (2'-deoxycytosine), etoposide, teniposide, topotecan, vinblastine, vincristine, paclitaxel, dexamethasone, methylprednisolone, prednisone, all-trans retinoic acid, arsenic trioxide, interferon- α , rituximab (Rituxan (nhãn hiệu hàng hóa đã được đăng ký)), gemtuzumab ozogamicin, imatinib mesylate, Cytosar-U, melphalan, busulfan (Myleran (nhãn hiệu hàng hóa đã được đăng ký)), thiopeta, bleomycin, platinum (cisplatin), cyclophosphamid (Cytosan (nhãn hiệu hàng hóa đã được đăng ký)),

daunorubicin, doxorubicin, idarubicin, mitoxantrone, 5-azacytidine, cladribine, fludarabine, hydroxyurea, 6-mercaptopurine, methotrexate, 6-thioguanine, các chất ức chế kiểm soát miễn dịch (như các kháng thể kháng PD-1), hoặc phối hợp bất kỳ của chúng, nhưng không bị giới hạn ở các chất có hoạt tính kháng u. Ngoài ra, dược phẩm của sáng chế và kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế có thể được kết hợp với các phương pháp điều trị ung thư xạ trị và liệu pháp miễn dịch ung thư, không bị giới hạn ở hóa trị liệu bằng cách sử dụng các chất chống ung thư đã nêu ở trên.

Hơn nữa, trong trường hợp của dược phẩm chứa các tế bào của sáng chế, nó có thể chứa các thành phần khác như dimethyl sulfoxide (DMSO) và albumin huyết thanh cho mục đích bảo vệ các tế bào, và các chất kháng sinh cho mục đích ngăn nhiễm khuẩn. Hơn nữa, nó có thể chứa các cytokin, các yếu tố phát triển, các steroid và các yếu tố hoạt hóa tế bào T khác, các vitamin, các chất kích thích miễn dịch, và các chất ức chế kiểm soát miễn dịch cho mục đích hoạt hóa, tăng sinh, hoặc gây ra sự biệt hóa của các tế bào, và các tế bào của sáng chế có thể được sử dụng phối hợp với các thành phần khác này.

Phương pháp sử dụng dược phẩm thay đổi phụ thuộc vào loại chất cần được sử dụng, dạng của chế phẩm, tuổi tác, trọng lượng, giới tính, và tình trạng sức khỏe của đối tượng, nhưng nó có thể được sử dụng hoặc bằng cách sử dụng ngoài đường tiêu hóa (như sử dụng trong tĩnh mạch, sử dụng trong động mạch, hoặc sử dụng cục bộ) hoặc bằng cách sử dụng qua đường miệng. Phương pháp sử dụng được ưu tiên là ngoài đường tiêu hóa, và tốt hơn nữa là, trong tĩnh mạch. Ngoài ra, không cần đến việc sử dụng toàn thân, việc sử dụng cục bộ có thể được thực hiện. Là biện pháp sử dụng cục bộ, việc tiêm trực tiếp vào trong mô đích (như tủy xương) có thể được lấy làm ví dụ.

Liều lượng của dược phẩm có thể thay đổi phụ thuộc vào tuổi tác, trọng lượng, giới tính và tình trạng sức khỏe của đối tượng, tiến triển của các triệu chứng, và các thành phần của dược phẩm được sử dụng. Ngoài ra, biểu thời gian sử dụng thuốc có thể được điều chỉnh một cách thích hợp dựa trên các điều kiện này, và ngoài liều đơn, nó có

thể được sử dụng nhiều lần liên tục hoặc định kỳ, và thông thường, khi sử dụng kháng thể trong tĩnh mạch, đối với người lớn, liều lượng này nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1000mg mỗi 1kg thể trọng mỗi ngày, tốt hơn là từ 1 đến 100mg. Ngoài ra, khi sử dụng ADC, lượng thuốc được chứa nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1000mg mỗi 1kg thể trọng mỗi ngày đối với người lớn, tốt hơn là từ 0,01 đến 100mg. Số lần các kháng thể hoặc ADC này được sử dụng có thể, chẳng hạn, một lần, hoặc nhiều lần cách nhau từ 1 ngày đến 1 năm (chẳng hạn, mỗi tuần, mỗi 10 đến 30 ngày, hằng tháng, mỗi 3 đến 6 tháng, mỗi sáu tháng, hoặc hằng năm).

Ngoài ra, đối với liều lượng của tế bào (chẳng hạn, tế bào biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm) được sử dụng trong phương pháp điều trị của sáng chế, trong một lần sử dụng, đối với người lớn, nó có thể được đặt đến lượng nằm trong khoảng từ 1×10^3 đến 1×10^{10} tế bào mỗi 1kg thể trọng, tốt hơn là từ 1×10^4 đến 1×10^9 tế bào, và tốt hơn nữa là từ 1×10^5 đến 1×10^8 tế bào. Khoảng cách dùng liều có thể, chẳng hạn, mỗi tuần, mỗi 10 đến 30 ngày, hằng tháng, mỗi 3 đến 6 tháng, hằng năm, hoặc tương tự. Ngoài ra, các tế bào của sáng chế có thể tăng sinh tự thân trong cơ thể của đối tượng sử dụng, do đó nó có thể cũng là liều duy nhất. Ngoài ra, sau khi sử dụng, số lượng của các tế bào của sáng chế trong cơ thể có thể được theo dõi, và thời điểm dùng thuốc có thể được xác định dựa trên các kết quả.

Theo sáng chế, là “đối tượng” cần được sử dụng kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế, chẳng hạn, những người mắc bệnh ung thư máu, những người có thể tái phát bệnh ung thư máu, và những người đã tái phát bệnh ung thư máu có thể được đề cập đến. Theo sáng chế, “điều trị” dùng để chỉ việc làm giảm các triệu chứng hoặc các triệu chứng đi kèm đặc trưng của bệnh ung thư máu và tương tự (các triệu chứng nhẹ), ngăn ngừa hoặc làm chậm sự trầm trọng của các triệu chứng, và cải thiện các bất thường về giá trị xét nghiệm lâm sàng như sự gia tăng các tế bào ung thư máu. Hơn nữa, việc

ngăn ngừa, làm chậm hoặc làm giảm nguy cơ tái diễn bệnh ung thư máu cũng được bao gồm.

Đặc biệt là, kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế có thể thể hiện tính đặc hiệu alen đối với HLA-DR. Đối với các bệnh nhân ung thư máu và tương tự bị tái phát sau khi cấy ghép dị sinh không hợp đôi HLA-DR, nếu HLA-DR của người nhận (như bệnh nhân ung thư máu) là loại dương tính mà kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế gắn kết với, và loại HLA-DR của người cho là loại âm tính không gắn kết với kháng thể của sáng chế, sau đó các tế bào CAR-T được chuẩn bị từ chính bệnh nhân đã được cấy ghép hoặc từ các tế bào có nguồn gốc từ người cho có thể tấn công đặc hiệu vào bệnh ung thư máu của người nhận.

Hơn nữa, kháng thể của sáng chế gắn kết chỉ với một số tế bào bình thường, như các tế bào B, trong các tế bào máu bình thường và không gắn kết với các tế bào đơn nhân và tương tự. Hơn nữa, nó chỉ gắn kết với một phần của các tế bào mầm tạo máu, là nguồn gốc của tất cả các tế bào máu. Do đó, ngay cả khi các tế bào CAR-T tự thân thông thường và tương tự được sử dụng để điều trị cho các bệnh nhân ung thư máu và tương tự có HLA-DR dương tính mà kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế gắn kết với, các tế bào ung thư máu được loại bỏ, sự tạo máu bình thường được duy trì bằng các tế bào âm tính mà kháng thể hoặc loại tương tự của sáng chế không gắn kết với, làm cho việc điều trị trở nên khả thi.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa trên các ví dụ, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ sau đây. Các ví dụ này được thực hiện bằng cách sử dụng các nguyên liệu và các phương pháp được thể hiện dưới đây.

Mẫu bệnh nhân

Tủy xương có nguồn gốc từ các bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML) được thu thập từ xương chậu sau khi nhận được sự đồng ý. Các tế bào đơn nhân

được tách ra bằng cách sử dụng Ficoll Paque (GE Healthcare) và được sử dụng để phân tích.

Chuẩn bị kháng thể đơn dòng kháng AML

Chuột nhắt BALB/c 6 tuần tuổi (CLEA Nhật Bản) được gây miễn dịch bằng cách tiêm các dòng tế bào AML (KG1a, THP-1, U937, HL60, và MOLM-13) vào trong đệm chân của chúng. Sau 4 vòng gây miễn dịch, các lympho bào thu được từ các hạch bạch huyết vùng kheo và các tế bào u tủy chuột nhắt SP2/0 được dung hợp tế bào bằng cách sử dụng PEG 1500 (Roche Applied Science), và các tế bào sau đó được gieo vào trong các đĩa 96 lỗ trong môi trường HAT để lựa chọn các tế bào lai. Để xác định tế bào lai mà tạo ra các kháng thể đơn dòng gắn kết với các tế bào AML và không gắn kết với các tế bào máu bình thường, trước tiên, các dòng tế bào AML được phản ứng với các kháng thể đơn dòng trong phần nổi lên trên của mỗi tế bào lai, và sau đó, chúng được phản ứng với kháng thể IgG kháng chuột nhắt đã được đánh dấu bằng PE (BioLegend 405307) và được phân tích bằng phép phân tích tế bào dòng chảy. Sau đó, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) có nguồn gốc từ người khỏe mạnh được nhuộm tương tự, và sau khi lựa chọn tế bào lai sản sinh ra các kháng thể đơn dòng mà không gắn kết với các tế bào máu bình thường, các tế bào và phần nổi lên trên được lưu trữ và được sử dụng để sau đó phân tích.

Phân tích tế bào dòng chảy

Các huyền phù tế bào đơn được nhuộm bằng các kháng thể đã được đánh dấu huỳnh quang. Để nhuộm, các kháng thể sau đây được sử dụng: kháng CD34-APC (8G12, BD Biosciences), kháng CD38-FITC (HIT2, BioLegend), kháng CD3-Cy7PE (UCHT1, BioLegend), kháng CD19-Cy7APC (HIB19, BioLegend), kháng CD14-BV510 (M5E2, BioLegend), kháng HLA-DR-APC (L243, BioLegend), kháng CD11c-FITC (Bu15, BioLegend), kháng CD19-PE (HIB19, BioLegend), kháng CD279-BV510 (EH12,2H7, BioLegend), kháng CD223-FITC (11C3C65, BioLegend), kháng CD366-

PE (F38-2E2, BioLegend), IgG-PE kháng chuột nhất của dê (405307, BioLegend), F(ab')₂-Alexa Fluor 647 kháng chuột nhất của dê (115-605-072, Jackson ImmunoResearch), kháng thể kháng EGFR được liên hợp với Biotin (Erbix), Streptavidin-PE (405204, BioLegend). KG2032 (IgG2a chuột nhất) được tinh chế bằng cách sử dụng Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) và được sử dụng để nhuộm ở nồng độ 10µg/ml. Việc phân tích và phân loại tế bào được thực hiện bằng cách sử dụng FACSCanto II hoặc FACS Aria II (BD Biosciences). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo. Đối với việc phân tích bằng cách sử dụng các tế bào T hoạt hóa, các PBMC có nguồn gốc từ người khỏe mạnh được kích thích ở 1×10^6 /ml bằng 3µg/ml PHA trong ba ngày.

Xác định kháng nguyên KG2032 bằng cách sử dụng thư viện ARN hướng dẫn CRISPR

Trước tiên, thu được các dòng vô tính của các tế bào Daudi biểu hiện protein Cas9. Cụ thể, các tế bào Daudi trước tiên được gây nhiễm bằng vector lentivirus biểu hiện Cas9, và sau khi bổ sung 10µg/ml blasticidin trong 4 ngày để lựa chọn các tế bào trong đó vector đã được đưa vào, việc phân loại tế bào đơn được thực hiện trên đĩa 96 lỗ. Sau khi khuếch đại các tế bào này, gen thông báo Cas9 (xem Tzelepis K et al., Cell Rep. 2016; 17(4): 1193-205) được đưa vào để lựa chọn các dòng vô tính có hiệu suất làm bất hoạt gen tốt.

Tiếp theo, thư viện CRISPR đã được bất hoạt gen toàn bộ hệ gen người (cung cấp bởi phòng thí nghiệm Yusa Lab của Đại học Kyoto) được gây nhiễm vào các dòng vô tính của các tế bào Daudi tạo ra biểu hiện protein Cas9 này để đạt được hiệu suất đưa vào khoảng 30%. Sau đó, 0,5µg/ml puromycin được bổ sung trong 3 ngày để lựa chọn các tế bào mà thư viện CRISPR library đã được đưa vào. Các tế bào này được kéo dài hơn nữa, được nhuộm bằng 2×10^8 tế bào với KG2032, và 5×10^6 tế bào được phân loại từ phân đoạn có gắn kết KG2032 yếu (KG2032^{low}). ADN được chiết ra từ các tế bào sau khi phân loại bằng cách sử dụng bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN),

và phân tích NGS được thực hiện. ADN cũng được chiết từ 5×10^7 tế bào trước khi phân loại bằng cách sử dụng bộ kit Blood & Cell Culture ADN Maxi Kit (QIAGEN) và được sử dụng làm đối chứng.

Chuẩn bị các tế bào đã được bất hoạt gen

Để tổng hợp ARN hướng dẫn (guide RNA, gRNA) để làm bất hoạt gen HLA-DR, bộ kit GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) được sử dụng. Hai loại gRNA sau đây được tổng hợp:

trình tự gRNA (1): GTGCGCTTCGACAGCGACGT (SEQ ID NO: 31), và

trình tự gRNA (2): GACGGAGCGGGTGCGGTTCC (SEQ ID NO: 32).

Theo công nghệ di truyền, 2×10^5 tế bào Daudi đưa vào cùng với 1 μ g protein TrueCut Cas9 v2 (Thermo Fisher Scientific) và 200ng gRNA đã được chuẩn bị bằng cách sử dụng hệ chuyển nhiễm (NEON Transfection System, Invitrogen). Chín ngày sau, chúng được nhuộm bằng kháng thể kháng HLA-DR-APC, và các tế bào có HLA-DR đã được bất hoạt gen được phân loại và được sử dụng để phân tích.

Xác định epitop của KG2032

Năm thể khảm của HLA-DRB1*14:54 (dương tính với KG2032) và HLA-DRB1*1502 (âm tính với KG2032) được xây dựng bằng phương pháp PCR chồng lắp. Các thể khảm đã xây dựng được đưa vào trong các tế bào K562 bằng cách sử dụng vector retrovirus, và hai ngày sau, chúng được nhuộm bằng KG2032 và L243, và sự có mặt hoặc sự vắng mặt của sự gắn kết được phân tích bằng phép phân tích tế bào dòng chảy.

Xây dựng và chuẩn bị thụ thể kháng nguyên khảm (CAR) 1

ADN bổ trợ mã hóa phần biến đổi của KG2032 thu được bằng cách sử dụng bộ kit SMARTer RACE 5'/3' Kit (Takara) và phương pháp 5' RACE, và trình tự của nó được xác định. Như được thể hiện trên Fig.8A, chuỗi nhẹ (VL) và chuỗi nặng (VH) được dung hợp bằng cách sử dụng phương pháp PCR chồng lắp, với trình tự đoạn liên kết ở giữa. Hơn nữa, sản phẩm tạo ra, cùng với CD28 và CD3 ζ , hoặc CD8 α , 4-1BB, và CD3 ζ ,

được dung hợp bằng phương pháp PCR chồng lặp (tham khảo trên Fig.8A là “28ζ” và “BBζ”) và được xen vào trong vector retrovirus để xây dựng véc tơ biểu hiện KG2032-CAR (còn được gọi là “KG2032-CD28-CD3ζ-CAR” và “KG2032-BBz-CAR” tương ứng). Để cho phép hiệu suất đưa vào được đo bằng kháng thể kháng EGFR, trình tự của EGFR thiếu hụt miền nội bào được bổ sung vào véc tơ biểu hiện KG2032-CAR sau CD3ζ theo cách tuân theo trình tự T2A.

Chuẩn bị các tế bào CAR-T

Sau khi đưa mỗi véc tơ biểu hiện KG2032 CAR vào trong các tế bào 293T bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 (Invitrogen) cùng với vector Gag-pol và vector VSV-G, phần nổi lên trên được thu thập sau 48 giờ và 72 giờ để chuẩn bị vector virus. Các PBMC có nguồn gốc từ những người khỏe mạnh được kích thích bằng kháng thể kháng CD3 (OKT3, eBioscience) và kháng thể kháng CD28 (CD28,2, eBioscience) để chuẩn bị các tế bào T hoạt hóa, mà sau đó được gây nhiễm bằng phần nổi lên trên chứa virus. Sau đó, các tế bào T mà CAR đã được đưa vào được nuôi cấy trong môi trường được bổ sung 100IU/ml IL-2 trong 6 ngày. Khi bổ sung dasatinib, nó được đưa vào ở nồng độ 1μM vào ngày 4 đến 6. Vào ngày 6, hiệu suất đưa vào của CAR được phân tích bằng cách sử dụng F(ab')₂-Alexa Fluor 647 kháng chuột nhất của dê (115-605-072, Jackson ImmunoResearch) hoặc kháng thể kháng EGFR được liên hợp với Biotin.

Đo mức sản sinh cytokin 1

Sự sản sinh cytokin của các tế bào KG2032-CAR-T hoặc các tế bào T đối chứng được đo bằng cách sử dụng bộ kit Human IFN-gamma Quantikine ELISA Kit/Human IL-2 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems). Cụ thể, các tế bào hiệu ứng và các tế bào đích được đồng nuôi cấy trong đĩa 96 lỗ, mỗi loại ở nồng độ 1×10^5 tế bào, và phần nổi lên trên thu thập được sau 16-24 giờ được làm loãng để phù hợp với phạm vi đường cong chuẩn để đo.

Đo hoạt tính gây độc tế bào 1

Khả năng gây tổn thương tế bào khối u của các tế bào T được đo bằng xét nghiệm giải phóng ^{51}Cr . 5×10^5 tế bào đích được bổ sung 25 μCi dung dịch natri cromat ^{51}Cr (PerkinElmer), được ủ ở 37°C trong 1,5 giờ, và sau đó được đồng nuôi cấy với các tế bào đích đã được đánh dấu (1×10^4 tế bào) và các tế bào hiệu ứng ở các tỷ lệ hiệu ứng/đích khác nhau. ^{51}Cr được giải phóng vào phần nổi lên trên sau 4 giờ được đếm bằng máy đếm gamma. ^{51}Cr đã được giải phóng hoàn toàn hoặc tự phát được đo bằng cách nuôi cấy 1×10^4 tế bào đã được đánh dấu bằng 1% Triton X-100 hoặc trong môi trường. Hoạt tính gây độc tế bào được tính là [(lượng giải phóng ^{51}Cr đặc hiệu - lượng giải phóng ^{51}Cr tự phát)/(tổng lượng giải phóng ^{51}Cr - lượng giải phóng ^{51}Cr tự phát)] $\times$ 100.

Mô hình chuột nhất ghép ngoại lai 1

KG1a-luc/venus được sản xuất bằng cách đưa gen luxiferaza vào trong các tế bào KG1a bằng cách sử dụng vectơ lentivirut. Chuột nhất NOD/SCID/IL-2R γ null (NOG) cái (Japan CLEA), từ 6 đến 8 tuần tuổi, được chiếu xạ với liều bức xạ 1,2 Gy, và sau đó 4×10^6 tế bào KG1a biểu hiện luxiferaza (KG1a-luc/venus) được tiêm qua tĩnh mạch đuôi. Năm ngày sau, VivoGlo Luciferin (Promega, 150mg/kg thể trọng) được sử dụng trong màng bụng, các hình ảnh được chụp bằng hệ chụp ảnh in vivo (in vivo imaging system, IVIS), và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Living Image (PerkinElmer). Ngày tiếp theo, $1-2 \times 10^6$ tế bào CAR-T hoặc tế bào T đối chứng được tiêm trong tĩnh mạch, và việc chụp ảnh bằng IVIS thực hiện hằng tuần sau đó.

Xây dựng và chuẩn bị thụ thể kháng nguyên khảm (CAR) 2

Các ADN bổ trợ của các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của KG2032 được dung hợp với các ADN bổ trợ của CD28 và CD3 ζ bằng phương pháp PCR chồng lắp. Ngoài ra, ADN bổ trợ của T2A-IL-15 được dung hợp với KG2032 CAR bằng phương pháp PCR chồng lắp.

Chuẩn bị các tế bào CAR-NK

Máu dây rốn (cord blood, CB) không phản ứng với KG2032 được xác định bằng cách đo khả năng phản ứng của KG2032 với các tế bào B CD19+ bằng cách phân tích tế bào dòng chảy. Các tế bào T được loại bỏ bằng cách sử dụng CD3 MicroBeads (Miltenyi Biotec). Các tế bào đơn nhân CB đã được làm giảm tế bào T được kích thích bằng các tế bào K562-mb15-41BBL đã được chiếu xạ với lượng bức xạ 100Gy và được nuôi cấy với sự có mặt của 20IU/ml IL-2. Sau 1 tuần, retrovirus mang ADN hỗ trợ KG2032-CAR-T2A-IL-15 được tải nạp vào trong các tế bào NK có nguồn gốc CB bằng cách sử dụng RetroNectin. Các tế bào sau đó được kích thích lại bằng các tế bào K562-mb15-41BBL đã được chiếu xạ với lượng bức xạ 100Gy, được nuôi cấy trong 1 tuần nữa, và được sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo.

Đo hoạt tính gây độc tế bào 2

Khả năng của các tế bào NK trong việc phân giải các tế bào khối u đích được đo bằng các xét nghiệm giải phóng ^{51}Cr . Ngắn gọn là, 6×10^5 tế bào đích được đánh dấu ở 37°C trong 1,5 giờ bằng 25 μCi [^{51}Cr]natri cromat (PerkinElmer). Các tế bào đích đã được đánh dấu (1×10^4) được ủ với các tế bào hiệu ứng trong 4 giờ. Lượng giải phóng ^{51}Cr trong các phần nổi lên trên thu hồi được đếm bằng máy đếm gamma. Tổng lượng giải phóng ^{51}Cr và lượng giải phóng ^{51}Cr tự phát được xác định bằng cách ủ 1×10^4 đích đã được đánh dấu hoặc trong 1% Triton X-100 hoặc môi trường nuôi cấy. Hoạt tính gây độc tế bào được tính là $[(\text{lượng giải phóng } ^{51}\text{Cr} \text{ đặc hiệu} - \text{lượng giải phóng } ^{51}\text{Cr} \text{ tự phát}) / (\text{tổng lượng giải phóng } ^{51}\text{Cr} - \text{lượng giải phóng } ^{51}\text{Cr} \text{ tự phát})] \times 100$.

Xét nghiệm sự mất hạt của CD107a

Các tế bào KG2032 CAR-NK hoặc các tế bào NK đối chứng ($2,5 \times 10^5$ tế bào) được đồng nuôi cấy trong các đĩa 96 lỗ với các tế bào KG1a AML hoặc các tế bào BM từ bệnh nhân AML (5×10^4 tế bào) ở tỷ lệ hiệu quả:đích bằng 5:1. Alexa Fluor 647 kháng CD107a (1:50) và monensin (BD Biosciences, 1:1500) được bổ sung khi bắt đầu quá trình ủ. Sau khi ủ trong 5 giờ, các tế bào được nhuộm bằng kháng CD56-PE và được

phân tích bằng phép phân tích tế bào dòng chảy. Lưu ý rằng, loại alen của HLA-DR của bệnh nhân AML là DRB1*08:02/12:01.

