



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

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

(11)



1-0027181

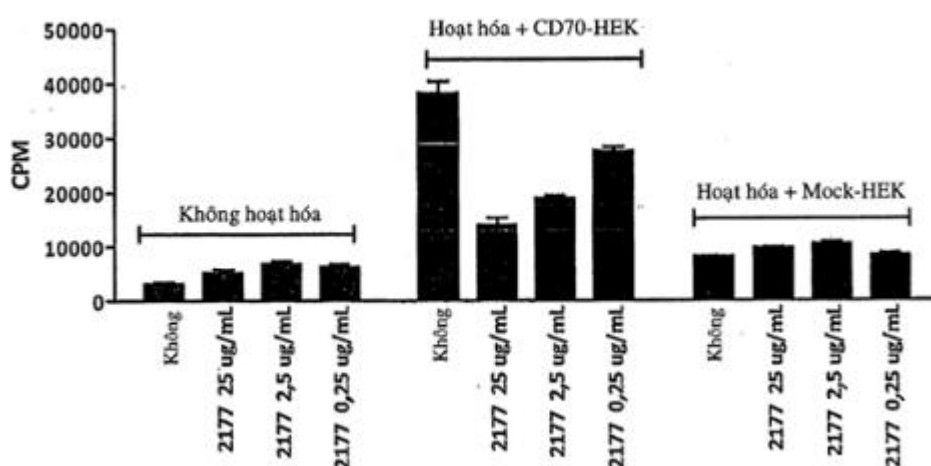
(51)⁷ A61K 39/395

(13) B

- (21) 1-2014-03440 (22) 14/03/2013
(86) PCT/US2013/031314 14/03/2013 (87) WO 2013/138586 A1 19/09/2013
(30) 61/611,332 15/03/2012 US
(45) 25/01/2021 394 (43) 25/02/2015 323A
(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)
800/850 Ridgeview Drive, Horsham, Pennsylvania 19044, USA.
(72) Chen, John (CN); Fransson, Johan (SE); Fursov, Natalie (RU); Hamel, Damon (US);
MALIA, Thomas (US); Obmolova, Galina (US); Ort, Tatiana (RU); Ryczyn,
Michael (US); Scully, Michael (US); Sweet, Raymond (US); Teplyakov, Alexey
(RU); Wheeler, John (US); Almagro Juan Carlos (US).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CD27 CỦA NGƯỜI VÀ VẬT DỤNG SẢN XUẤT BAO GỒM KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể ở người miễn dịch đặc hiệu với CD27 của người có khả năng phong bế sự liên kết với CD27 với phối tử CD70 của nó và làm trung hòa hoạt tính sinh học của CD27 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự tạo tín hiệu nội bào CD27, sự tăng sinh và sự hoạt hóa của tế bào T, sự tăng sinh và sự biệt hóa tế bào B, sự tạo ra nguyên tương bào và sự làm giảm các đáp ứng kháng thể, sự kích thích các tế bào khối u bằng CD70, và sự sản sinh chất trung gian hòa tan được từ các tế bào T và B. Các kháng thể là hữu dụng trong việc chẩn đoán hoặc điều trị các bệnh và các tình trạng bệnh liên quan đến hoạt tính CD27.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể ở người đối với protein CD27 và việc sử dụng chúng và, cụ thể hơn là, các kháng thể ở người đối với protein CD27 của người và việc sử dụng chúng để điều trị các rối loạn viêm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD27 là protein xuyên màng typ I và là thành viên của siêu họ thụ thể TNF (TNF receptor superfamily-TNFSF27) được biểu hiện là kháng nguyên bề mặt trên phần lớn các tế bào T, các tế bào giết tự nhiên và huyết tương tiết kháng thể và tế bào nhớ B. CD70 là xytokin, còn được gọi là thành viên siêu họ phối tử nhân tổ hoại tử khối u 7 (tumor necrosis factor legend superfamily 7-TNFSF7), và phối tử cùng gốc đối với CD27. Các tương tác phối tử-thụ thể TNFSF có thể điều tiết sự biệt hóa của tế bào B phụ thuộc vào tế bào T (Jacquot S. 2000 Immunol Res. 21(1):23-30) và kích thích sự chết tế bào theo chương trình trong các tế bào khác nhau.