Mô hình chuột nhất ghép ngoại lai 2

Mô hình AML rải rác được thiết lập bằng cách truyền tĩnh mạch các tế bào KG1a AML vào trong chuột nhất NOD/SCID/IL-2R γ null (NOG) (In Vivo Science). Chuột nhất NOG cái từ 6 đến 8 tuần tuổi (được chiếu xạ với lượng bức xạ 1,0–2,4Gy, 4–24 giờ trước khi cấy ghép) được tiêm trong tĩnh mạch qua tĩnh mạch đuôi bằng $1-4 \times 10^6$ tế bào KG1a-luc. Trong các thí nghiệm với các tế bào KG2032 CAR-NK, $1,0-1,4 \times 10^6$ tế bào KG2032 CAR-NK hoặc các tế bào NK đối chứng được truyền vào ngày 1 và 3 sau khi chuyển các tế bào AML. Mức phát triển khối u ở chuột nhất được đo bằng cách đo huỳnh quang khi sử dụng luxiferin bằng cách sử dụng IVIS.

Chuẩn bị các tế bào KG2032-CAR-T cải biến

Các ADN bổ trợ của các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của KG2032 được dung hợp với các ADN bổ trợ CD8 α , 4-1BB, và CD3 ζ bằng phương pháp PCR chồng lắp. Các đột biến để thay thế tyrosin trong motif CD3z ITAM trong trình tự KG2032 CAR bằng phenylalanin được đưa vào bằng cách sử dụng bộ kit PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara).

Chuẩn bị huyền phù tế bào đơn của các tế bào biểu mô niêm mạc

Để chuẩn bị các huyền phù tế bào đơn của các tế bào biểu mô niêm mạc, các màng nhày được cắt thành các mảnh có chiều dày 3mm, được rửa bằng nước muối đệm phosphat (phosphat-buffered saline, PBS) (Nacalai Tesque) ba lần, và được ủ trong HBSS (Nacalai Tesque) chứa 10mM EDTA ở 37°C trong 30 phút. Các tế bào biểu mô sau đó được làm cho bong ra bằng cách lắc và được thu thập. Sau khi ly tâm ở 400g trong 5 phút, các tế bào được huyền phù hóa trong TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) chứa 500U/ml ADNase I và được ủ ở 37°C trong 30 phút. ADN được chiết ra

từ các tế bào bằng cách sử dụng bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Việc phân loại HLA-DRB1 được thực hiện bởi Phòng thí nghiệm HLA (Kyoto, Nhật Bản).

Đo mức sản sinh xytokin 2

Các tế bào KG2032-CAR-T cải biến hoặc các tế bào T đối chứng được đồng nuôi cấy với các tế bào biểu mô ruột hoặc các tế bào bệnh bạch cầu (mỗi loại 1×10^5 tế bào) trong 16 giờ. Các xytokin tiết ra trong phần nổi lên trên của môi trường đồng nuôi cấy tế bào được đo bằng cách sử dụng bộ kit ELISA kit (IFN- γ và IL-2; R&D Systems).

Đo hoạt tính gây độc tế bào 3

Khả năng gây độc tế bào của các tế bào KG2032-CAR-T cải biến được đo bằng các xét nghiệm giải phóng ^{51}Cr . 6×10^5 tế bào đích được đánh dấu ở 37°C trong 1,5 giờ bằng $25\mu\text{Ci}$ [^{51}Cr]natri cromat (PerkinElmer). Các tế bào đích đã được đánh dấu (1×10^4) được ủ với các tế bào hiệu ứng trong 4 giờ. Lượng giải phóng ^{51}Cr trong các phần nổi lên trên thu hồi được đếm bằng máy đếm gamma. Tổng lượng giải phóng ^{51}Cr và lượng giải phóng ^{51}Cr tự phát được xác định bằng cách ủ 1×10^4 đích đã được đánh dấu hoặc trong 1% Triton X-100 hoặc môi trường nuôi cấy. Hoạt tính gây độc tế bào được tính là $[(\text{lượng giải phóng } ^{51}\text{Cr} \text{ đặc hiệu} - \text{lượng giải phóng } ^{51}\text{Cr} \text{ tự phát})/(\text{tổng lượng giải phóng } ^{51}\text{Cr} - \text{lượng giải phóng } ^{51}\text{Cr} \text{ tự phát})] \times 100$.

Mô hình chuột nhất ghép ngoại lai 3

Mô hình AML rải rác được thiết lập bằng cách truyền tĩnh mạch các tế bào KG1a AML vào trong chuột nhất NOD/SCID/IL-2R γ null (NOG) (In Vivo Science). Chuột nhất NOG cái từ 6 đến 8 tuần tuổi (được chiếu xạ với lượng bức xạ 1,0–2,4Gy, 4–24 giờ trước khi cấy ghép) được tiêm trong tĩnh mạch qua tĩnh mạch đuôi bằng $1-4 \times 10^6$ tế bào KG1a-luc. Vào ngày 5, chuột nhất được truyền trong màng bụng bằng VivoGlo Luciferin (Promega, 150mg/kg thể trọng), và mức độ phát triển khối u được đo bằng cách quan sát huỳnh quang phát ra bởi khối u bằng cách sử dụng hệ chụp ảnh in vivo (IVIS) bằng phần mềm Living Image Software (PerkinElmer). Chuột nhất sau đó được

tiêm trong tĩnh mạch bằng $1,1-2,2 \times 10^6$ tế bào KG2032-CAR-T cải biến hoặc các tế bào T đối chứng.

Mô hình chuột nhất ghép ngoại lai 4

DNA được chiết ra từ các tế bào bằng cách sử dụng bộ kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Việc phân loại HLA-DRB1 được thực hiện bởi Phòng thí nghiệm HLA (Kyoto, Nhật Bản). Các tế bào AML mang HLA-DRB1 phản ứng với KG2032 được sử dụng trong thử nghiệm này.

Việc cấy ghép nội tủy xương với các tế bào BM từ các bệnh nhân AML được thực hiện. Chuột nhất NOG cái từ 6 đến 8 tuần tuổi được chiếu xạ với lượng bức xạ 1,2Gy 4–24 giờ trước khi cấy ghép, sau đó được tiêm trong xương chày trái bằng 4×10^5 tế bào AML đã được làm thiếu hụt CD3. Sáu ngày sau, chuột nhất được tiêm trong tĩnh mạch bằng 2×10^6 tế bào KG2032-CAR-T cải biến hoặc tế bào T đối chứng. Một tháng sau khi truyền, các tế bào BM được nhuộm bằng kháng hCD45-Cy7APC(2D1, BioLegend), kháng hCD34-APC(8G12, BD Biosciences), kháng hCD3-PE(HIT3a, BioLegend), kháng mTer119-PerCPCy5,5(Ter-119, BioLegend), và kháng mCD45-Cy7PE(30-F11, BioLegend), và được phân tích bằng phép phân tích tế bào dòng chảy.

Các kết quả của các thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng các nguyên liệu nêu trên và các phương pháp được trình bày dưới đây.

Xác định kháng thể đơn dòng KG2032 đặc hiệu AML

Với mục đích thu được các kháng thể đơn dòng đặc hiệu AML (mAb), đầu tiên thiết lập được khoảng 14000 tế bào lai tiết ra các kháng thể đơn dòng (mAb) gắn kết với các dòng tế bào AML và các tế bào AML khác nhau, có nguồn gốc từ các tế bào tủy xương (BM) của các bệnh nhân AML.

Tiếp theo, từ các mAb này, 1078 mAb không gắn kết với các tế bào nào khác ngoài các tế bào B trong các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ người cho khỏe mạnh được chọn. Hơn nữa, các tế bào BM của bệnh nhân AML được nhuộm bằng các

mAb ứng viên này, và cuối cùng dòng vô tính có tên KG2032 là mAb gắn kết đặc hiệu với AML đã được xác định.

KG2032, như được thể hiện trên Fig.1A, không thể hiện sự gắn kết trong các PBMC nhất định có nguồn gốc từ người cho khỏe mạnh được sử dụng để sàng lọc. Mặt khác, như được thể hiện trên Fig.1B, KG2032 gắn kết với hầu hết tất cả các tế bào bệnh bạch cầu ở 7 trong số 14 bệnh nhân AML.

Xác định kháng nguyên được nhận biết bởi KG2032

Trong bước được thể hiện trên Fig.2A, việc xác định kháng nguyên được nhận biết bởi KG2032 được thực hiện. Trước tiên, thư viện CRISPR đã được làm bất hoạt gen hoàn bộ hệ gen người được đưa vào trong các tế bào Daudi biểu hiện protein Cas9 và các tế bào được cô đặc trong đó thư viện được đưa vào bằng cách sử dụng puromycin. Sau đó, các tế bào này được kéo dài, 2×10^8 tế bào được nhuộm bằng KG2032, và 5×10^6 phân đoạn của KG2032^{low} 5% được phân loại (Fig.2B).

Sau đó, nhờ việc phân tích các trình tự của gRNA được đưa vào trong các tế bào trước khi phân loại và vào trong các tế bào KG2032^{low} sau khi phân loại bằng cách sử dụng phương pháp giải trình tự thế hệ tiếp theo (NGS), HLA-DRA, HLA-DRB1, CIITA, và CD74 (Fig.2C) được xác định là các phân tử được hướng đích bởi các gRNA xen được làm giàu đáng kể trong các tế bào KG2032^{low}. Xét thấy rằng hai phân tử sau cần thiết cho HLA-DR để biểu hiện trên bề mặt tế bào, cho rằng KG2032 nhận biết HLA-DR. Do đó, việc phân tích gắn kết của KG2032 với các tế bào Daudi thiếu HLA-DR, như được thể hiện trên Fig.2D, gắn kết này không được quan sát thấy, điều này chỉ ra rõ ràng rằng kháng nguyên nhận biết bởi KG2032 là HLA-DR. Hơn nữa, như được thể hiện trên Fig.2E, 8 dòng vô tính trong số 32 dòng vô tính và khác với KG2032, và cũng đã làm rõ được rằng kháng nguyên nhận biết bởi 8 dòng vô tính là HLA-DR.

Các trình tự axit amin của các vùng biến đổi của các kháng thể kháng HLA-DR này của sáng chế được thể hiện trong các bảng 1 và 2 dưới đây. Các trình tự axit amin

của các CDR được xác định từ các vùng biến đổi bởi Kabat được thể hiện trong các bảng 3 và 4 dưới đây.

Bảng 1

Dòng vô tính số	Vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH)	
KG2032	QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYTFTD YAIHWFRQSHAKSLEWIGSISTYSGNPYNQ NFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSA IYYCARYSELVFDYWGQGTTLTVSS	(SEQ ID: 4)
KG19833	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTG YYMHWVKQSHGKSLEWIGRVNPDNGGTSY NQKFKGKAILTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDS AVYYCARNHYYGYSDYGMDYWGQGTSTVTV SS	(SEQ ID: 37)
KG1982	QVQLQQSGAVLARPGASVKLSCKASGYTFTS YWMQWVKQRPQGQLEWIGAIYPGDGDTRYT QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDS AVYYCAREGAYYVLFYWGQGTTLTVSS	(SEQ ID: 45)
aAML191872	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCRASGYTFTD YNIHWVKQSHGKSLEWIGYIYPYNGGTGYN QKFKSKATLTVNNSSSTAYMDLRSLTSEDS AVSYCAREARYPYGMDYWGQGTSTVTVSS	(SEQ ID: 53)
KG19130	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKD TYMHWVKQRPEQGLYWVGWIDPANGNTKH DPRFQDTATITADTTSTNTAYLQLSSLTSED TALYYCARSLRYWCFDVGAGTTVTVSS	(SEQ ID: 61)
KG19122	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTN HWMQWIKQRPQGQLEWIGAIYPGDGDTRY QKFKGKATVTDDKSSSTAYMQLSSLASEDS AVYYCARRGFGYYDVMDYWGQGTSTVTVSS	(SEQ ID: 69)
aAML191870	QVTLKESGPGILQSSQTLTSLTCSFSGFSLSTS GIGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWNDNYYYN TALRSRLTISKDTSNNQVFLKIASVDAADTAT YYCARSSYFGNHLYYFDYWGQGTTLTVSS	(SEQ ID: 73)
KG2053	EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIFSS YAMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGTYYIYPD SVKGRFTISRDNANKNTLYLQMSSLRSEDTA MYYCARGENWFAYWGQGTTLTVSA	(SEQ ID: 77)
KG19214	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTN HWMQWIKQRPQGQLEWIGAIYPGDGDTRY QKFKGKATVTDDKSSSTAYMQLSSLASEDS AVYYCARRGFGYYDVMDYWGQGTSTVTVSS	(SEQ ID: 69)

Bảng 2

Dòng vô tính số	Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL)	
KG2032	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIYS YLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF SGSGSGQDYSLTISSLEYEDLGIYYCLHNDE FPWTFGGGTKVEIK	(SEQ ID: 8)
KG19833	DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYY CQNDHSYPYTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 41)
KG1982	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTS GYNMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGV PARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQ HSRELPWTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 49)
aAML191872	DIQMTHTSPASLSASVGETVTITCRASGNIHN YLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLPDGVPSR FSGSGSGTQYSLKIYSLQTEDFGSYYCQHF WTPPYTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 57)
KG19130	DIVMTQSHKFMSTLVGDRVSITCKASQDVS TTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDR FTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQHY STPPTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 65)
KG19122	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVS TTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDR FTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQHY STPPTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 65)
aAML191870	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVS TTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDR FTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQHY STPPTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 65)
KG2053	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVS TTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDR FTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQHY STPPTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 65)
KG19214	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVS TTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDR FTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQHY STPPTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 79)

Bảng 3

Vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH)					
Dòng vô tính số	CDR1		CDR2		CDR3
		(SEQ ID: 1)	SISTYSGNPNNQNFKG	(SEQ ID: 2)	YSELVFDY
KG2032	DYAIH	(SEQ ID: 34)	RVNPDNGGTSYNQKFKG	(SEQ ID: 35)	NHYYGYSDYGMDY
KG19833	GYMH	(SEQ ID: 42)	AIYPGDGDTRYTQKFKG	(SEQ ID: 43)	EGAYVVLFDY
KG1982	SYWMQ	(SEQ ID: 50)	YIYPNGGTGYNQKFKS	(SEQ ID: 51)	EARYPYGMDY
aAML191872	DYNIH	(SEQ ID: 58)	WIDPANGNTKHDPRFQD	(SEQ ID: 59)	SLRYWCFDV
KG19130	DTYMH	(SEQ ID: 66)	AIYPGDGDTRYSQKFKG	(SEQ ID: 67)	RGFGYYDVMDY
KG19122	NHWMQ	(SEQ ID: 70)	HIWWNDNYYNTALRS	(SEQ ID: 71)	SSYFGNHLYYFDY
aAML191870	TSGIGVG	(SEQ ID: 74)	TISGGGTYYPPDSVKG	(SEQ ID: 75)	GENWFAY
KG2053	SYAMS	(SEQ ID: 66)	AIYPGDGDTRYSQKFKG	(SEQ ID: 67)	RGFGYYDVMDY
KG19214	NHWMQ				

Bảng 4

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL)						
Dòng vô tính số	CDR1		CDR2		CDR3	
KG2032	KASQDIYSYLS	(SEQ ID: 5)	RANRLVD	(SEQ ID: 6)	LHNDEFWPT	(SEQ ID: 7)
KG19833	KSSQSLLNSGNQKNYLA	(SEQ ID: 38)	GASTRES	(SEQ ID: 39)	QNDHSYPYT	(SEQ ID: 40)
KG1982	RASKSVSTSGYNYMH	(SEQ ID: 46)	LASNLES	(SEQ ID: 47)	QHSRELPWT	(SEQ ID: 48)
aAML191872	RASGNIHNYLA	(SEQ ID: 54)	NAKTLPD	(SEQ ID: 55)	QHFWTTPYT	(SEQ ID: 56)
KG19130	KASQDVSTTTVA	(SEQ ID: 62)	SASYRYT	(SEQ ID: 63)	QQHYSTPPT	(SEQ ID: 64)
KG19122	KASQDVSTTTVA	(SEQ ID: 62)	SASYRYT	(SEQ ID: 63)	QQHYSTPPT	(SEQ ID: 64)
aAML191870	KASQDVSTTTVA	(SEQ ID: 62)	SASYRYT	(SEQ ID: 63)	QQHYSTPPT	(SEQ ID: 64)
KG2053	KASQDVSTTTVA	(SEQ ID: 62)	SASYRYT	(SEQ ID: 63)	QQHYSTPPT	(SEQ ID: 64)
KG19214	KASQDVSTTTVA	(SEQ ID: 62)	SVSYRYT	(SEQ ID: 78)	QQHYSTPPT	(SEQ ID: 64)

Tính đặc hiệu alen của HLA-DRB1 được nhận biết bởi KG2032

Do tính đa hình cao của HLA-DRB1, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu các alen nào của HLA-DRB1 được nhận biết. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.3, KG2032 gắn kết với các tế bào K562 biểu hiện HLA-DRB1*0404, 0405, 0410, 0803, 0901, hoặc 1454. Mặt khác, KG2032 không gắn kết với các tế bào K562 biểu hiện HLA-DRB1*0101, 0403, 0802, 1101, hoặc 1502.

Hơn nữa, như được thể hiện trên Fig.4A, KG2032 không gắn kết với các tế bào bất kỳ nào trong số các PBMC từ người cho có gen HLA-DRB1 âm tính với KG2032 (0403/0802). Khi máu ngoại vi từ người cho có gen HLA-DRB1 dương tính với KG2032, nghĩa là 0901, được nhuộm, có sự gắn kết được quan sát thấy với các tế bào B và các tế bào T hoạt hóa, nhưng sự gắn kết này cực kỳ yếu so với kháng thể kháng HLA-DR L243 hiện có.

Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.4A, KG2032 không gắn kết với các tế bào đơn nhân hoặc một số tế bào T mà L243 gắn kết với, nghĩa là các tế bào biểu hiện HLA-DR. Ngoài ra, như được thể hiện trên Fig.4B, sự gắn kết của KG2032 với các tế bào bệnh bạch cầu đã quan sát thấy ở các bệnh nhân AML có gen HLA-DRB1 dương tính với KG2032.

Khi các tế bào tủy xương từ người cho có các gen HLA-DRB1 dương tính với KG2032 0410 và 0803 được nhuộm, sự gắn kết được quan sát thấy với các tế bào mầm tạo máu (CD34+CD38-) và các tế bào tiền thân tạo máu (CD34+CD38+), nhưng sự gắn kết này cực kỳ yếu so với kháng thể kháng HLA-DR L243 hiện có. Hơn nữa, như được thể hiện trên Fig.4C, KG2032 chỉ gắn kết với một nhóm rất nhỏ các tế bào mầm tạo máu mà L243 gắn kết với, nghĩa là các tế bào biểu hiện HLA-DR.

Từ các kết quả này, các ứng dụng ví dụ sau đây của KG2032 trong quá trình điều trị AML có thể được xem xét.

(1) Ở các bệnh nhân AML tái phát sau khi cấy ghép dị sinh không hợp đôi HLA-DR, nếu HLA-DR của người nhận (bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu) là loại dương tính với KG2032 và loại HLA-DR của người cho là loại âm tính với KG2032, các tế bào CAR-T có nguồn gốc KG2032 được tạo ra từ chính bệnh nhân được cấy ghép hoặc các tế bào T có nguồn gốc từ người cho sẽ tấn công đặc hiệu bệnh bạch cầu của người nhận (Fig.5A).

(2) KG2032 chỉ gắn kết với các tế bào nhất định như các tế bào B trong các tế bào máu bình thường, và nó không gắn kết với tất cả các tế bào mầm tạo máu đóng vai trò là nguồn của tất cả các tế bào máu. Do đó, ngay cả khi các tế bào CAR-T tự thân thông thường được sử dụng để điều trị ở các bệnh nhân AML có loại HLA-DRB1 dương tính với KG2032, các tế bào bệnh bạch cầu sẽ được loại bỏ, và sự tạo máu bình thường sẽ được duy trì bằng các tế bào âm tính với KG2032. Do đó, cho rằng đây là phương pháp điều trị khả thi (Fig.5B).

Xác định epitop được nhận biết bởi KG2032

Để xác định epitop được nhận biết bởi KG2032, các trình tự axit amin của HLA-DRB1*1454 (dương tính với KG2032) và HLA-DRB1*1502 (âm tính với KG2032) được so sánh (Fig.6). Hơn nữa, như được thể hiện trên Fig.7A, véc tơ biểu hiện biểu hiện protein khảm của HLA-DRB1*1454 và HLA-DRB1*1502 được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp PCR chồng lặp. Véc tơ này sau đó được đưa vào trong các tế bào K562 bởi retrovirus, và được nhuộm bằng KG2032 và L243 hai ngày sau để phân tích sự có mặt hoặc sự vắng mặt của sự gắn kết bằng cách phân tích tế bào dòng chảy. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.7B, Vùng3 (A.A. 74-89) được thể hiện trên Fig.6 đã được chứng minh là cần thiết cho sự gắn kết của KG2032.

Hơn nữa, khi so sánh các trình tự axit amin của Vùng3 của HLA-DRB1 mà gắn kết với KG2032 và HLA-DRB1 không gắn kết, như được thể hiện trên Fig.7C, đã nhận thấy rằng axit amin ở vị trí 86 luôn luôn là axit aspartic (D) trong HLA-DR không gắn

kết với KG2032, trong khi đó nó là serin (S), valin (V), hoặc alanin (A) trong HLA-DR gắn kết.

Do đó, serin (S) ở vị trí 86 của HLA-DRB1*0405, mà gắn kết với KG2032, được thay thế bằng axit aspartic (D) và được biểu hiện trong các tế bào K562. Kết quả là, phát hiện ra rằng sự gắn kết của L243 được duy trì, nhưng sự gắn kết của KG2032 đã bị mất đi, như được thể hiện trên Fig.7D.

Từ các phát hiện này, đã chứng minh được rằng để KG2032 gắn kết, axit amin ở vị trí 86 của Vùng3 phải là axit amin khác với axit aspartic (như serin, valin, hoặc alanin).

Phát triển các tế bào CAR-T có nguồn gốc từ người cho có DR không phản ứng với KG2032

Thụ thể kháng nguyên khảm chứa vùng biến đổi của KG2032 (KG2032-CAR) được chuẩn bị. Trước tiên, ADN bổ trợ của phần biến đổi của KG2032 thu được bằng phương pháp 5' RACE bằng cách sử dụng SMARTer RACE 5'/3' Kit (Takara), và trình tự của nó được xác định. Sau đó, như được thể hiện trên Fig.8A, chuỗi nhẹ (VL) và chuỗi nặng (VH) được dung hợp bằng cách sử dụng phương pháp PCR chồng lặp, có trình tự đoạn liên kết ở giữa. Sau đó, chuỗi này, cùng với CD28 và CD3 ζ , hoặc CD8 α , 4-1BB, và CD3 ζ , được dung hợp bằng phương pháp PCR chồng lặp, tạo ra hai loại KG2032-CAR (KG2032-CD28-CD3 ζ -CAR và KG2032-BBz-CAR). Cấu hình của các CAR này được thể hiện trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Peptit tín hiệu	Vị trí nhận dạng kháng nguyên (scFv)			Miền xuyên màng	Miền truyền tín hiệu nội bào	
	Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của KG2032 (Các vị trí 23-130)	Đoạn liên kết Whitlow/218 (Các vị trí 131-145)	Vùng biến đổi của chuỗi nặng của KG2032 (Các vị trí 146-262)		CD28 (Các vị trí 266-331)	CD28 (Các vị trí 332-372)
KG2032 - CD28-CD3ζ-CAR (SEQ ID : 9)	lgK (Các vị trí 1-22)					CD3ζ (Các vị trí 373-484)
KG2032 - BBz-CAR (SEQ ID : 10)	lgK (Các vị trí 1-22)				CD8α (Các vị trí 263-331)	4-1BB (Các vị trí 332-373)
改造KG2032 CAR (SEQ ID : 33)	lgKVIII (Các vị trí 1-19)				CD8α (Các vị trí 260-345)	4-1BB (Các vị trí 346-387)
						CD3ζ (Các vị trí 388-499)

Tiếp theo, KG2032 CAR được đưa vào trong các lympho bào T có nguồn gốc từ người cho có HLA-DRB1 âm tính với KG2032 (0403/0802) bằng cách sử dụng vector retrovirut, tạo ra các tế bào KG2032-CAR-T (Fig.8B và Fig.8C).

Do đó chuẩn bị được các tế bào CAR-T, khi được đồng nuôi cấy với các tế bào KG1a, mà KG2032 gắn kết với, tạo ra IFN- γ và IL-2, và biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào, như được thể hiện trên Fig.8D và Fig.8E. Mặt khác, khi được đồng nuôi cấy với các tế bào THP-1, mà KG2032 không gắn kết, quan sát thấy không có sự sản sinh xytokin hoặc hoạt tính gây độc tế bào.

Hơn nữa, các kết quả này đã được quan sát cho dù phân tử đồng kích thích là CD28 hoặc 4-1BB, nên trong các thử nghiệm sau đây, chỉ có KG2032-CAR (KG2032-BBz-CAR), trong đó 4-1BB là phân tử đồng kích thích, được đánh giá.

Tiếp theo, để ngăn chặn sự cạn kiệt của các tế bào CAR-T, một nỗ lực đã được thực hiện để bổ sung dasatinib, một chất ức chế tyrosin kinaza, trong quá trình tạo ra các tế bào CAR-T. Kết quả là, như được thể hiện trong các hình vẽ từ Fig.8F đến Fig.8H, việc xử lý bằng 1 μ M dasatinib đã thúc đẩy sự tăng sinh của các tế bào KG2032-BBz-CAR-T, trong lúc sự biểu hiện của các phân tử đánh dấu sự cạn kiệt (PD-1, TIM-3, và LAG-3) giảm xuống. Ngoài ra, IL-2 sự sản sinh xytokin trong quá trình đồng nuôi cấy với KG1a tăng lên.

Tiếp theo, sau khi cấy ghép các tế bào KG1a biểu hiện luxiferaza vào trong chuột nhắt NOG, các tế bào KG2032-BBz CAR-T được sử dụng, và tác dụng kháng bệnh bạch cầu của nó được đánh giá. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.8I và Fig.8J, đã quan sát thấy tác dụng kháng bệnh bạch cầu rõ rệt.

Phát triển các tế bào CAR-NK có nguồn gốc từ người cho có DR không phản ứng với KG2032

Vector để đồng biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm được dung hợp vào vùng biến đổi của KG2032 có CD28 và CD3 ζ và IL-15 được tạo ra. Sau đó, các tế bào NK

biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm này (các tế bào CAR-NK) được chuẩn bị và được đồng nuôi cấy với dòng tế bào có nguồn gốc từ bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính ở người (các tế bào KG1a). Kết quả là, mặc dù không được thể hiện trong các hình vẽ, các tế bào CAR-NK còn được phát hiện là thể hiện hoạt tính gây độc tế bào. Hơn nữa, phát hiện ra rằng khi các tế bào CAR-NK được sử dụng cho chuột nhất được cấy ghép các tế bào KG1a, cũng đã quan sát thấy tác dụng kháng u rõ rệt.

Để giải thích cụ thể, các tác giả sáng chế đã tạo ra các cấu trúc KG2032 CAR cho các tế bào CAR-NK bằng cách dung hợp các vùng biến đổi của KG2032, CD28, và CD3 ζ . Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã thiết kế vectơ retrovirus để đồng biểu hiện IL-15 cùng với KG2032 CAR để gia tăng sự tăng sinh và sự sống sót của các tế bào CAR-NK. Các tác giả sáng chế đã kéo dài các tế bào NK từ các tế bào CB của người bị giảm tế bào T mang HLA-DRB1 không phản ứng với KG2032 nhờ sự kích thích bằng các tế bào K562 đã được chiếu xạ biểu hiện phối tử 4-1BB và IL-15 gắn kết màng. Mười bốn ngày sau khi bắt đầu nuôi cấy, các tác giả sáng chế đã phân tích các tế bào NK có nguồn gốc từ CB mà đã được tải nạp retrovirus bằng KG2032 CAR/IL-15 (Fig.9A-Fig.9C).

Sự mất hạt CD107a gia tăng đáng kể trong các tế bào KG2032 CAR-NK so với các tế bào NK không được tải nạp khi đồng nuôi cấy với các tế bào KG1a hoặc các tế bào AML nguyên phát có nguồn gốc từ bệnh nhân, nhưng không tăng trong các tế bào KG1a thiếu hụt HLA-DRB1 (Fig.9D).

Các tế bào KG2032 CAR-NK sử dụng hoạt tính gây độc tế bào đáng kể chống lại các tế bào KG1a và các tế bào AML nguyên phát có nguồn gốc từ bệnh nhân, nhưng không chống lại các tế bào KG1a thiếu hụt HLA-DRB1 (Fig.9E).

Hơn nữa, các tế bào KG2032 CAR-NK làm giảm đáng kể gánh nặng bệnh bạch cầu và kéo dài sự sống trong mô hình ghép ngoại lai ở chuột nhất đã nêu ở trên dựa trên sự cấy ghép tế bào KG1a AML (Fig.9F-Fig.9H).

Phát triển các tế bào KG2032 CAR-T cải biến

Hội chứng giải phóng xytokin (cytokine release syndrome, CRS) nghiêm trọng có thể làm gia tăng sự biểu hiện HLA-DR trong các mô không tạo máu. Do đó, CRS nghiêm trọng nên được tránh để tối đa hóa sự an toàn của các tế bào KG2032-CAR-T. Đã báo cáo rằng việc cải biến các cấu trúc CAR có thể ngăn ngừa CRS nghiêm trọng mà không làm mất đi hiệu quả của các tế bào CAR-T (Ying,Z. et al. A safe and potent anti CD19 CAR-T cell therapy. Nat Med 25, 947-953 (2019). <https://doi.org:10.1038/s41591-019-0421-7>). Do đó, để làm giảm sự sản sinh xytokin bằng các tế bào CAR-T trong quá trình đồng nuôi cấy với các tế bào AML, các tác giả sáng chế đã thay đổi trật tự của chuỗi nặng (VH) và chuỗi nhẹ (VL) trong miền nhận diện kháng nguyên, kéo dài chiều dài của vùng bản lề/xuyên màng của CD8 α , và do đó cấu trúc KG2032 CAR được cải biến. Hơn nữa, để làm suy yếu thêm nữa tín hiệu hoạt hóa CAR, các đột biến được đưa vào trong hai trong số ba miền motif hoạt hóa trên cơ sở thụ thể miễn dịch tyrosin (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) của trình tự CD3 ζ (Feucht,J. et al. Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. Nat Med 25,82-88(2019)). Lưu ý rằng, cấu trúc của KG2032 CAR cải biến này được thể hiện trong bảng 5 ở trên.

Trước tiên, các tác giả sáng chế đã phân tích sự tiết IFN- γ bởi các tế bào KG2032-CAR-T ban đầu hoặc các tế bào KG2032-CAR-T cải biến sau khi đồng nuôi cấy với các tế bào KG1a AML. Kết quả là, sự tiết IFN- γ bởi các tế bào KG2032-CAR-T cải biến được giảm so với các tế bào KG2032-CAR-T ban đầu, và xác nhận được rằng các đột biến này làm suy yếu tín hiệu hoạt hóa CAR.

Tiếp theo, các tác giả sáng chế đã phân tích các mức tiết IFN- γ và IL-2 bởi các tế bào KG2032-CAR-T cải biến sau khi đồng nuôi cấy với các tế bào biểu mô ruột bình thường được tinh chế từ ruột non chưa bị ảnh hưởng của các bệnh nhân mắc bệnh ung thư kết tràng hoặc các tế bào KG1a. Kết quả là, các tế bào KG2032-CAR-T cải biến không được hoạt hóa bằng cách đồng nuôi cấy với các tế bào biểu mô ruột bình thường

mang HLA-DRB1 phản ứng với KG2032. Mặt khác, các tế bào KG2032-CAR-T cải biến duy trì hoạt tính gây độc tế bào chống lại các tế bào KG1a AML và các tế bào AML nguyên phát có nguồn gốc từ bệnh nhân.

Ngoài ra, các tế bào KG2032-CAR-T cải biến được sử dụng cho chuột nhắt được cấy ghép các tế bào KG1a AML. Kết quả là, bằng cách sử dụng các tế bào KG2032-CAR-T cải biến đã làm giảm đáng kể số lượng của các tế bào KG1a AML được ghép trong chuột nhắt và kéo dài thời gian sống của chúng. Lưu ý rằng, không quan sát thấy độc tính rõ ràng nào ở chuột nhắt được điều trị bằng các tế bào KG2032-CAR-T cải biến.

Hơn nữa, các tế bào KG2032-CAR-T cải biến được sử dụng cho chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch được cấy ghép các tế bào AML có nguồn gốc từ bệnh nhân (Fig.10A). Kết quả là, các tế bào KG2032-CAR-T cải biến đã tiêu diệt các tế bào AML nguyên phát được ghép ở chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch (Fig.10B và Fig.10C). Lưu ý rằng, không quan sát thấy độc tính rõ ràng nào ở chuột nhắt được sử dụng các tế bào KG2032-CAR-T cải biến.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Như được mô tả ở trên, theo sáng chế, bằng cách hướng đích HLA-DR, là kháng nguyên bề mặt tế bào đặc hiệu với các bệnh ung thư máu như bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, nên có thể điều trị bệnh bằng cách sử dụng các kháng thể nhận biết kháng nguyên này hoặc các đoạn chức năng của nó, hoặc bằng cách sử dụng thụ thể kháng nguyên khảm hoặc loại tương tự có nó.

Đặc biệt là, các kháng thể như vậy có thể thể hiện tính đặc hiệu alen đối với HLA-DR. Đối với các bệnh nhân ung thư máu tái phát sau khi cấy ghép dị sinh không hợp đôi HLA-DR, nếu HLA-DR của người nhận (bệnh nhân ung thư máu) là loại dương tính gắn kết với kháng thể của sáng chế, và loại HLA-DR của người cho là loại âm tính không gắn kết với kháng thể của sáng chế, sau đó các tế bào CAR-T có nguồn gốc từ

kháng thể của sáng chế được tạo ra từ các tế bào có nguồn gốc từ người cho có thể tấn công đặc hiệu các tế bào ung thư máu của người nhận.

Hơn nữa, nếu kháng thể của sáng chế gắn kết chỉ với một số tế bào, như các tế bào B, trong các tế bào máu bình thường và không gắn kết với các tế bào đơn nhân và tương tự, ngay cả khi các tế bào CAR-T tự thân bình thường và tương tự được sử dụng để điều trị trong các bệnh nhân ung thư máu có HLA-DR dương tính gắn kết với kháng thể của sáng chế, các tế bào ung thư máu được loại bỏ, sự tạo máu bình thường được duy trì bởi các tế bào âm tính không gắn kết với kháng thể của sáng chế, làm cho việc điều trị trở nên khả thi.

Do đó, sáng chế có thể được sử dụng trong các tác nhân trị liệu cho bệnh ung thư máu và sự phát triển của bệnh này, và tương tự.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm để điều trị bệnh ung thư máu, trong đó chế phẩm này bao gồm: kháng thể nhận biết HLA-DR hoặc đoạn chức năng của nó.
2. Chế phẩm theo điểm 1, bao gồm: tế bào miễn dịch biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó.
3. Chế phẩm theo điểm 1, bao gồm: kháng thể đa đặc hiệu có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó và vị trí nhận biết kháng nguyên đối với tế bào miễn dịch.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó không gắn kết với các tế bào đơn nhân.
5. Chế phẩm theo điểm 4, bao gồm: tế bào miễn dịch biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó.
6. Chế phẩm theo điểm 4, bao gồm: kháng thể đa đặc hiệu có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó và vị trí nhận biết kháng nguyên đối với tế bào miễn dịch.
7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó gắn kết với loại alen của HLA-DRB1 trong đó vị trí 86 là axit amin khác với axit aspartic, nhưng không gắn kết với loại alen của HLA-DRB1 mà vị trí 86 là axit aspartic.
8. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó kháng thể:

gắn kết với vùng chứa trình tự axit amin từ các vị trí 74 đến 89 của HLA-DRB1, trong đó axit amin ở vị trí 86 là axit amin khác với axit aspartic, nhưng

không gắn kết với vùng chứa trình tự axit amin từ các vị trí 74 đến 89 của HLA-DRB1, trong đó axit amin ở vị trí 86 là axit aspartic.
9. Kháng thể nhận biết HLA-DR hoặc đoạn chức năng của nó, có dấu hiệu được mô tả trong một trong số các mục từ (a) đến (i) sau đây:

(a) bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 1 đến 3, tương ứng,

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 5 đến 7, tương ứng;

(b) bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 34 đến 36, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 38 đến 40, tương ứng;

(c) bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 42 đến 44, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 46 đến 48, tương ứng;

(d) bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 50 đến 52, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 54 đến 56, tương ứng;

(e) bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 58 đến 60, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64, tương ứng;

(f) bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 66 đến 68, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64, tương ứng;

(g) bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 70 đến 72, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64, tương ứng;

(h) bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 74 đến 76, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62 đến 64, tương ứng; và

(i) bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 66 đến 68, tương ứng, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ từ 1 đến 3 chứa các trình tự axit amin được nêu trong các SEQ ID NO: 62, 78 và 64, tương ứng.

10. Tế bào miễn dịch biểu hiện thụ thể kháng nguyên khảm có kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 8 hoặc 9.

11. Dược phẩm bao gồm: tế bào miễn dịch biểu hiện kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó theo điểm 8 hoặc 9, hoặc thụ thể kháng nguyên khảm bao gồm kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó.

12. Chế phẩm được sử dụng cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư máu đã được cấy ghép các tế bào mầm tạo máu,

trong đó chế phẩm này bao gồm kháng thể nhận biết HLA-DR hoặc đoạn chức năng của nó,

người cho các tế bào mầm tạo máu và bệnh nhân có các loại alen HLA-DR khác nhau, và

kháng thể hoặc đoạn chức năng của nó gắn kết với HLA-DR của bệnh nhân nhưng không gắn kết với HLA-DR của người cho.