Việc gắn CD27:CD70 dẫn đến sự hoạt hóa con đường tín hiệu NF- κ B chuẩn tắc và không chuẩn tắc mà lần lượt kích thích sự tăng sinh của tế bào B và tế bào T, sự biệt hóa tế bào huyết tương và sự tiết kháng thể tiếp theo (Yamamoto, H. 1998 J Immunol. 161(9): 4753-9). Sự đồng kích thích CD27 với OX40, 4-1BB cũng thúc đẩy sự sống sót của các tế bào T được hoạt hóa (Croft, M. 2003 Cytokine Growth Factor Rev. 14(3-4): 265-73), nhờ đó điều tiết một số bộ phận tác động và tế bào nhớ T và kiểm soát chức năng của tế bào T một cách trực tiếp bằng cách thúc đẩy sự sản sinh các xytokin, như IL-4 và IFN γ , hoặc điều biến các đáp ứng của tế bào T với hoạt động của các xytokin khác, như IL2 và IL-12.

Các nghiên cứu ở cả người và động vật gợi ý vai trò quan trọng của con đường CD27:CD70 ở các bệnh liên quan đến miễn dịch khác nhau, bao gồm bệnh luput ban đỏ hệ thống (systemic lupus erythematosus-SLE) (Doerner T Lupus 2004 13(5):283-9), bệnh viêm khớp dạng thấp (Tak, PP et al., 1996 clin Immunol

Immunopathol 80(2): 129-38) và bệnh đa xơ cứng (Hintzen RQ et al., 1991 J Neuroimmunol 35(1-3):211-7). Mặt khác, CD70 đã được thông báo là được biểu hiện với các mức độ khác nhau trên các tế bào B ác tính và phức hợp CD70:CD27 có thể gián tiếp đáp ứng kháng khối u bằng cách hoạt hóa sự miễn dịch kháng khối u và làm giảm sự phát triển khối u (Borst J, Hendriks J and Xiao Y. 2005. Curr Opin Immunol. 17(3):275-81). CD27 cũng có thể kiểm soát sự tích tụ của các tế bào T CD4+ và CD8+ ở các vị trí nhiễm trùng (Hendricks et al., 2000 Nature Immunol 1, 433 - 440).

CD70 không được biểu hiện trên các tế bào không tạo máu thông thường. Sự biểu hiện CD70 dường như là bị giới hạn tạm thời đối với các tế bào T và B được hoạt hóa bằng kháng nguyên và sự biểu hiện của nó được điều tiết giảm xuống khi sự kích thích kháng nguyên dừng lại. Các bằng chứng từ các mô hình động vật gợi ý rằng CD70 có thể góp phần vào các rối loạn miễn dịch như, ví dụ, bệnh viêm khớp dạng thấp (Brugnoni et al., 1997 Immunol. Lett. 55:99-104), bệnh vẩy nến (Brugnoni et al., 1997, Immunol. Lett. 55:99-104), và bệnh luput (Oelke et al., 2004, Arthritis Rheum. 50:1850-60). Ngoài vai trò tiềm tàng của nó trong các đáp ứng viêm, CD70 cũng được biểu hiện trên nhiều tế bào được biến nạp bao gồm tế bào B lympho, tế bào Hodgkin và Reed-Sternberg, tế bào ác tính gốc thần kinh, và một số caxinom.

Các kháng thể liên kết chất chủ vận CD27 được mô tả trong W02008/051424 (Univ. South Hampton) được lưu ý là hữu dụng để thúc đẩy sự miễn dịch tế bào T và các kháng thể này có epitop liên kết mà làm cho chúng không bị ảnh hưởng (không bị ức chế) bởi CD70.

Trong khi các nghiên cứu ở loại gặm nhấm liên quan đến sự biến đổi của CD27 và/hoặc CD70 đã bộc lộ vai trò quan trọng tiềm tàng của sự tương tác thụ thể phối tử này, cần phải tạo ra các kháng thể ở người đặc hiệu cho CD27 của người và các chất phong bế sự tương tác CD27:CD70 mà có thể gây ra tác dụng độc tế bào, cản phân bào hoặc điều biến miễn dịch hữu dụng lâm sàng trên các tế bào biểu hiện CD27, một cách cụ thể mà không gây ra các tác dụng chủ vận không mong muốn trên các tế bào biểu hiện CD27 khi không có mặt CD70. Hợp chất như vậy có thể là chất điều trị hữu dụng trong việc điều biến sự phát triển của các tế bào ung thư hoặc