Fig. 1A

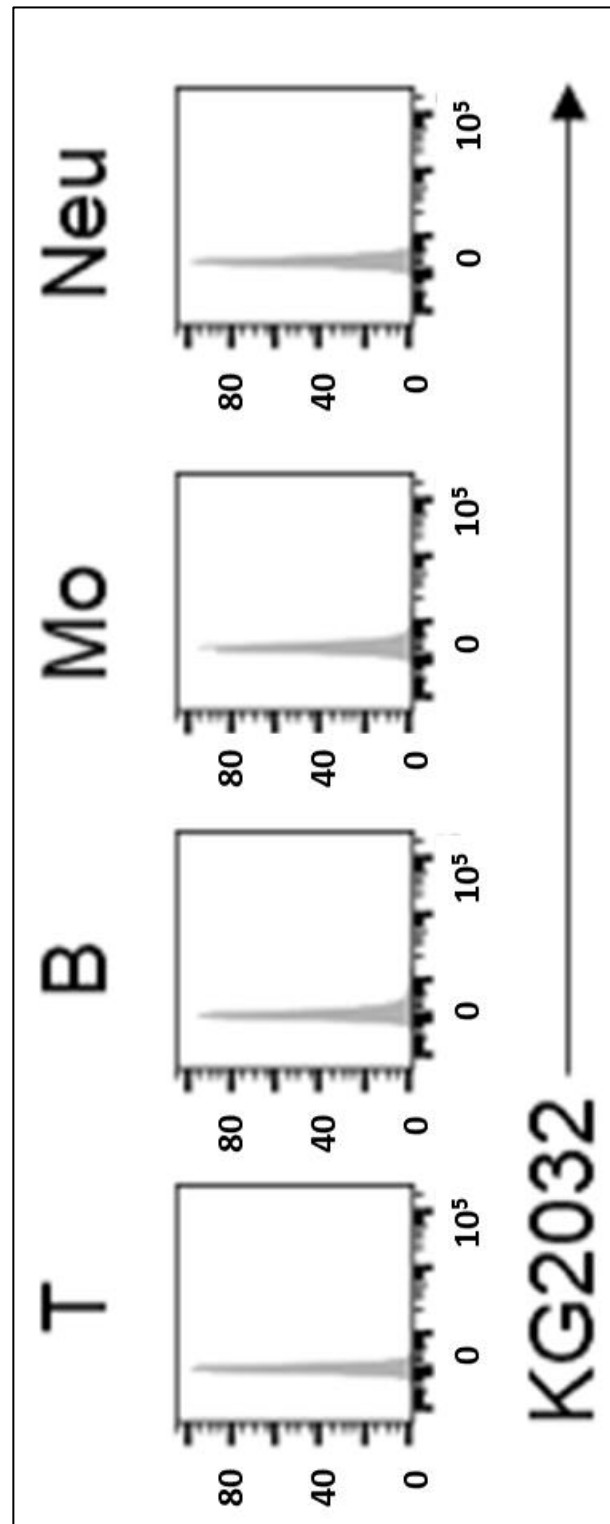


Fig. 1B

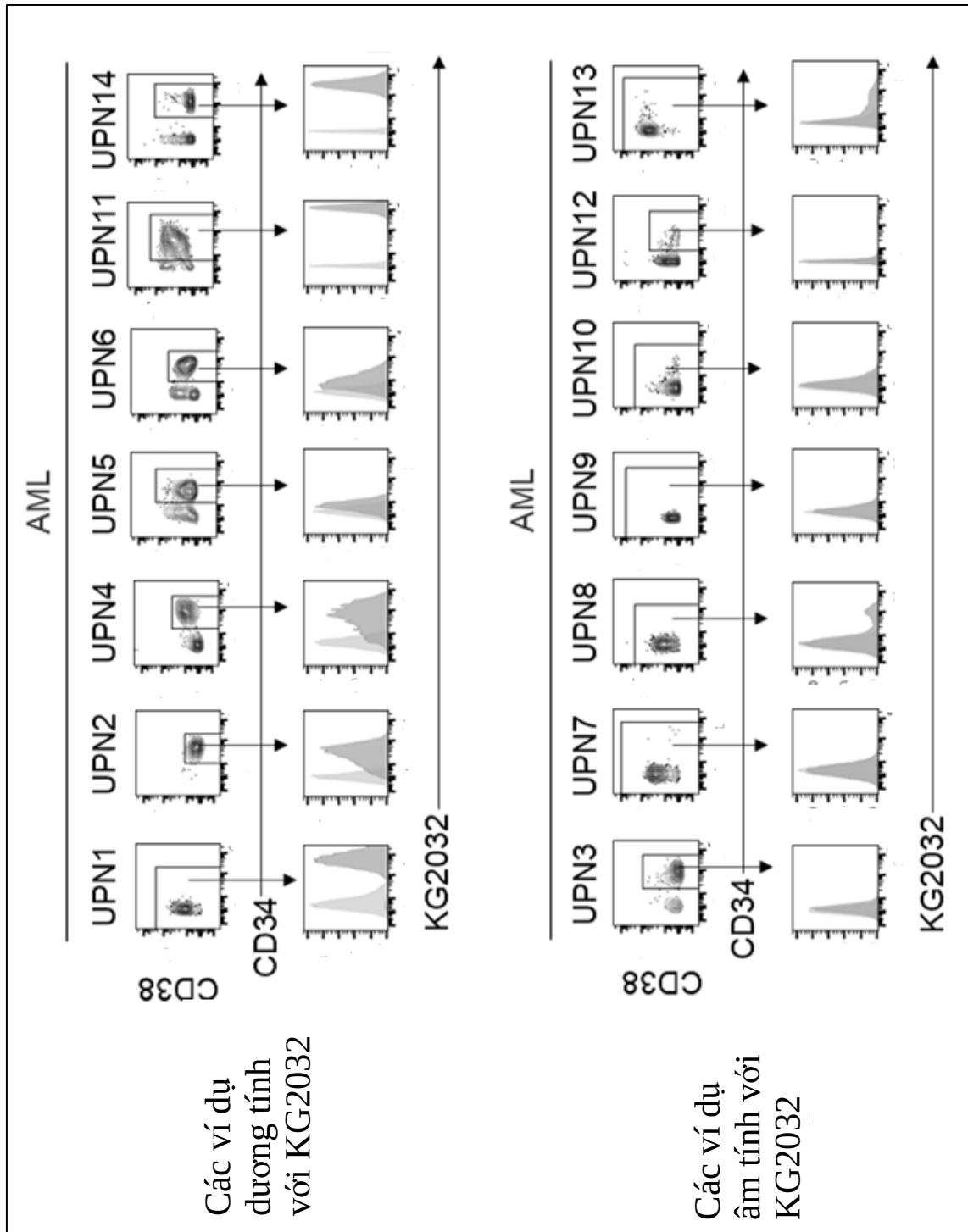


Fig. 2A

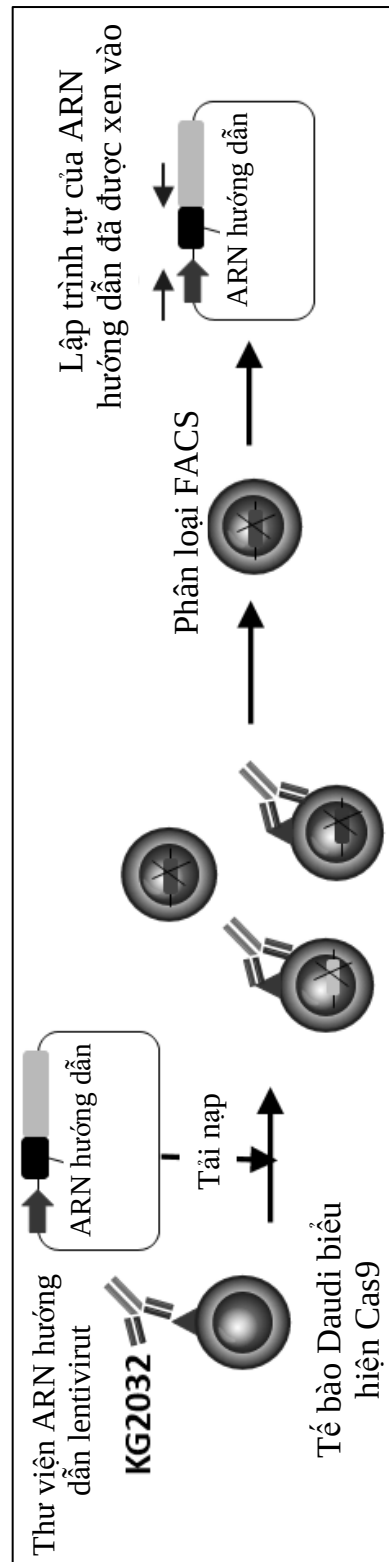


Fig. 2B

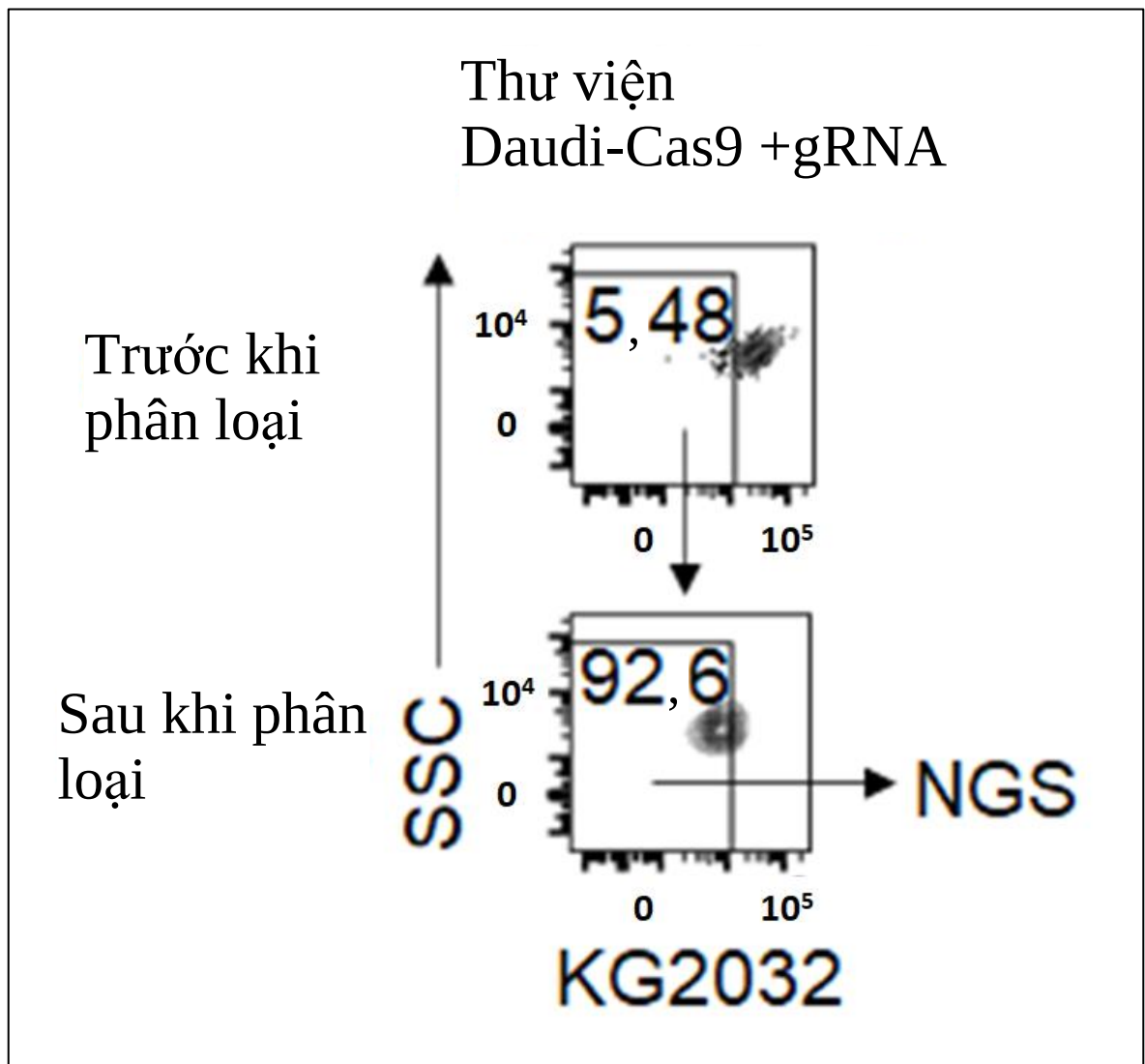


Fig. 2C

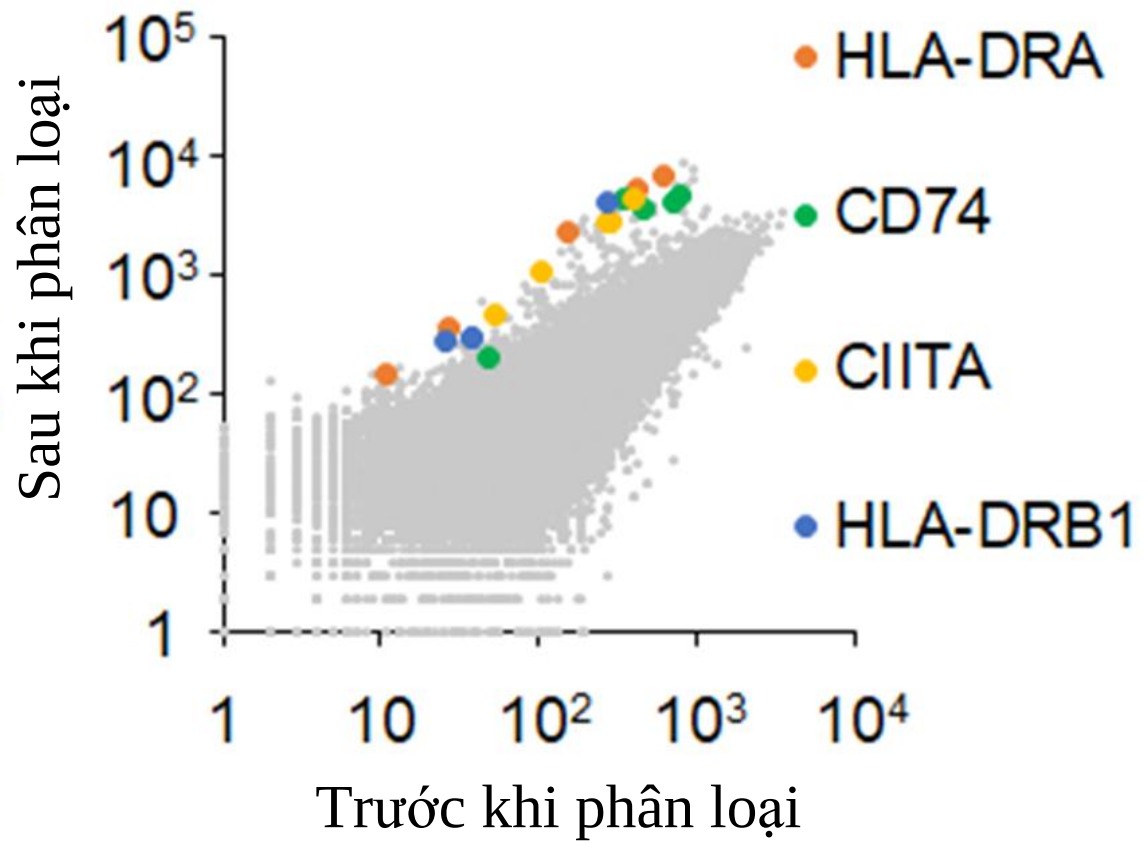


Fig. 2D

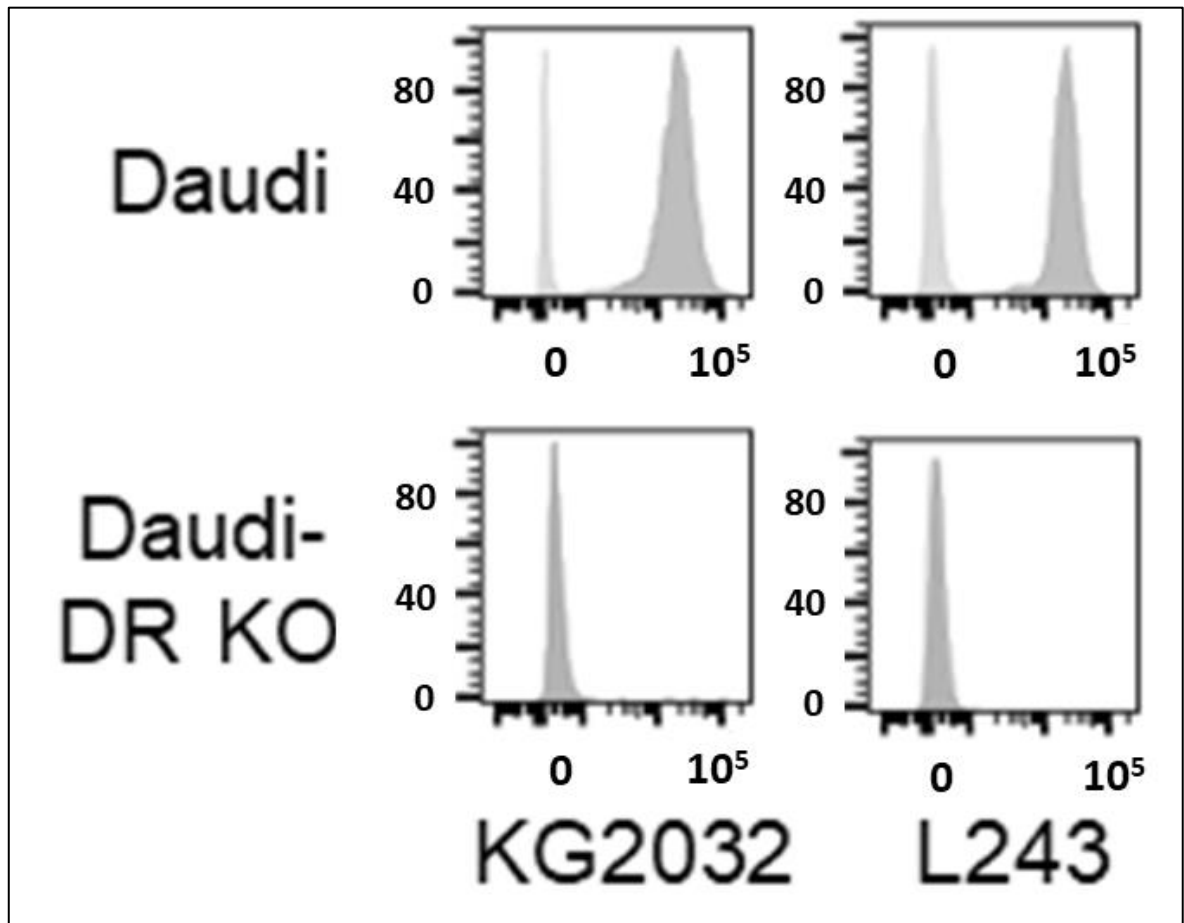


Fig. 2E

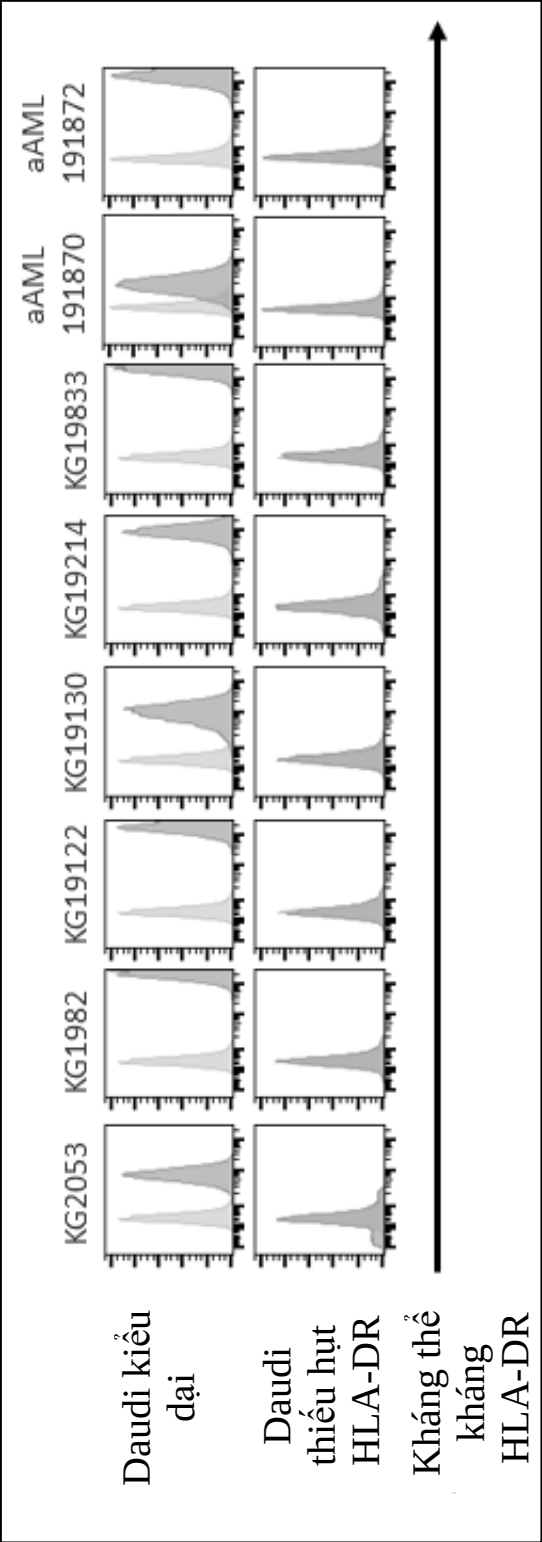


Fig. 3

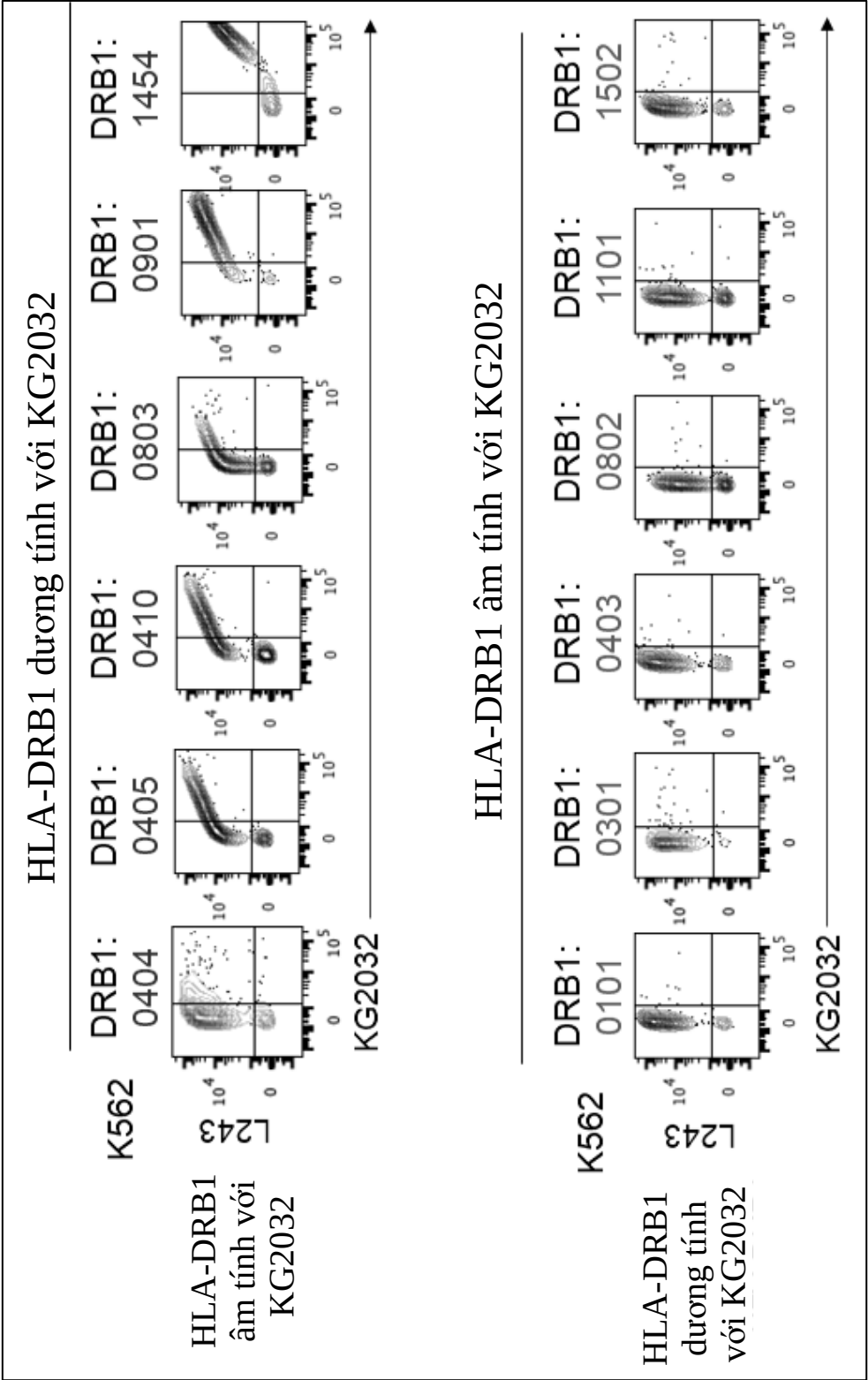


Fig. 4A

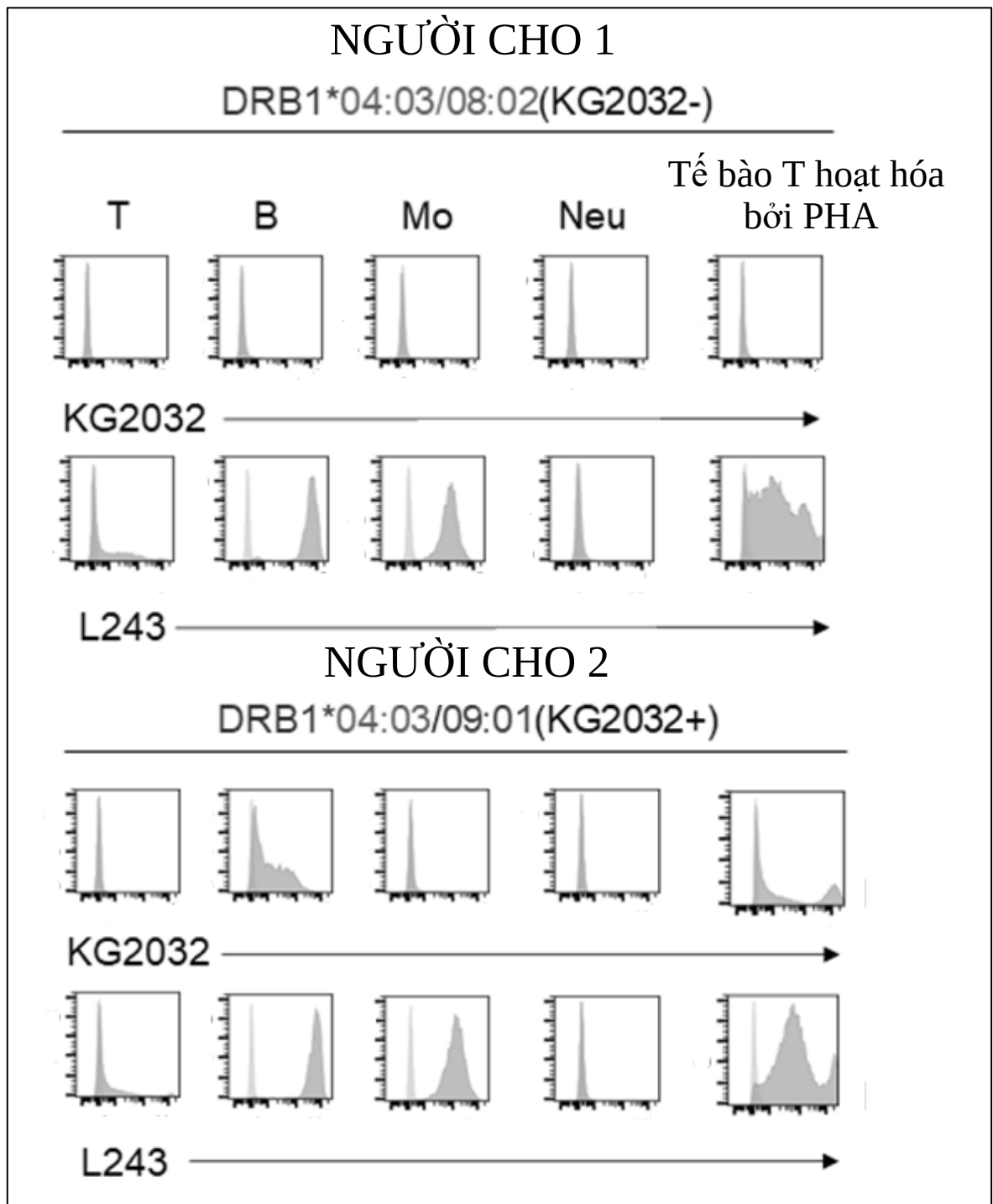


Fig. 4B

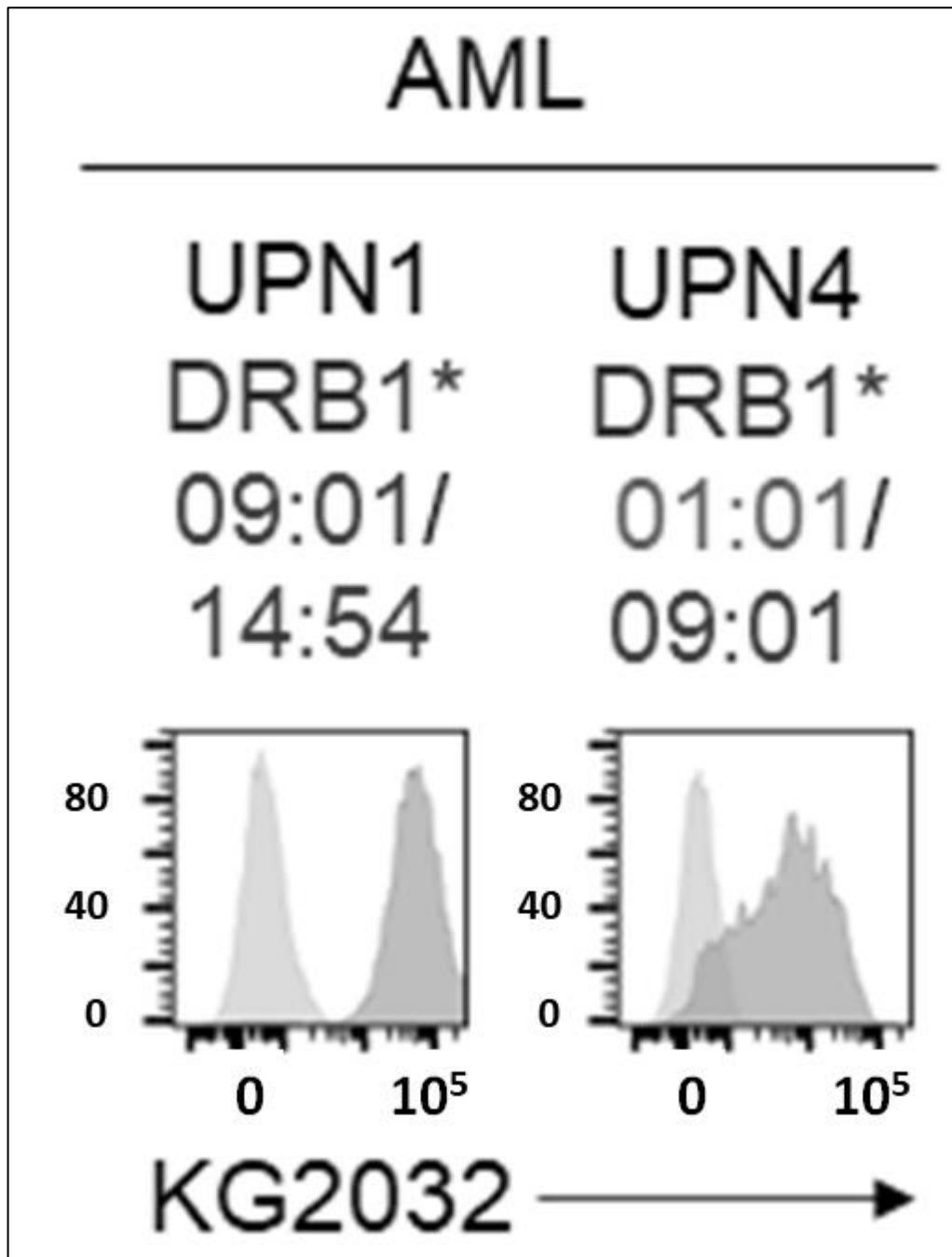


Fig. 4C

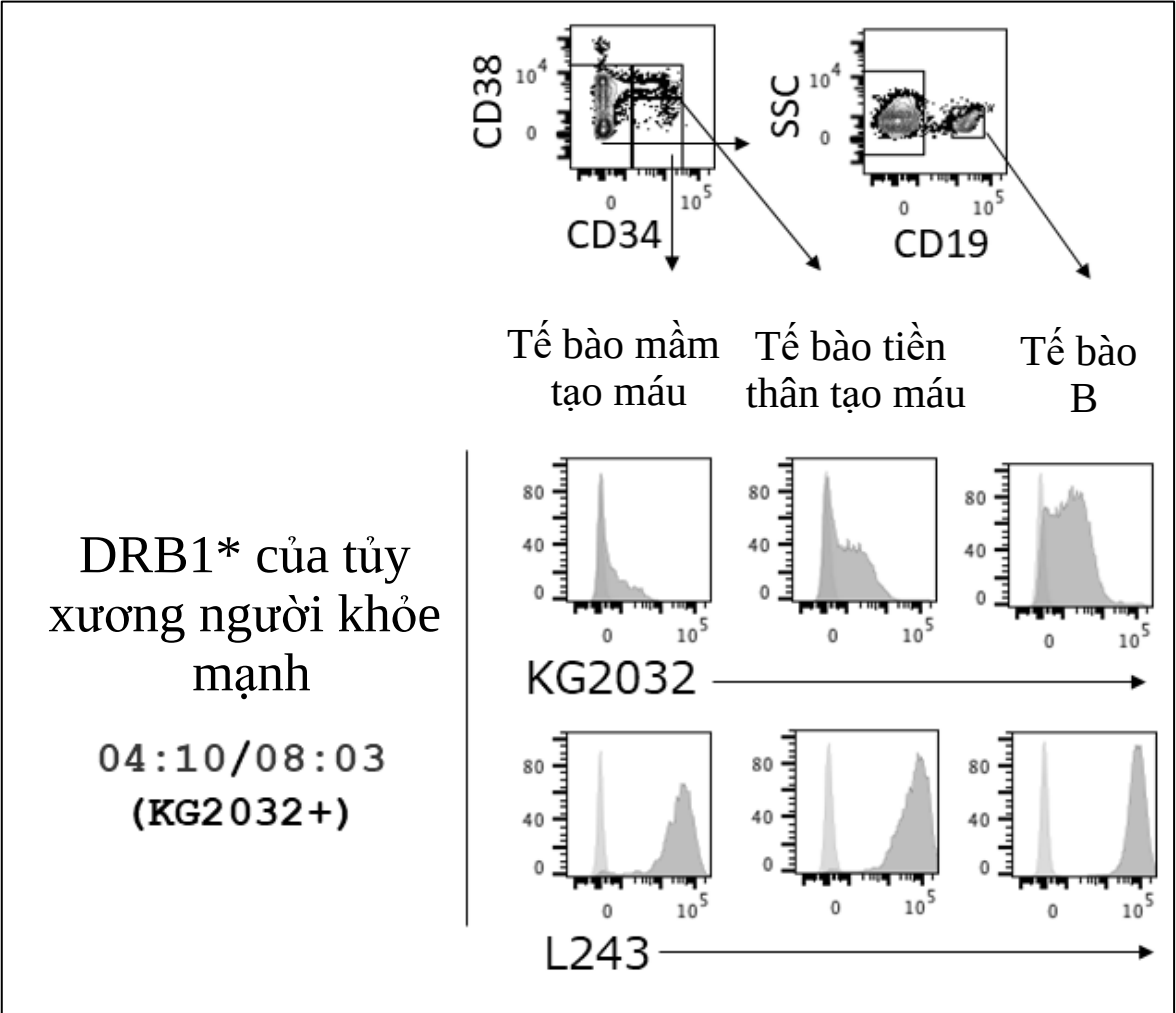


Fig. 5A

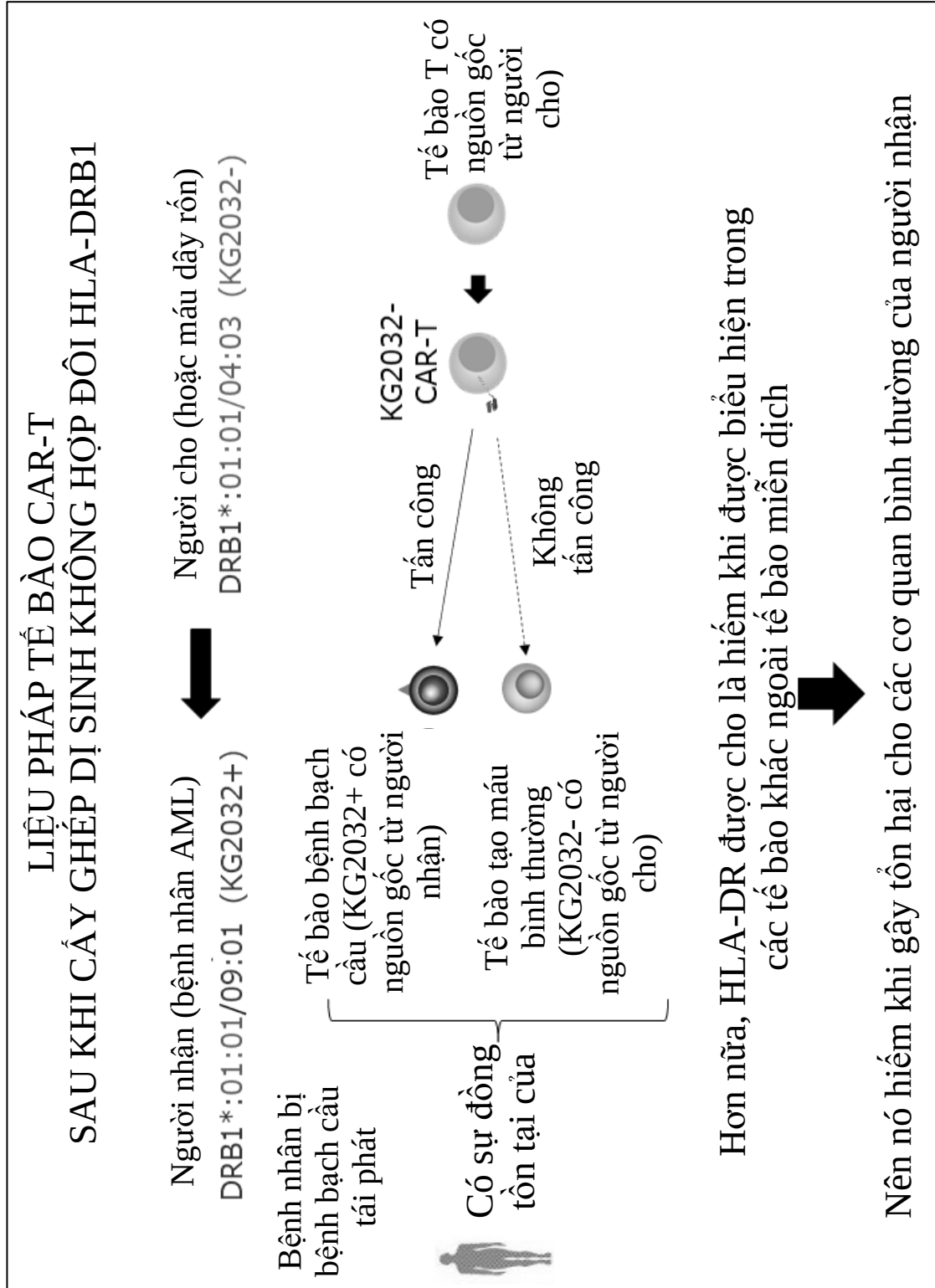


Fig. 5B

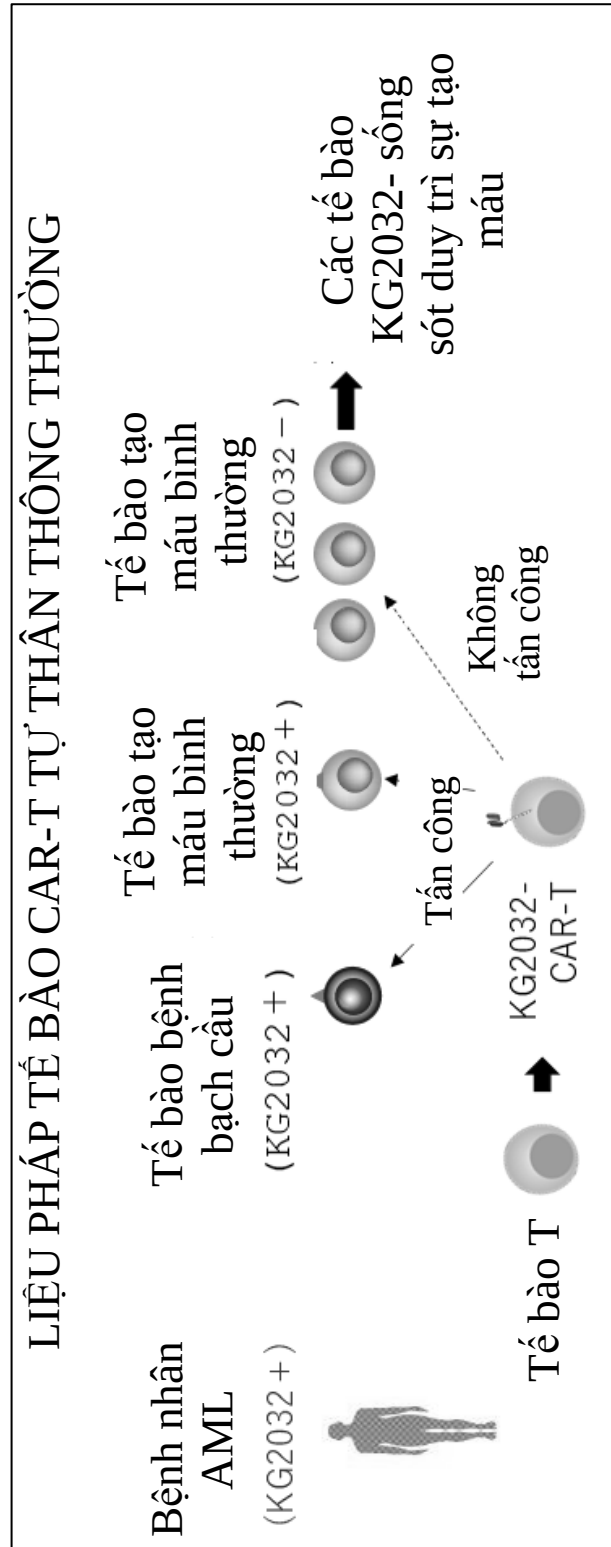


Fig. 6

	Vùng1	Vùng2
DRB1*1454 1: MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSSPLALAGDTRPRF	LEYSTSECHF	FNGTERVRFLD RYFHNQEEFVRF 69
DRB1*1502 1: MVCLKLPGGSCMTALTVTLMVLSSPLALSGDTRPRF	LWQPKRECHF	FNGTERVRFLD RYFYNQEEFVRF 69
	Vùng3	Vùng4
DRB1*1454 70: DSDVGEYRAVTELGRPAAEH	WNSQKDLLERRRAEVDI	YCRHNY GVWESFTVQRRVHPKV TVYP 132
DRB1*1502 70: DSDVGEFRAVTELGRPD AEY	WNSQKDILEQARA AAVDT	YCRHNY GVWESFTVQRRVQPKV TVYP 132
DRB1*1454 133: SKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGWSTGLI 177		
DRB1*1502 133: SKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFLNGQEEKAGMVSTGLI 177		DRB1*1454: KG2032+ DRB1*1502: KG2032-

Fig. 7A

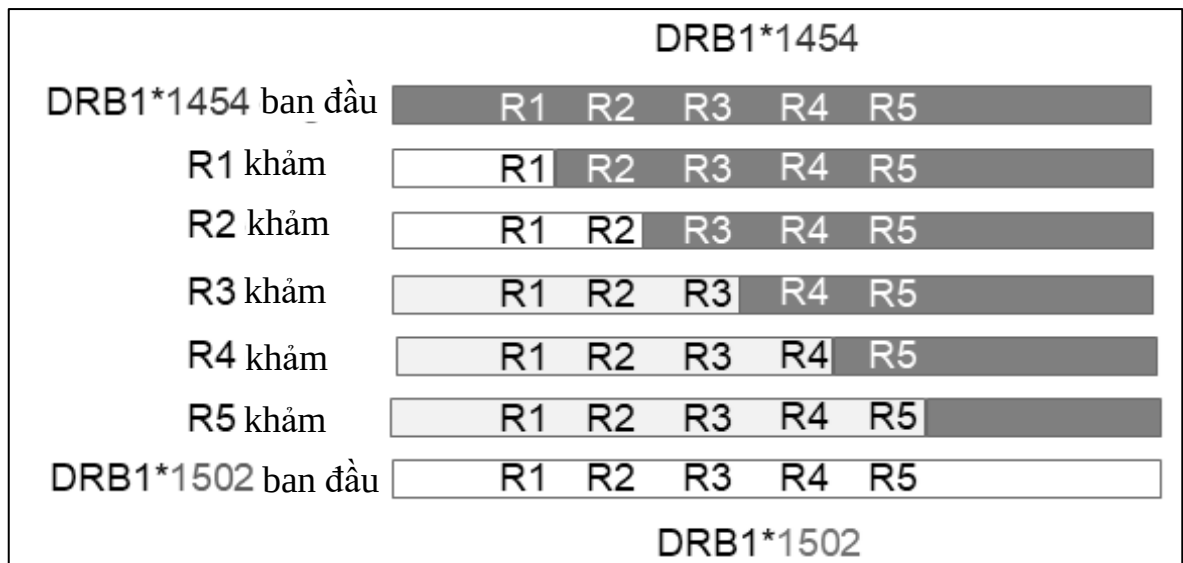


Fig. 7B

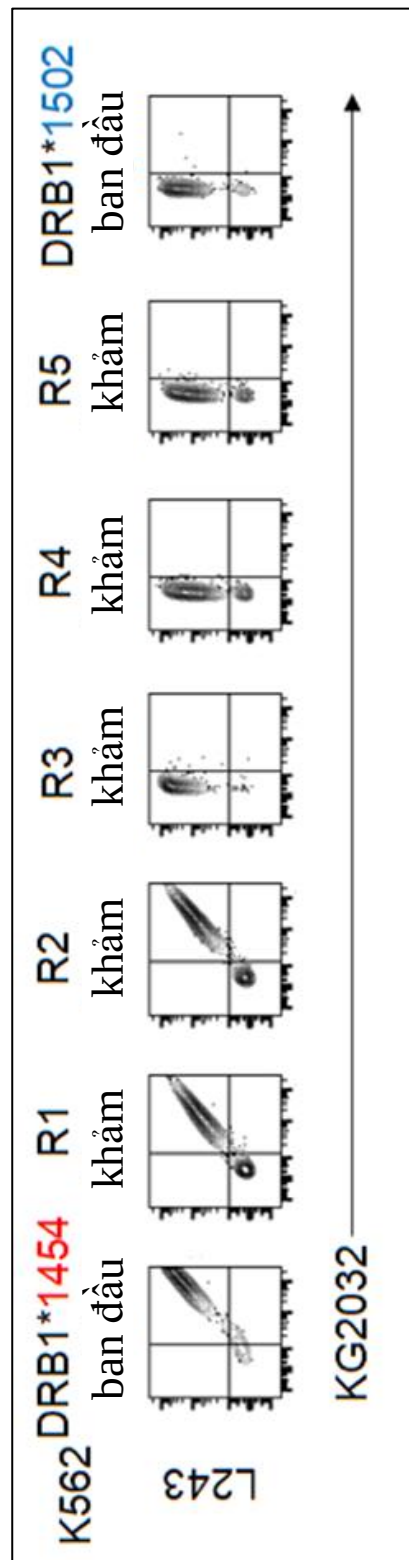


Fig. 7C

Vùng3	
	74 86 89
KG2032+	DRB1*0405 GEYRAVTELGRPSAEY
	DRB1*0410 GEYRAVTELGRPSAEY
	DRB1*0701 GEYRAVTELGRPVAES
	DRB1*0803 GEYRAVTELGRPSAEY
	DRB1*0901 GEYRAVTELGRPVAES
	DRB1*1201 GEFRAVTELGRPVAES
	DRB1*1454 GEYRAVTELGRPAAEH
KG2032-	DRB1*0101 GEYRAVTELGRPDAEY
	DRB1*0301 GEFRAVTELGRPDAEY
	DRB1*0403 GEYRAVTELGRPDAEY
	DRB1*0404 GEYRAVTELGRPDAEY
	DRB1*0802 GEYRAVTELGRPDAEY
	DRB1*1101 GEFRAVTELGRPDEEY
	DRB1*1301 GEFRAVTELGRPDAEY
	DRB1*1302 GEFRAVTELGRPDAEY
	DRB1*1403 GEYRAVTELGRPDAEY
	DRB1*1405 GEYRAVTELGRPDAEY
	DRB1*1406 GEYRAVTELGRPDAEY
	DRB1*1501 GEFRAVTELGRPDAEY
	DRB1*1502 GEFRAVTELGRPDAEY