các rối loạn miễn dịch mà qua trung gian là các tế bào biểu hiện CD27.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng liên kết với CD27 của người có khả năng phong bế các hoạt tính liên quan đến sự tương tác CD27-CD70 trên các tế bào, mô, hoặc cơ quan trong đối tượng vật chủ. Trình tự axit amin của các kháng thể đơn dòng liên kết với CD27 làm ví dụ được đề xuất mà được mã hóa bằng các axit nucleic để biểu hiện trong tế bào chủ. Ngoài ra, các kháng thể đơn dòng CD27 theo sáng chế xác định ít nhất ba epitop không chồng nhau trên miền ngoại bào của CD27 mà khi được liên kết với kháng thể theo sáng chế, sẽ tránh được sự gắn phối tử dạng CD70 điều khiển tín hiệu và hoạt tính sinh học sau đó.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD27 được phân lập phản ứng với epitop của protein CD27 được xác định bởi các góc giữa các vị trí từ 21-191 của protein CD27.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập có trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 76, 78, 80, 102-126, 128-136, và 145-147, và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 77, 79, 81-101, 127, 137-144, và 148, bao gồm các biến thể của các trình tự này, ví dụ, các thay thế bảo toàn.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập có trình tự CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 1-75 và 151-158, bao gồm các biến thể của các trình tự này, ví dụ, các thay thế bảo toàn.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà liên kết với epitop thông thường được xác định bằng vùng trên protein mà các kháng thể C2177 và/hoặc C2186 hoặc các kháng thể ở người được tạo ra từ đó được mô tả trong các bảng 30-39 liên kết hoặc cạnh tranh để liên kết với protein CD27 với các kháng thể C2177

và/hoặc C2186 hoặc các kháng thể ở người được tạo ra từ đó được mô tả trong các bảng 30-39. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà liên kết với epitop của miền ngoại bào của CD27 được xác định bằng vùng trên protein mà kháng thể C2191 liên kết với hoặc các kháng thể ở người được tạo ra từ đó được mô tả trong các bảng 30-39 và cạnh tranh để liên kết với protein CD27 với kháng thể C2191 hoặc các kháng thể ở người được tạo ra từ đó được mô tả trong các bảng 30-39. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà liên kết với epitop của miền ngoại bào của CD27 được xác định bằng vùng trên protein mà kháng thể C2192 liên kết với hoặc các kháng thể ở người được tạo ra từ đó được mô tả trong các bảng 30-39 và cạnh tranh để liên kết với protein CD27 với kháng thể C2192 hoặc các kháng thể ở người được tạo ra từ đó được mô tả trong các bảng 30-39. Theo một khía cạnh khác, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh của nó thu được từ một hoặc nhiều các kháng thể C2177, C2186, C2191, và C2192 hoặc các kháng thể ở người được tạo ra từ đó được mô tả trong các bảng 30-39 có các đặc tính liên kết chức năng khác được biểu hiện bằng một hoặc nhiều kháng thể C2177, C2186, C2191, và C2192, hoặc các kháng thể ở người được tạo ra từ đó được mô tả trong các bảng 30-39, như ức chế sự liên kết của CD27 với các tế bào CD70 dương tính.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể được thiết kế bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thiết kế (ví dụ, được nhân hóa hoặc được làm thích ứng với người), trong đó:

- (1) vùng biến đổi chuỗi nặng được thiết kế bao gồm hoặc thu được từ một hoặc nhiều vùng xác định bổ trợ (CDR) từ chuỗi nặng C2177, C2191, C2192 và C2186 của kháng thể chuột và khung từ chuỗi nặng kháng thể nhận của người, tùy ý có một hoặc nhiều sự thay thế gốc khung của người, và
- (2) vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thiết kế bao gồm một hoặc nhiều vùng xác định bổ trợ từ chuỗi nhẹ C2177, C2191, C2192 và C2186 của kháng thể chuột và khung từ chuỗi nhẹ kháng thể nhận của người, tùy ý có một hoặc nhiều sự thay thế gốc khung của người; và
- (3) kháng thể được thiết kế liên kết đặc hiệu với CD27 của người và gây nhiều sự

tương tác của nó với CD70.