Fig. 7D

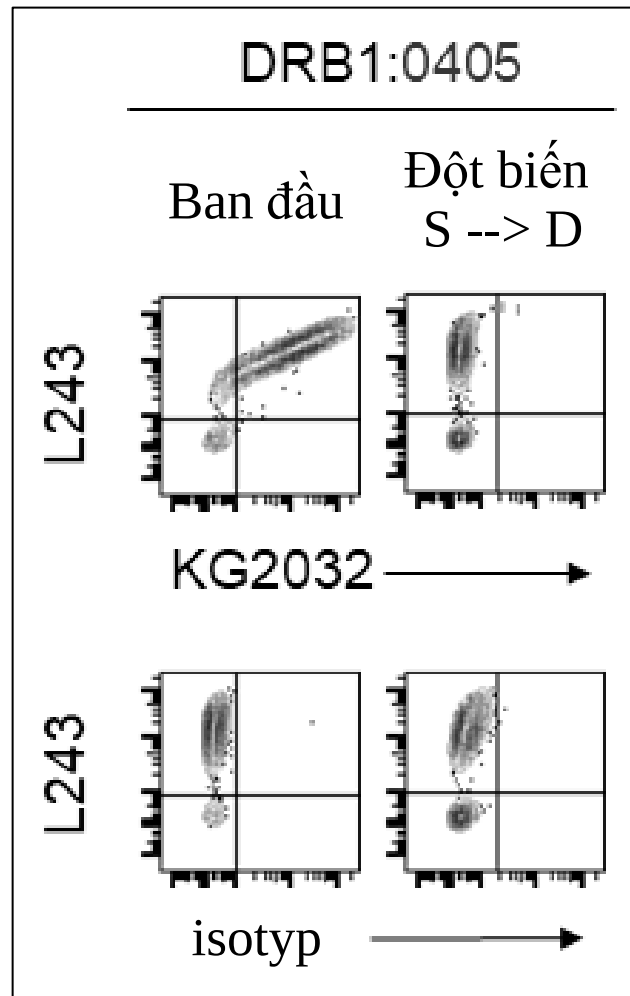


Fig. 8A

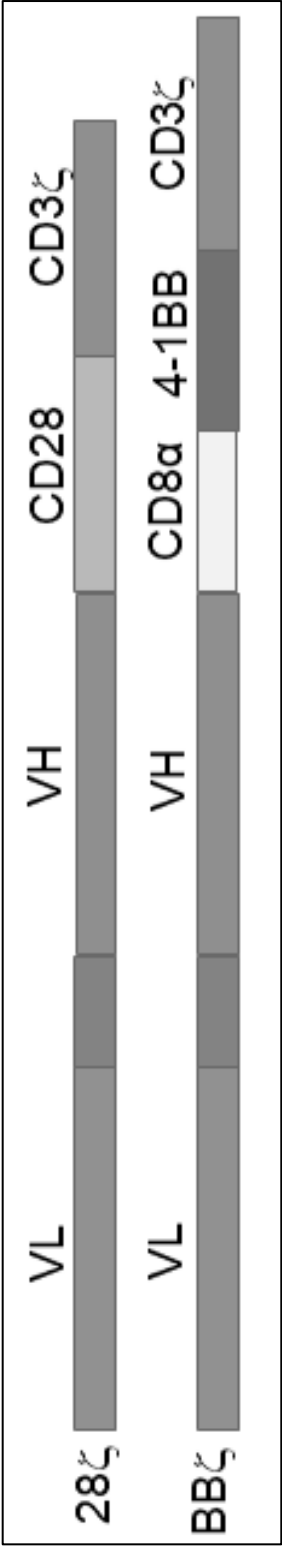


Fig. 8B

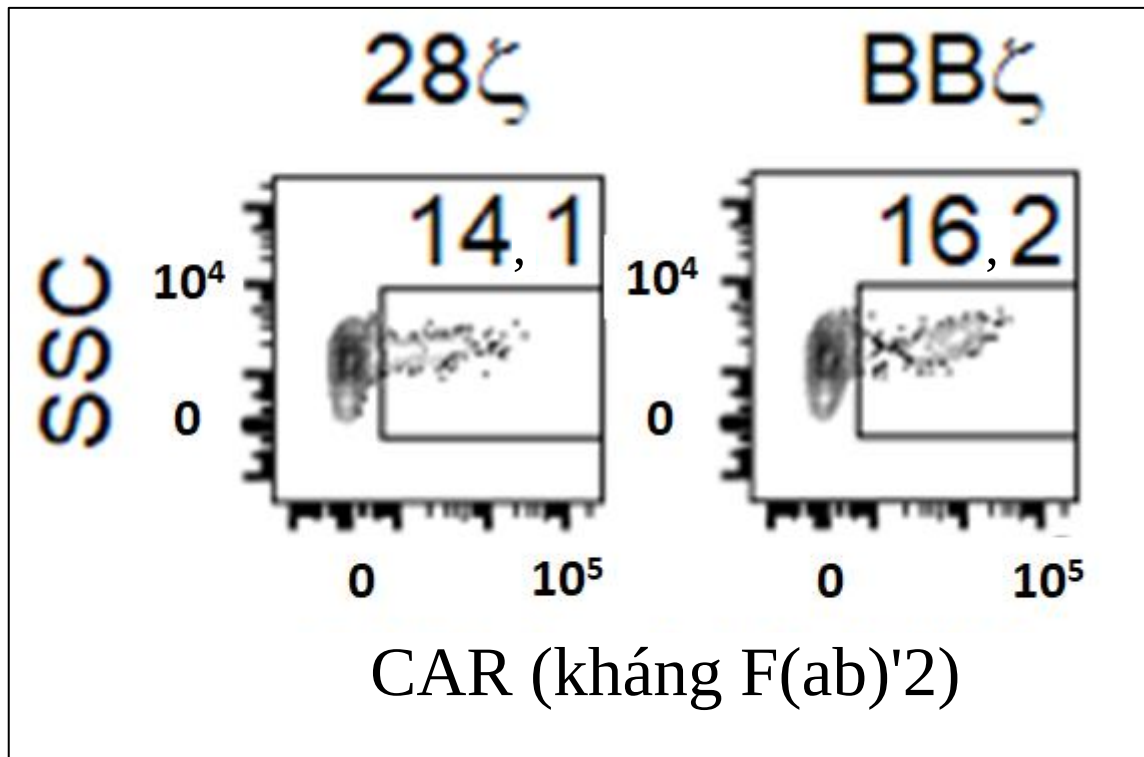


Fig. 8C

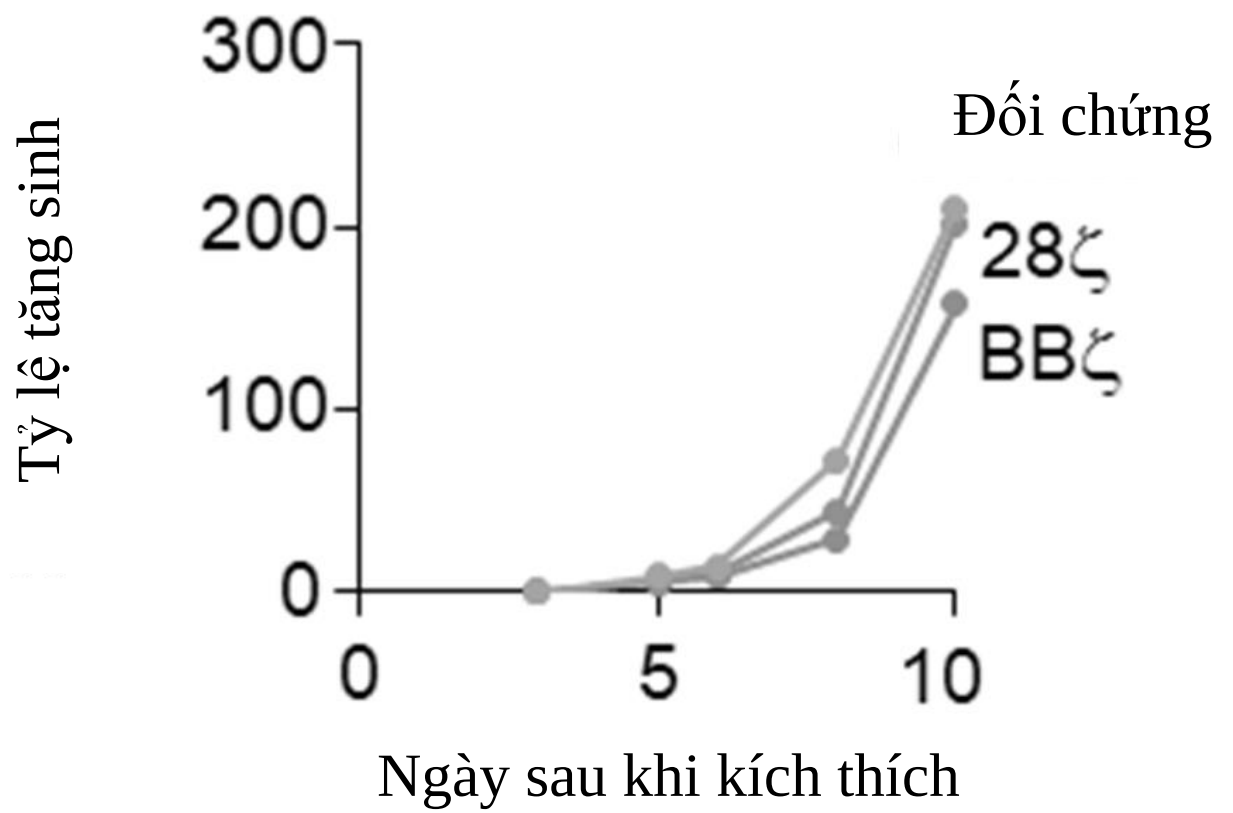


Fig. 8D

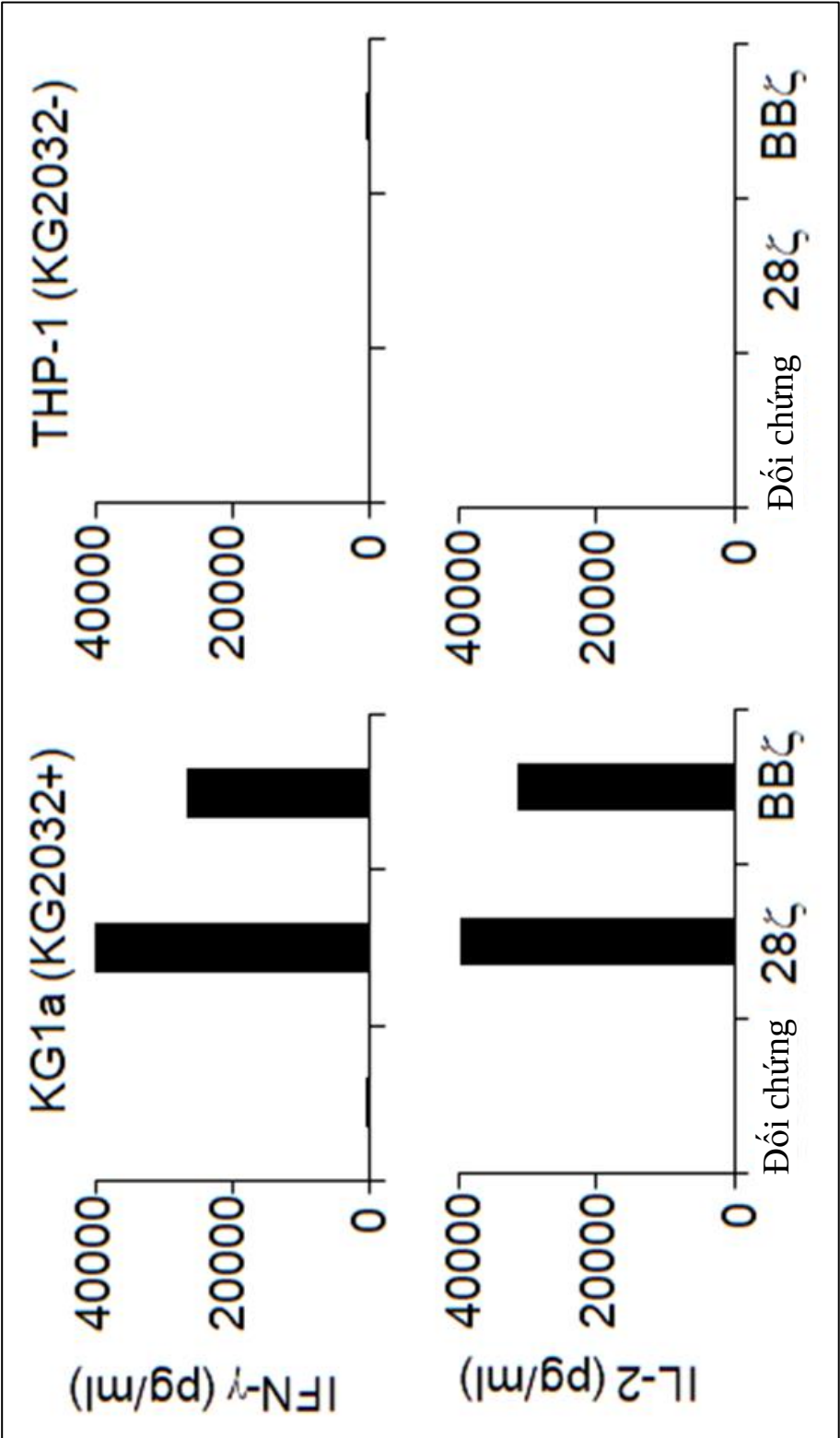


Fig. 8E

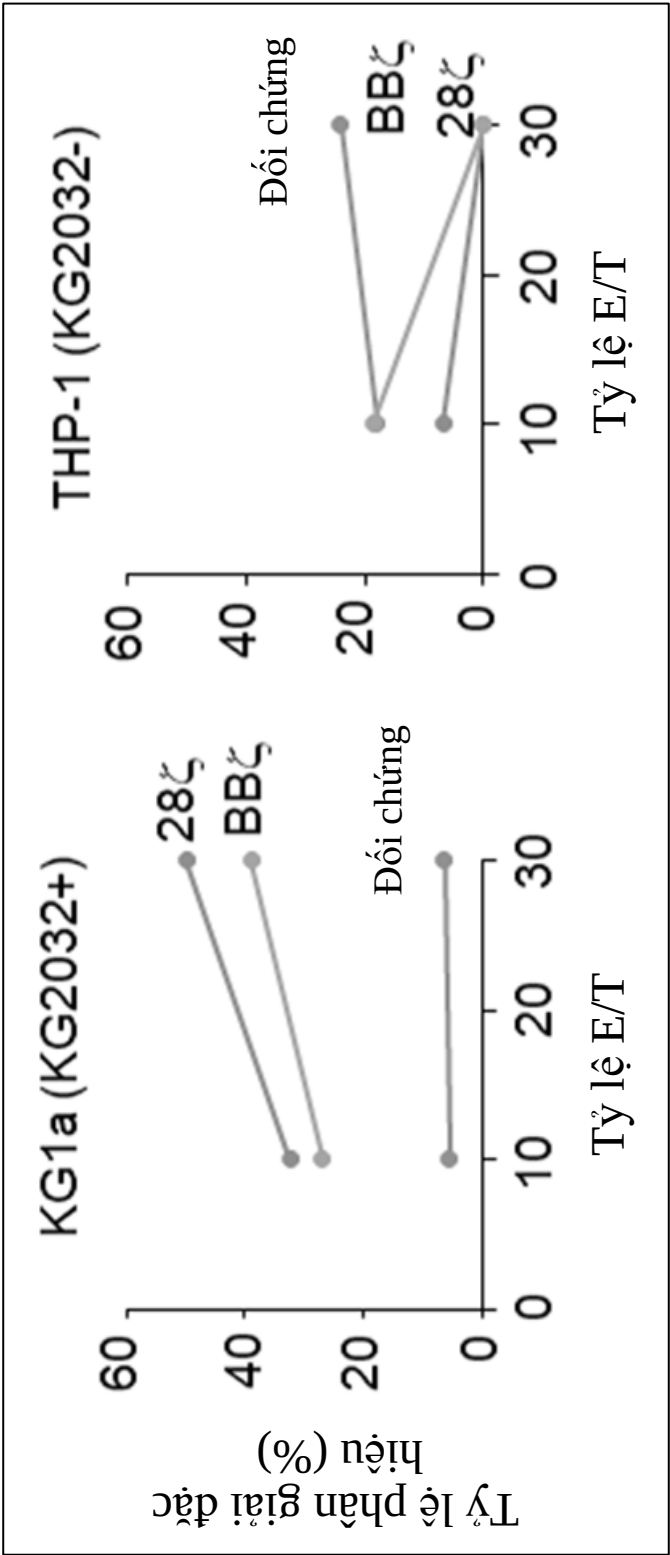


Fig. 8F

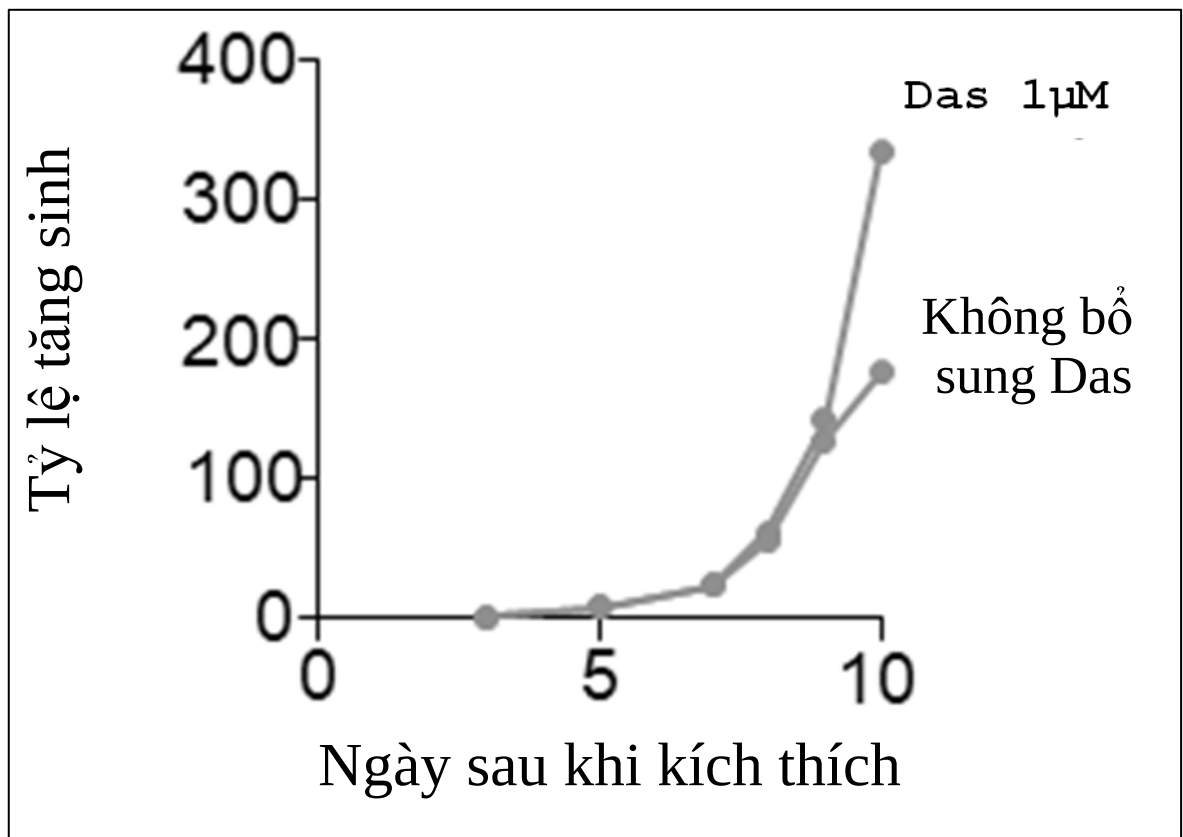


Fig. 8G

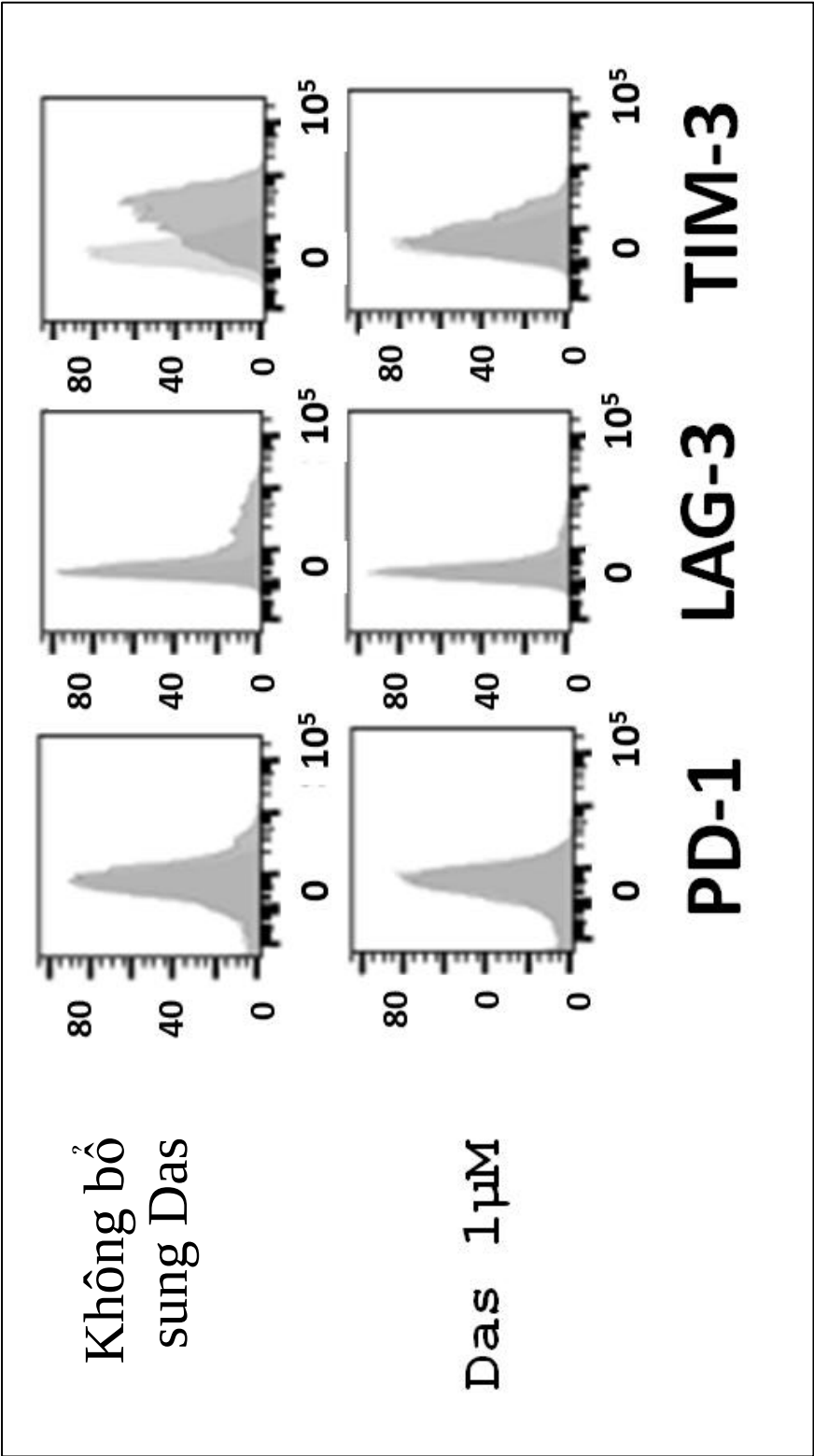


Fig. 8H

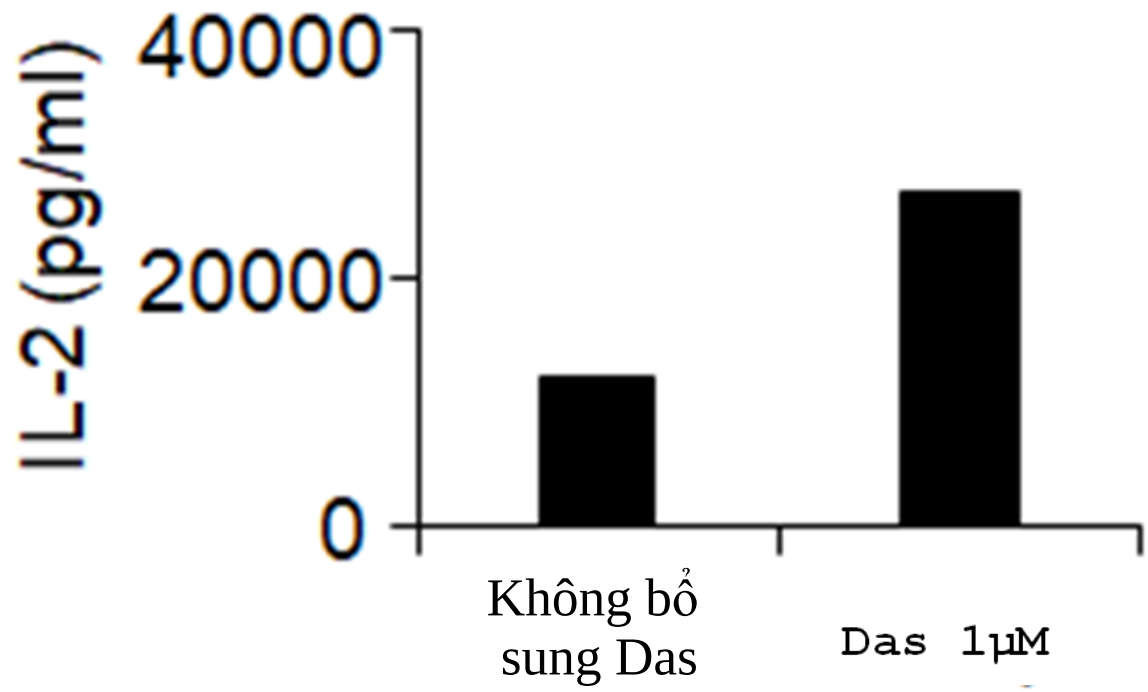


Fig. 8I

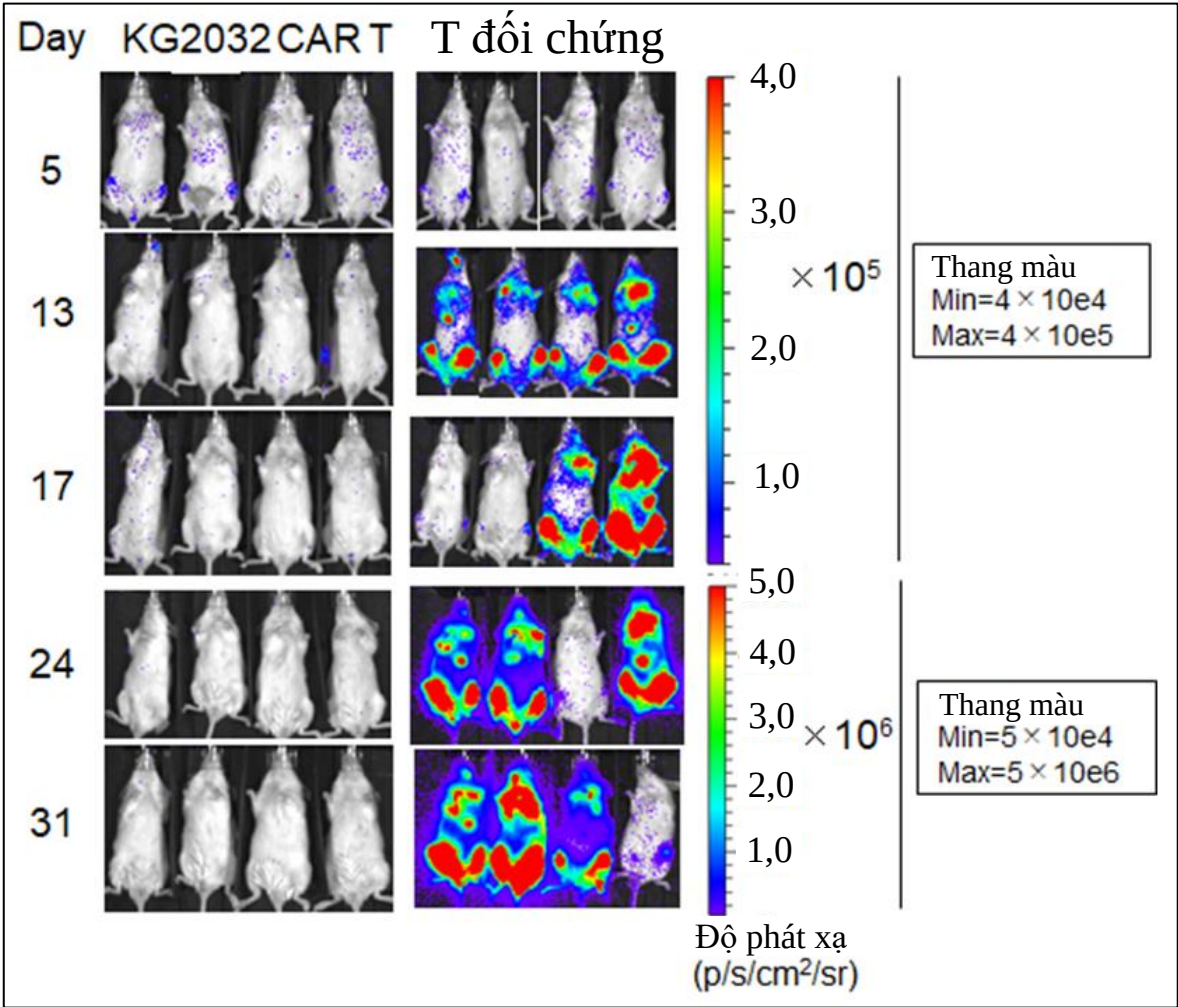


Fig. 8J

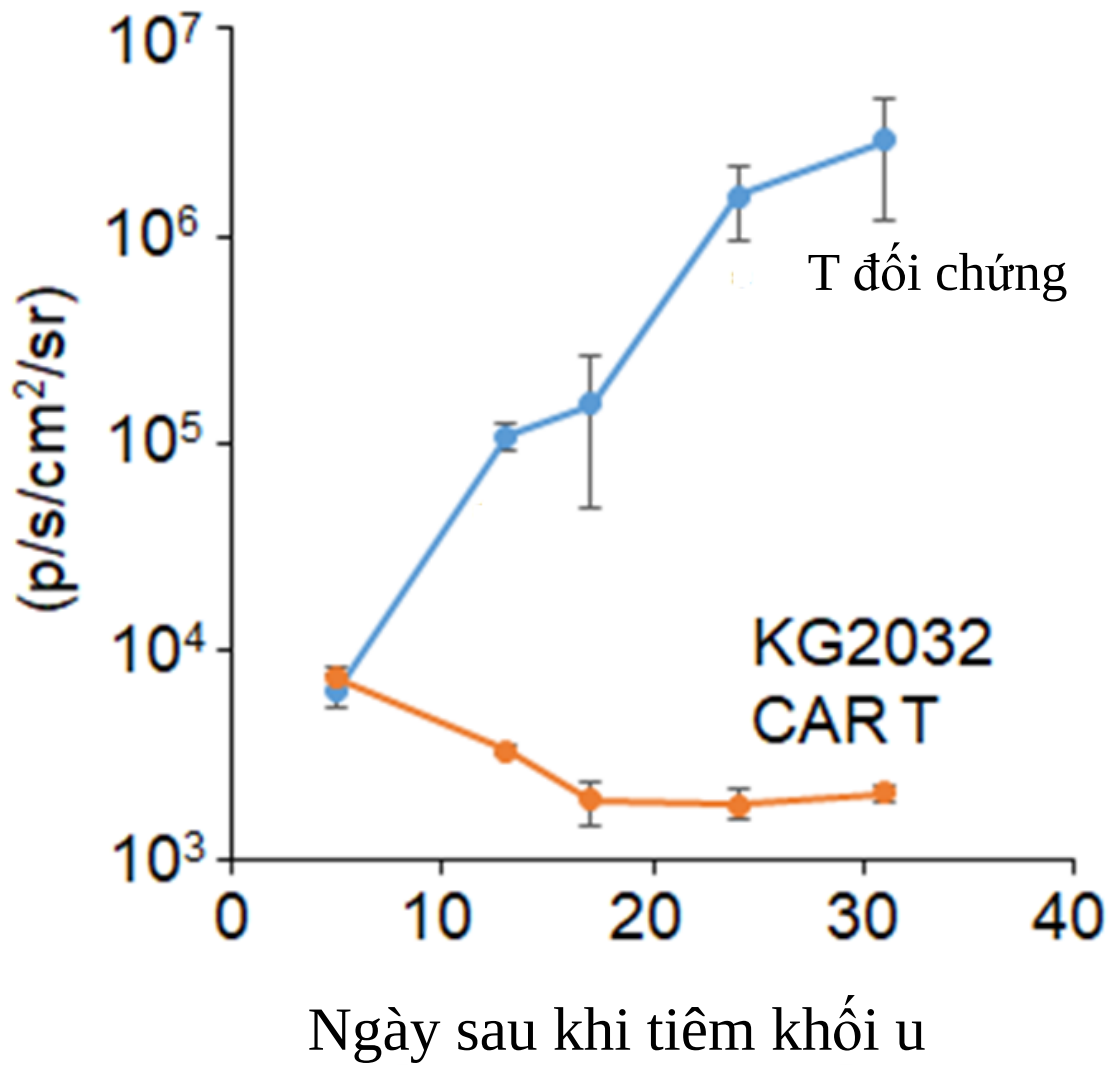


Fig. 9A

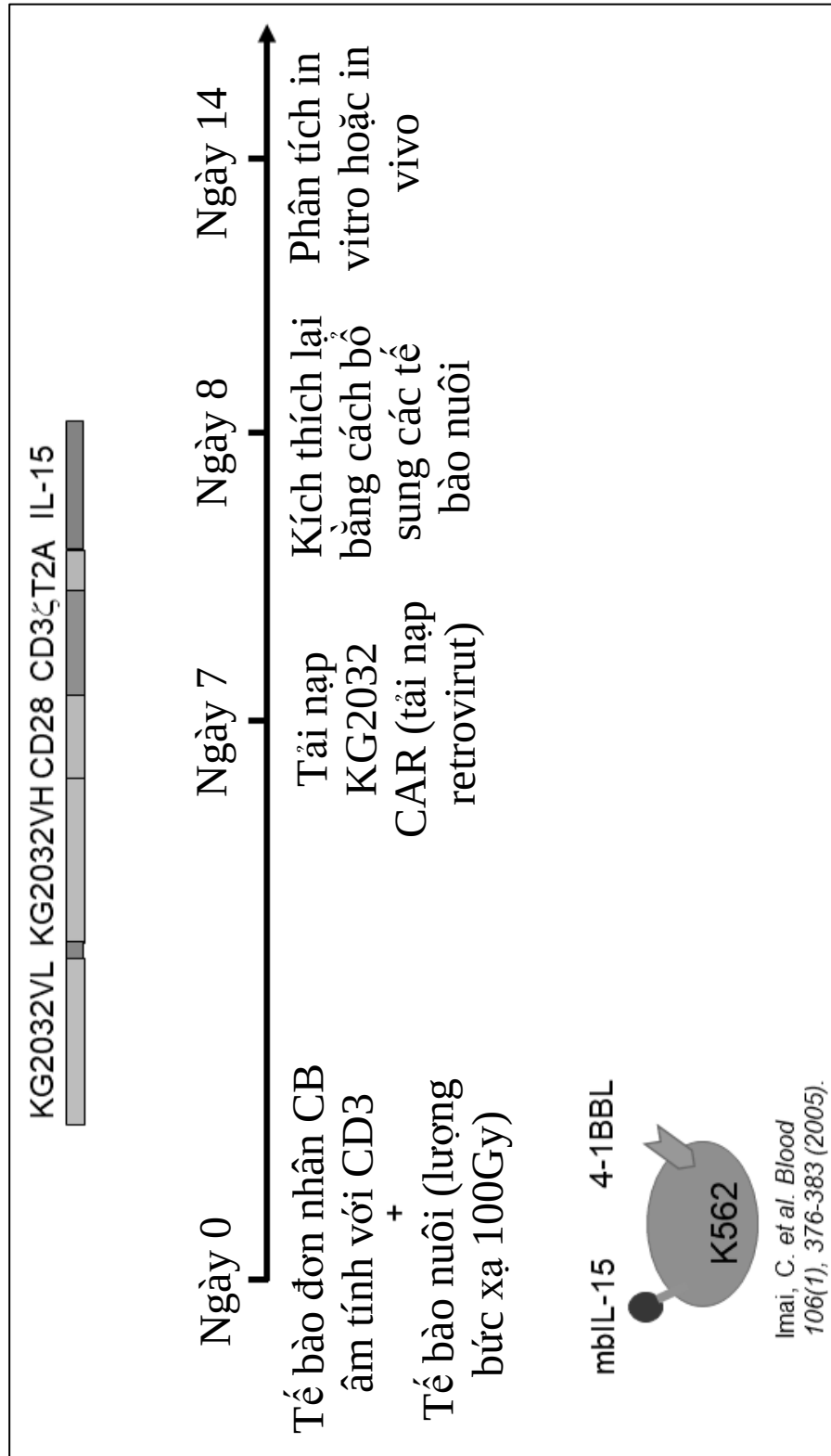


Fig. 9B

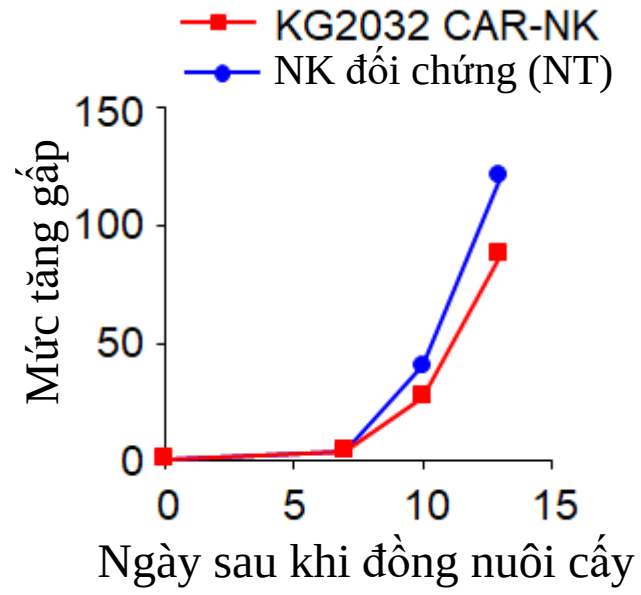


Fig. 9C

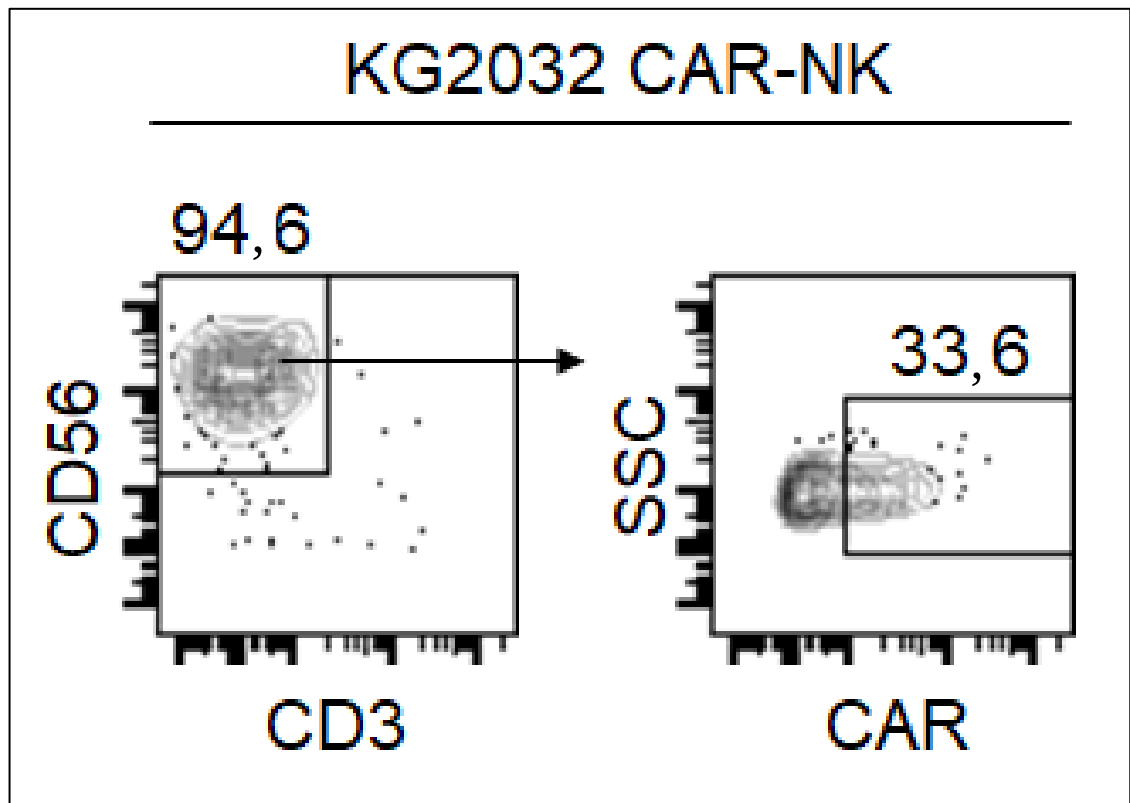


Fig. 9D

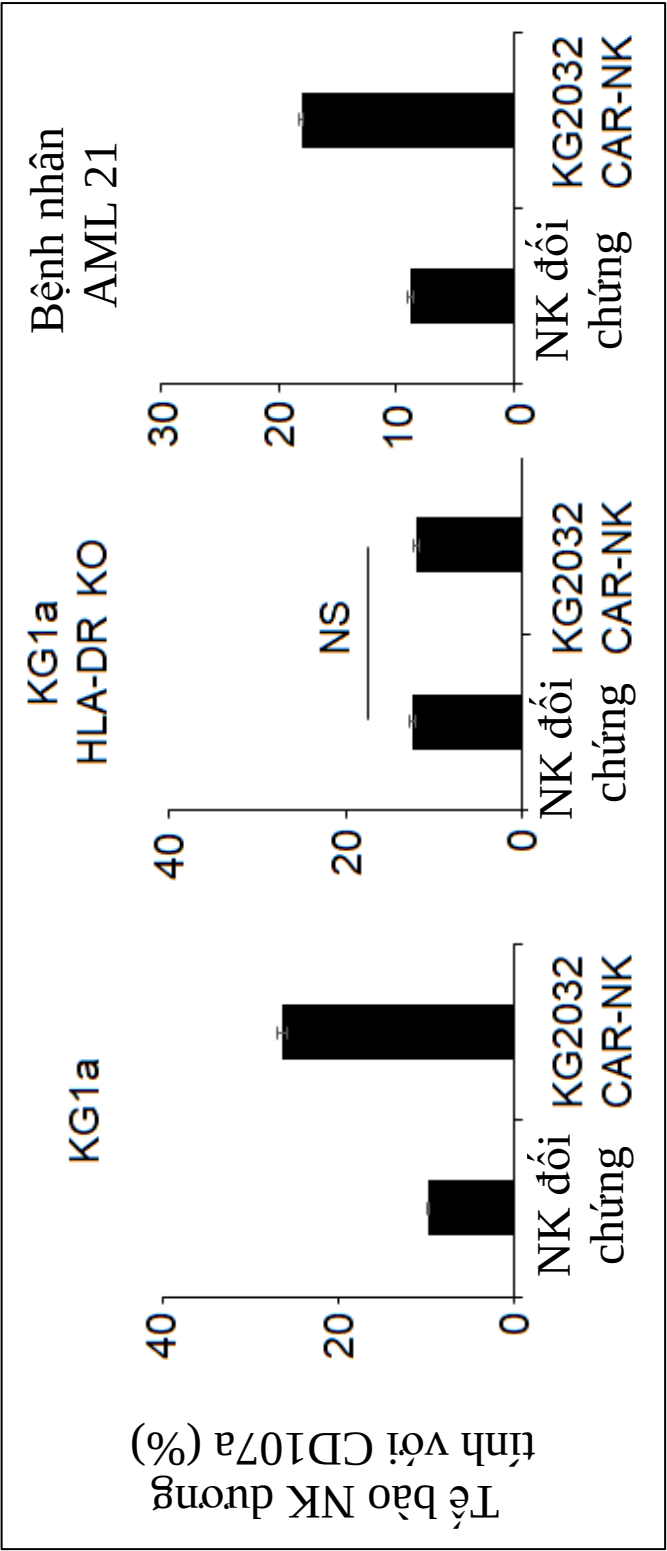


Fig. 9E

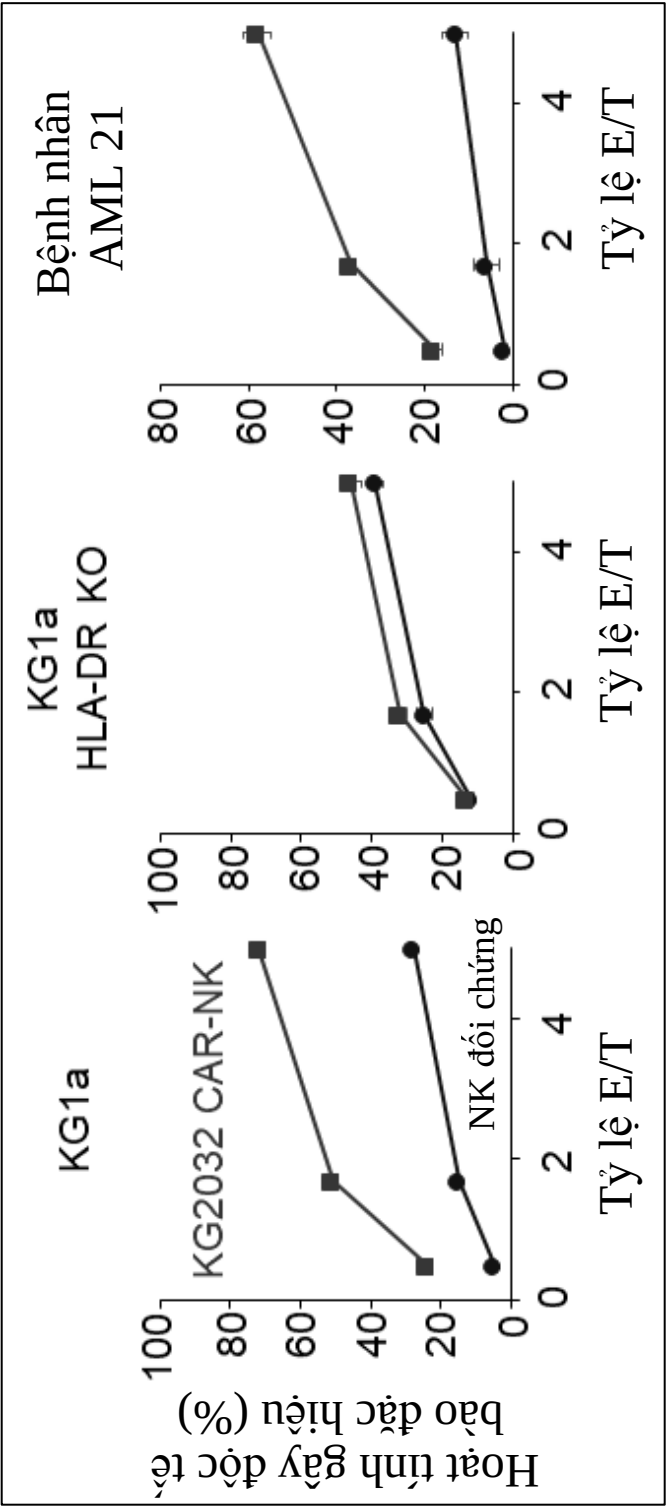


Fig. 9F

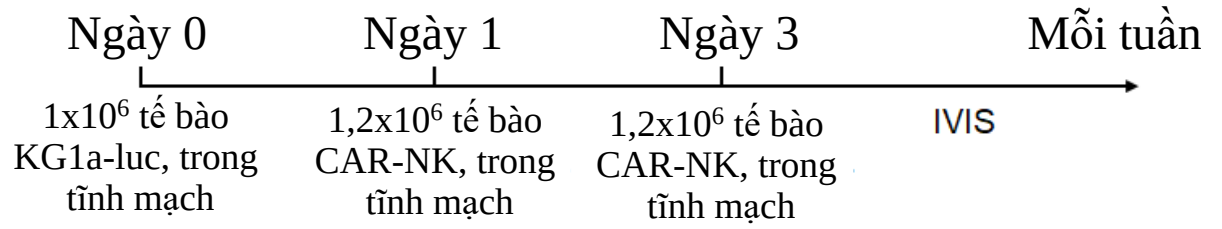


Fig. 9G

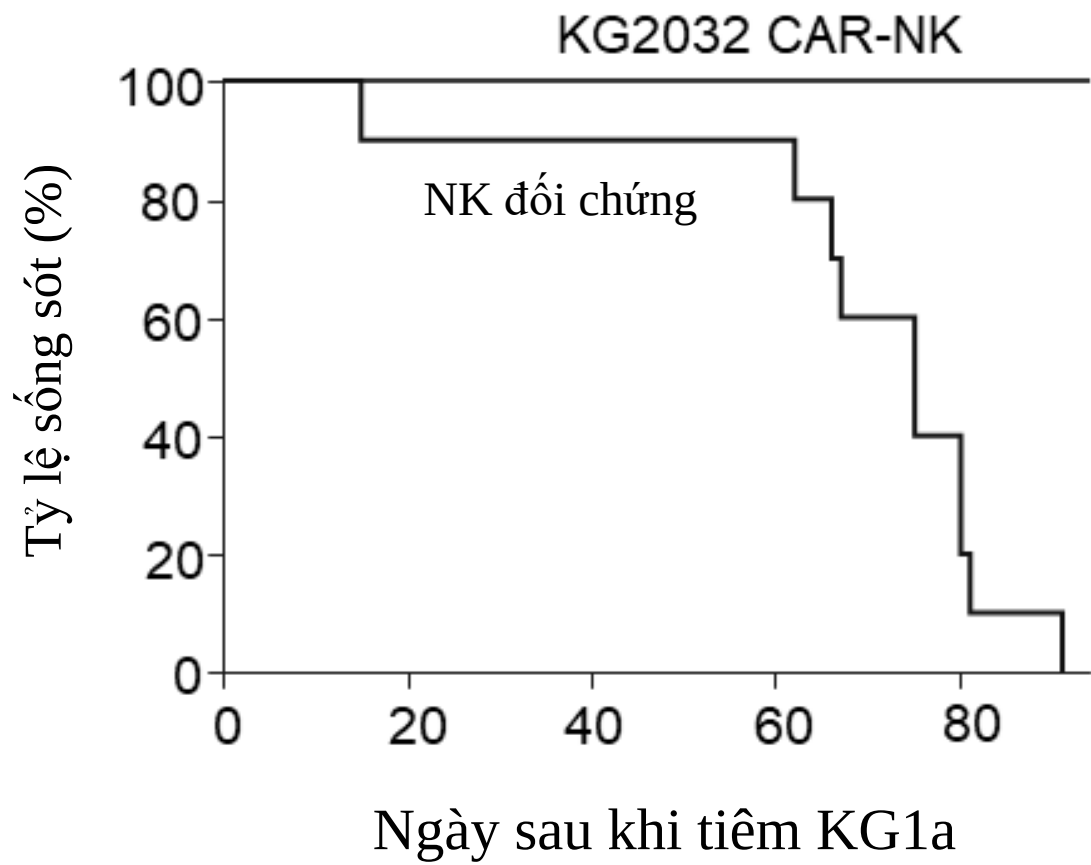


Fig. 9H

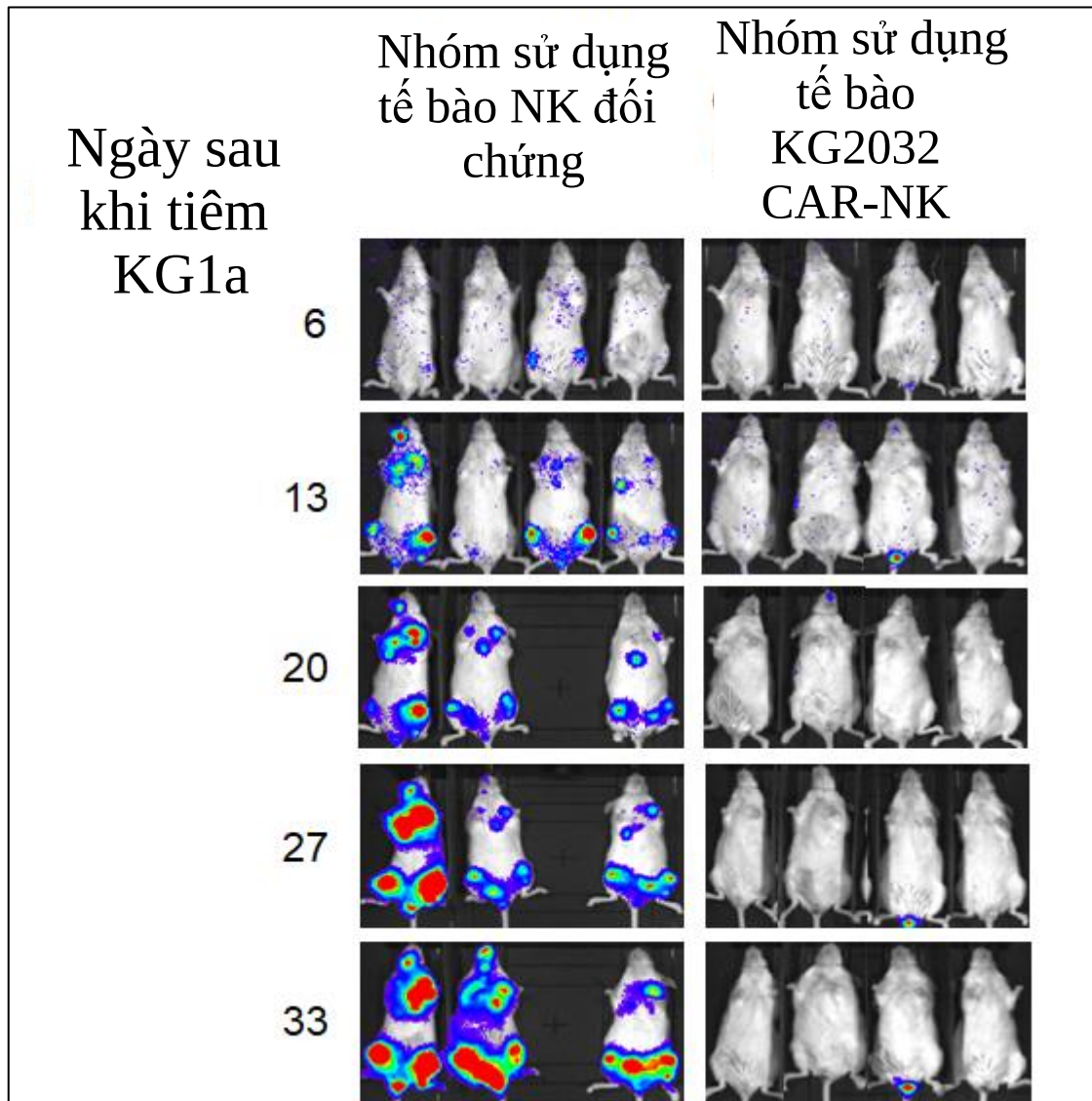


Fig. 10A

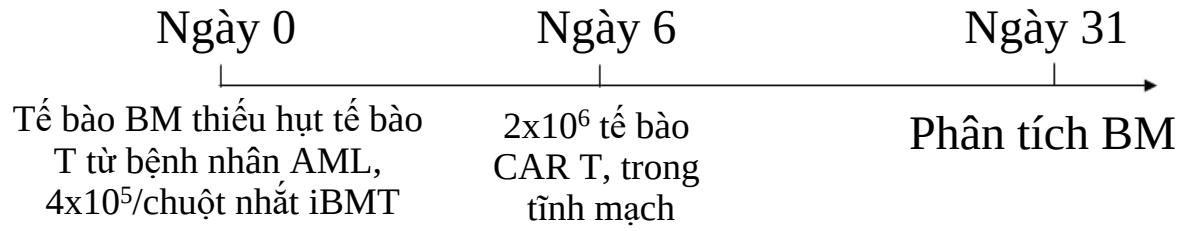


Fig. 10B

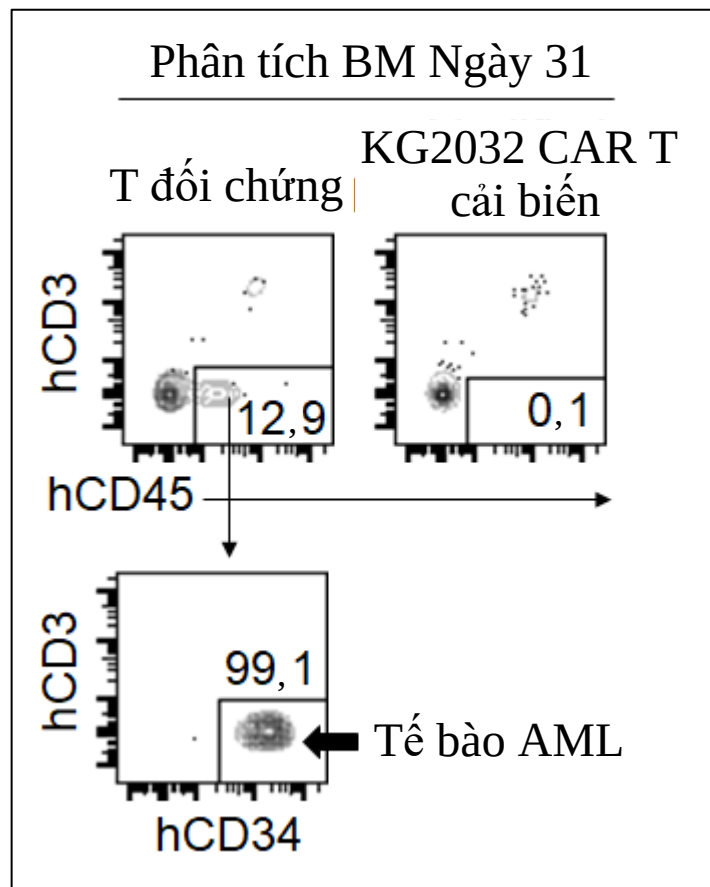
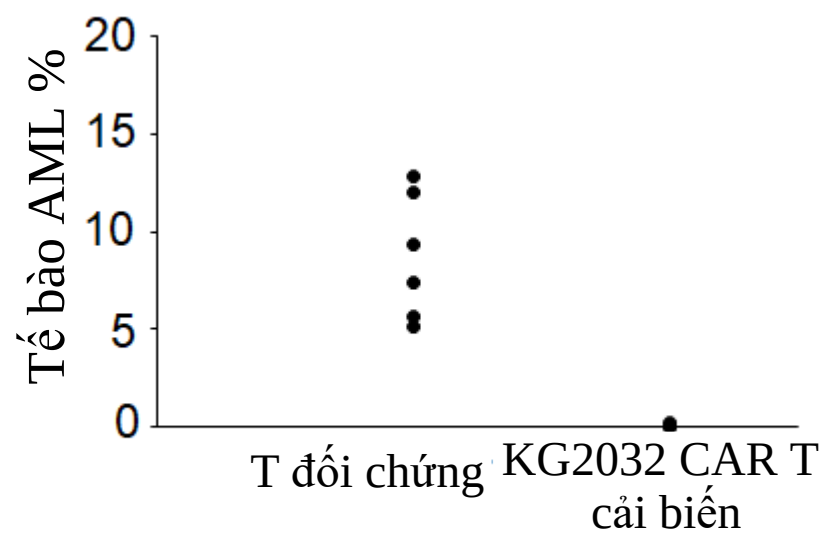


Fig. 10C



Danh mục trình tự

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing
1.3//EN" "ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing dtdVersion="V1_3" fileName="IBPF23-516WO.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0"
productionDate="2023-11-14">
  <ApplicantFileReference>IBPF23-516WO</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>JP</IPOfficeCode>

    <ApplicationNumberText>JP2022-188561</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-11-25</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="en">OSAKA
UNIVERSITY</ApplicantName>
  <InventionTitle languageCode="en">ANTIBODY AGAINST BLOOD
CANCER</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>79</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

          <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q1">

              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
      <INSDSeq_sequence>DYAIH</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="2">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
```

```

        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q2">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>SISTYSGNPYNQNFKG</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q3">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>YSELVFDY</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>117</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```

```

        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

        <INSDFeature_location>1..117</INSDFeature_location>
            <INSDFeature_qual>
                <INSDQualifier>

        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q4">

        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>QVQLQQSGPELVPRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAIHWFRQSHAKS
LEWIGSISTYSGNPNYNQNFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARYSELVFDYWGGTT
LTVSS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
            <INSDFeature_qual>
                <INSDQualifier>

        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q5">

        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>KASQDIYSYLS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>

```

```

</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q6">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>RANRLVD</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q7">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

```

```

        <INSDSeq_sequence>LHNDEFPPWT</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q8">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>

        <INSDSeq_sequence>DIKMTQSPSSMYASLGERTITCKASQDIYSYLSWFFQQKPGKSP
KTLIYRANRLVDGVPSRFGSGSGQDYSLTISSELEYEDLGIYYCLHNDEFPPWTFGGGTKVEIK</INS
DSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>484</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..484</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q9">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>synthetic

```

```

construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>MDMRTPAQFLGILLWFPGIKCDIKMTQSPSSMYASLGERVTIT
CKASQDIYSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDLGIYYCLH
NDEFPWTFGGGKVEIKRGSTSGSGKPGSGEGSQVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAIH
WFRQSHAKSLEWIGSISTYSGNPYNQNFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARYSELV
FDYWGQGTTLTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFVWLVVVGGLA
CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>485</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..485</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q10">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>synthetic
construct</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>MDMRTPAQFLGILLWFPGIKCDIKMTQSPSSMYASLGERVTIT
CKASQDIYSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDLGIYYCLH
NDEFPWTFGGGKVEIKRGSTSGSGKPGSGEGSQVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAIH
WFRQSHAKSLEWIGSISTYSGNPYNQNFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARYSELV
FDYWGQGTTLTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG
TCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELVRVKFSRSADAP
AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE
RRRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>

```

```

        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q11">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEQVKHEC
HFFNGTERVRFLDRYFYHQEYVRFDSVDGEYRAVTELGRPSAEYWNSQKDLLEQRRAAVDITYCRHNY
GVGESFTVQRRVYPEVTVYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIQNG
DWTFQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPTGFLS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q12">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq>

```

```

        </INSDSeq_feature-table>

        <INSDSeq_sequence>MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEQVKHEC
HFFNGTERVRFLDRYFYHQEEYVRFDSVDGEYRAVTELGRPSAEYWNSQKDLLEQRRAAVDITYCRHNY
GVVESFTVQRRVYPEVTVPYPAKTQPLQHNNLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGVVSTGLIQNG
DWTFTQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSPVTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPTGFLS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

                <INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                        </INSDQualifier>
                        <INSDQualifier id="q13">

                                <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                                <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
                                </INSDQualifier>
                                </INSDFeature_qual>
                                </INSDFeature>
                                </INSDSeq_feature-table>

                                <INSDSeq_sequence>MVCLKLPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTQPRFLWQGKYKC
HFFNGTERVQFLERLFYNQEEFVRFDSVDGEYRAVTELGRPVAESWNSQKDILEDRRGQVDTVCRHNY
GVGESFTVQRRVHPEVTVPYPAKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKAGVVSTGLIQNG
DWTFTQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVMSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPTGFLS</INSDSeq_sequence>
                            </INSDSeq>
                        </SequenceData>
                    <SequenceData sequenceIDNumber="14">
                        <INSDSeq>
                            <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
                            <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
                            <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
                            <INSDSeq_feature-table>
                                <INSDFeature>
                                    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

                                    <INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
                                    <INSDFeature_qual>
                                        <INSDQualifier>

```



```

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q14">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEYSTGEC
YFFNGTERVRFLLDRYFYNQEEYVRFSDVGEYRAVTELGPRPSAEYWNSQKDILEDRRALVDITYCRHNY
GVGESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIHNG
DWTFTQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWSARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPTGFLS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q15">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>MVCLKLPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTQPRFLKQDKFEC
HFFNGTERVRYLHRGIYNQEEENVRFSDVGEYRAVTELGPRPVAESWNSQKDFLERRRAEVDITVCRHNY
GVGESFTVQRRVHPKVTVPYPAKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKAGVSTGLIQNG
DWTFTQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVMSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPTGFLS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">

```

```

    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

    <INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q16">

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMLVSSPLALAGDTRPRFLEYSTGEC
YFFNGTERVRLLEHFNQEE LLRFDS DVGEFRAVTELGRPVAESWNSQKDILEDRAAVD TYCRHNY
GAVESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNG
DWTFTQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPRGFLS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

    <INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q17">

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>

```

```

        </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMLVSSPLALAGDTRPRFLEYSTSEC
HFFNGTERVRFLDRYFHNQEEFVRFDSVGEYRAVTELGRPAAEHWNSQKDLLERRRAEVDITYCRHNY
GVVESFTVQRRVHPKVTVYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGVVSTGLIHNG
DWTFTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPRGFLS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q18">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>MVCLKLPGGSCMTALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLWQLKFEC
HFFNGTERVRLLERCIYNQEEFVRFDSVGEYRAVTELGRPD AEYWNSQKDLLEQRRAAVDITYCRHNY
GVGESFTVQRRVEPKVTVYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKAGVVSTGLIQNG
DWTFTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPTGFLS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>

```

```

<INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q19">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEYSTSEC
HFFNGTERVRYLDRYFHNQEENVRFDSVDGEFRAVTELGPRDAEYWNSQKDLLEQKGRVDNYCRHNY
GVVESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGVVSTGLIHNG
DWTFTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPRGFLS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q33">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic
construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEQVKHEC
HFFNGTERVRFLLDRYFYHQEEYVRFDSVDGEYRAVTELGPRDAEYWNSQKDLLEQRRAEVDITYCRHNY
GVVESFTVQRRVYPEVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGVVSTGLIQNG
DWTFTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPTGFLS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>

```

```

</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

        <INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q34">

              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>synthetic
construct</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>

      <INSDSeq_sequence>MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEQVKHEC
HFFNGTERVRFLDRYFYHQEEYVRFDSDVGEYRAVTELGRPD AEYWNSQKDLLEQRRAAVD TYCRHNY
GVVESFTVQRRVYPEVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIQNG
DWTFTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSP LTV EWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSG LQPTGFLS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="22">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

          <INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
              </INSDQualifier>
              <INSDQualifier id="q22">

                <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                <INSDQualifier_value>Homo

```

```

sapiens</INSDQualifier_value>
                                </INSDQualifier>
                                </INSDFeature_qual>
                                </INSDFeature>
                                </INSDSeq_feature-table>

                                <INSDSeq_sequence>MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMLSSPLALAGDTRPRPFLEYSTGEC
YFFNGTERVRFLDRYFYNQEEYVRFDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDFLEDRRALVDITYCRHNY
GVGESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGVVSTGLIHNG
DWTFTQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWSARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPTGFLS</INSDSeq_sequence>
                                </INSDSeq>
                                </SequenceData>
                                <SequenceData sequenceIDNumber="23">
                                    <INSDSeq>
                                        <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
                                        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
                                        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
                                        <INSDSeq_feature-table>
                                            <INSDFeature>
                                                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
                                                <INSDFeature_qual>
                                                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                                                    </INSDQualifier>
                                                    <INSDQualifier id="q23">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                                                    <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
                                                </INSDQualifier>
                                                </INSDFeature_qual>
                                                </INSDFeature>
                                                </INSDSeq_feature-table>

                                <INSDSeq_sequence>MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMLSSPLALAGDTRPRPFLEYSTSEC
HFFNGTERVRFLDRYFYNQEEYVRFDSDVGEFRAVTELGRPDEEYWNSQKDFLEDRAAVDITYCRHNY
GVGESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGVVSTGLIHNG
DWTFTQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPRGFLS</INSDSeq_sequence>
                                </INSDSeq>
                                </SequenceData>
                                <SequenceData sequenceIDNumber="24">
                                    <INSDSeq>
                                        <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
                                        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
                                        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
                                        <INSDSeq_feature-table>
                                            <INSDFeature>
                                                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```

<INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q24">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMLSSPLALAGDTRPRFLEYSTSEC
HFFNGTERVRFLDRYFHNQEENVRFDSVDGEFRAVTELGRPD AEYWNSQKDILED ERAAVDTYCRHNY
GVVESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNG
DWTFTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPRGFLS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q25">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMLSSPLALAGDTRPRFLEYSTSEC
HFFNGTERVRFLDRYFHNQEENVRFDSVDGEFRAVTELGRPD AEYWNSQKDILED ERAAVDTYCRHNY
GVGESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNG
DWTFTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI

```

```

YFRNQKGHSGLQPRGFLS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

        <INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q26">

              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>

      <INSDSeq_sequence>MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMLVSSPLALAGDTRPRFLEYSTSEC
HFFNGTERVRFLERYFHNQEENVRFDSVDGEYRAVTELGRPD AEYWNSQKDLLEDRRALVD TYCRHNY
GVGESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNG
DWTFTQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPRGFLS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

        <INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q27">

```



```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

  <INSDSeq_sequence>MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEYSTSEC
QFFNGTERVRFLDRYFHNQEEFVRFDSDVGEYRAVTELGRPD AEYWNSQKDLLERRRAEVD TYCRHNY
GVVESFTVQRRVHPKVTVP SKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNG
DWTFTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPRGFLS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

        <INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q28">

              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>

      <INSDSeq_sequence>MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSSPLALAGDTRPRFLEYSTSEC
HFFNGTERVRFLERYFHNQEENVRFDS DVGEYRAVTELGRPD AEYWNSQKDLLEQRRRAAVD TYCRHNY
GVVESFTVQRRVHPKVTVP SKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNG
DWTFTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPRGFLS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

```

```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q29">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

  <INSDSeq_sequence>MVCLKLPGGSCMTALTVTLMVLSSPLALSGDTRPRFLWQPKREC
HFFNGTERVRFLDRYFYNQEESVRFDSVDGFEFRAVTELGRPD AEYWNSQKDILEQARAAVD TYCRHNY
GVVESFTVQRRVQPKVTVYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFLNGQEEKAGMVSTGLIQNG
DWTFTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
YFRNQKGHSGLQPTGFLS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="30">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
              </INSDQualifier>
              <INSDQualifier id="q30">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                <INSDQualifier_value>Homo
sapiens</INSDQualifier_value>
                  </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
              </INSDFeature>
            </INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>MVCLKLPGGSCMTALTVTLMVLSSPLALSGDTRPRFLWQPKREC
HFFNGTERVRFLDRYFYNQEESVRFDSVDGFEFRAVTELGRPD AEYWNSQKDILEQARAAVD TYCRHNY

```

GVGESFTVQRRVQPKVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFLNGQEEKAGMVSTGLIQNG
 DWTFQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFI
 YFRNQKGHSGLQPTGFLS</INSDSeq_sequence>

```

    </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="31">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

          <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>other
DNA</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q31">

              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>synthetic
construct</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>

```

```

      <INSDSeq_sequence>gtgcgcttcgacagcgacgt</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="32">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

          <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>other
DNA</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q32">

              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>synthetic

```

```

construct</INSDQualifier_value>
                                </INSDQualifier>
                                </INSDFeature_qual>
                                </INSDFeature>
                                </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>gacggagcgggtgcggttcc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="33">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>499</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..499</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q36">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic
construct</INSDQualifier_value>
                                </INSDQualifier>
                                </INSDFeature_qual>
                                </INSDFeature>
                                </INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>MGWSCIIFFLVATATGVHSQVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGS
GYTFTDYAIHWFRQSHAKSLEWIGSISTYSGNPYNQNFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAI
YYCARYSELVFDYWGQGTTLTVSSGSTSGSGKPGSGEGSDIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDI
YSYLSWFQOKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDLGIYYCLHNDEF PWT
FGGGTKVEIKRAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG
CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKD
KMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="34">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```

        <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q38">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GYMH</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q40">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>RVNPDNGGTSYNQKFKG</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="36">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>

```

```

        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

    <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q42">

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>NHYYGYSDYGMDY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="37">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

    <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q44">

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSTGYMHVVKQSHGKS
LEWIGRVNPDNGGTSYNQKFKGKAILTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCARNHYYGYSDYGMDYW
GQGTSVTVSS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="38">
    <INSDSeq>

```

```

        <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q46">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>KSSQSLNLSGNQKNYLA</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="39">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q48">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
        <INSDSeq_sequence>GASTRES</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>

```

```

</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="40">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q50">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QNDHSYPYT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q52">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

```



```

    <INSDSeq_sequence>DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQ
    KPGQPPKLLIYGASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPYTFGGGTKLEI
    K</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="42">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q54">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SYWMQ</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="43">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q56">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus

```

```

musculus</INSDQualifier_value>
                                </INSDQualifier>
                                </INSDFeature_qual>
                                </INSDFeature>
                                </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>AIYPGDGDTRYTQKFKG</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="44">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q58">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                                </INSDQualifier>
                                </INSDFeature_qual>
                                </INSDFeature>
                                </INSDSeq_feature-table>
                                <INSDSeq_sequence>EGAYYVLFDY</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="45">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q60">

```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>QVQLQQSGAVLARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPQGQ
LEWIGAIYPGDGDTTRYTKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREGAYYVLFQYWGQG
TTLTVSS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="46">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q62">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="47">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

```

```

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q64">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>LASNLES</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="48">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q66">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QHSRELPWT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="49">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>

```

```

        <INSDQualifier>

        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q68">

        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>

        <INSDSeq_sequence>DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASKSVSTSGYNYMHYQQKP
GQPPKLLIYLLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPTWTFGGGTKLEIK<
/INSDSeq_sequence>
        </INSDSeq>
    </SequenceData>
    <SequenceData sequenceIDNumber="50">
        <INSDSeq>
            <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
            <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
            <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
            <INSDSeq_feature-table>
                <INSDFeature>
                    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

                <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

                    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

                    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q70">

                    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    </INSDFeature_qual>
                    </INSDFeature>
                    </INSDSeq_feature-table>
                    <INSDSeq_sequence>DYNIH</INSDSeq_sequence>
                </INSDSeq>
            </SequenceData>
            <SequenceData sequenceIDNumber="51">
                <INSDSeq>
                    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
                    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
                    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
                    <INSDSeq_feature-table>

```

```

        <INSDFeature>
            <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q72">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>YIYPYNGGTGYNQKFKS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="52">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q74">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
        <INSDSeq_sequence>EARYPYGMDY</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="53">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>

```

```

        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q76">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>EVQLQQSGPELVKPGASVKISCRASGYTFTDYNIHVVKQSHGKS
LEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATLTVNNSSTAYMDLRSLTSEDSAVSYCAREARYPYGMDYWGQG
TSVTVSS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="54">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q78">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>RASGNIHNYLA</INSDSeq_sequence>

```

```

        </INSDSeq>
    </SequenceData>
    <SequenceData sequenceIDNumber="55">
        <INSDSeq>
            <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
            <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
            <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
            <INSDSeq_feature-table>
                <INSDFeature>
                    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q80">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
                </INSDFeature>
            </INSDSeq_feature-table>
            <INSDSeq_sequence>NAKTLPD</INSDSeq_sequence>
        </INSDSeq>
    </SequenceData>
    <SequenceData sequenceIDNumber="56">
        <INSDSeq>
            <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
            <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
            <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
            <INSDSeq_feature-table>
                <INSDFeature>
                    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q82">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
                </INSDFeature>

```



```

        </INSDSeq_feature-table>
        <INSDSeq_sequence>QHFWTTPYT</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="57">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q84">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>

        <INSDSeq_sequence>DIQMTHSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKGKSP
QLLVYN AKTL PDGVP SRFS GSGSGTQYSLKIYSLQTEDFGSYYCQHFWTTPYTFGGGTKLEIK</INS
DSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="58">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q86">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

```

                                <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                                </INSDQualifier>
                                </INSDFeature_qual>
                                </INSDFeature>
                                </INSDSeq_feature-table>
                                <INSDSeq_sequence>DTYMH</INSDSeq_sequence>
                                </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="59">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q88">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>WIDPANGNTKHDPRFQD</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="60">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>

```

```

<INSDQualifier id="q90">

  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SLRYWCFDV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="61">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q92">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQG
LYWVGWIDPANGNTKHDPRFQDTATITADTTSTNTAYLQLSSLTSEDYLYCARSLRYWCFDVWGAGT
TVTVSS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="62">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q94">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>KASQDVSTTVA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="63">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q96">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SASYRYT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="64">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>

```

```

        <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q98">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQHYSTPPT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="65">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q100">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>

        <INSDSeq_sequence>DIVMTQSHKFMSTLVGDRVSITCKASQDVSTTVAWYQQKPGQSP
KLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPPTFGGGTKLEIK</INS
DSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="66">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```

```

        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
            <INSDFeature_qual>
                <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
                <INSDQualifier id="q102">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>NHWMQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="67">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
            <INSDFeature_qual>
                <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
                <INSDQualifier id="q104">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>AIYPGDGDTRYSQLKFKG</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="68">
    <INSDSeq>

```

```

        <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q106">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>RGFGYYDVMDY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="69">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q108">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNHWMQWIKQRPQGQ
LEWIGAIYPGDGDTRYQKFKGKATVTTDKSSSTAYMQLSSLAEDSAVYYCARRGFGYYDVMDYWGG

```

```

GTSVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="70">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q110">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TSGIGVG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="71">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q112">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TSGIGVG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>

```



```

        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>HIWWNDNYYYNTALRS</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="72">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q114">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                </INSDQualifier>
            </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SSYFGNHLYYFDY</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="73">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>123</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..123</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q116">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                    <INSDQualifier_value>Mus

```

```

musculus</INSDQualifier_value>
                                </INSDQualifier>
                                </INSDFeature_qual>
                                </INSDFeature>
                                </INSDSeq_feature-table>

                                <INSDSeq_sequence>QVTLKESGPGILQSSQTLSTCSFSGFSLSTSGIGVGWIRQPSG
KGLEWLAHIWWNDNYYYNTALRSRLTISKDTSNQVFLKIASVDAADTATYYCARSSYFGNHLYYFDY
WGQGTTLTVSS</INSDSeq_sequence>
                                </INSDSeq>
                                </SequenceData>
                                <SequenceData sequenceIDNumber="74">
                                    <INSDSeq>
                                        <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
                                        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
                                        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
                                        <INSDSeq_feature-table>
                                            <INSDFeature>
                                                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
                                <INSDFeature_qual>
                                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                                </INSDQualifier>
                                <INSDQualifier id="q118">

                                <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                                    <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
                                </INSDQualifier>
                                </INSDFeature_qual>
                                </INSDFeature>
                                </INSDSeq_feature-table>
                                <INSDSeq_sequence>SYAMS</INSDSeq_sequence>
                                </INSDSeq>
                                </SequenceData>
                                <SequenceData sequenceIDNumber="75">
                                    <INSDSeq>
                                        <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
                                        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
                                        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
                                        <INSDSeq_feature-table>
                                            <INSDFeature>
                                                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
                                <INSDFeature_qual>
                                    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>

```

```

</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q120">

  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>TISGGGTYYIYPDSVKG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="76">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q122">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GENWFAY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="77">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>116</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..116</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q124">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>EVHLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIFSSYAMSWVRQTPEKR
LEWVATISGGGTYIYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRSEDAMYYCARGENWFAYWGQTLV
TVSA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="78">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q126">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SVSYRYT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="79">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```

<INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q128">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Mus
musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

  <INSDSeq_sequence>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTTVAWYQQKPGQSP
KLLIYSVSYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPPTFGGGTKLEIK</INS
DSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

```