Theo một phương án khác, kháng thể được thiết kế có thể bao gồm một hoặc nhiều CDR mà còn được thiết kế với một hoặc nhiều sự thay thế hoặc loại bỏ, ví dụ, các CDR mà giống 90%, 95%, 98% hoặc 99,5% so với một hoặc nhiều CDR của các kháng thể C2177, C2191, C2192 và/hoặc C2186.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc điều trị hoặc phòng ngừa các tình trạng bệnh lý liên quan đến hoạt tính sinh học CD27 bằng cách dùng một lượng hữu hiệu để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh của kháng thể theo sáng chế, một phần của nó hoặc hỗn hợp của các kháng thể theo sáng chế hoặc các phần của nó cho đối tượng cần điều trị bệnh này.

Theo một phương án khác, sáng chế bao gồm epitop của kháng nguyên làm thành phần của vacxin. Các polypeptit hoặc polynucleotit mã hóa các epitop của polypeptit được mô tả trên đây bao gồm các mảnh phụ hoặc chất đồng đẳng ba chiều của một vài hoặc tất cả các gốc 21-191 của SEQ ID NO: 1, hoặc các thay đổi bảo toàn của chúng, được nhận biết bằng các kháng thể theo sáng chế. Các polypeptit và polynucleotit là hữu dụng để gây miễn dịch hoạt tính vật chủ để kích thích sản sinh các kháng thể kháng CD27 có khả năng chống lại hoặc phòng ngừa các tình trạng bệnh lý liên quan đến hoạt tính sinh học CD27.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra, tinh sạch, điều chế, và bao gói kháng thể theo sáng chế dùng để điều trị hoặc phòng ngừa các tình trạng bệnh lý liên quan đến hoạt tính sinh học CD27 bằng cách sử dụng một lượng hữu hiệu để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh của kháng thể hoặc một phần của nó.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện các tác dụng của kháng thể C2177 lên sự tăng sinh của tế bào T.

Fig.2 thể hiện cấu trúc tinh thể của phức hệ ba thành phần CD27:C2177:C2191. Đầu N và C của mảnh CD27 được gắn nhãn. Các chuỗi nặng của Fab đậm hơn so với các chuỗi nhẹ của chúng.

Fig.3 là sơ đồ thể hiện protein CD27– kháng thể C2177 tiếp xúc với gốc protein CD27 (epitop) trong đường tròn và gốc kháng thể C2177 (paratop) trong hình hộp.

Fig.4 là sơ đồ thể hiện protein CD27– kháng thể C2191 tiếp xúc với gốc protein CD27 (epitop) trong đường tròn và gốc kháng thể C2191 (paratop) trong hình hộp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các chữ viết tắt

CDR – complementarity determining region: vùng xác định bổ trợ; CFSE - carboxyfloresxein diacetat, succinimidyl este; ECD – extracellular domain: miền ngoại bào; FR – framework: khung ; H – heavy chain: chuỗi nặng; GvHD graft-versus-host disease: bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ; L – light chain: chuỗi nhẹ; IFN – interferon (g, gama); Ig – immunoglobulin: globulin miễn dịch; Mab – Monoclonal antibody: kháng thể đơn dòng; MMP - matrix metalloproteinase: metalproteinaza ma trận; PBMC – peripheral blood mononuclear cell: tế bào máu đơn nhân ngoại biên; VL – Variable light chain: chuỗi nhẹ biến đổi; VH – Variable heavy chain: chuỗi nặng biến đổi

Các định nghĩa

Như được sử dụng ở đây, "kháng thể" bao gồm toàn bộ các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên bất kỳ hoặc chuỗi đơn của nó. Do đó, kháng thể bao gồm phân tử chứa protein hoặc peptit bất kỳ mà bao gồm ít nhất một phân tử globulin miễn dịch, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất một vùng xác định bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng hoặc nhẹ hoặc phần liên kết phối tử của nó, vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, vùng hằng định chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, vùng khung (FR), hoặc phần bất kỳ của chúng, hoặc ít nhất một phần của protein liên kết, mà có thể được kết hợp vào kháng thể theo sáng chế. Thuật ngữ "kháng thể" còn nhằm bao gồm các kháng thể, các mảnh thủy phân, các phần đặc hiệu và các biến thể của nó, bao gồm các giả kháng thể hoặc bao gồm các phần của các kháng thể mà bất chước cấu trúc và/hoặc chức năng của kháng thể hoặc mảnh hoặc phần đặc hiệu của nó, bao

gồm các kháng thể chuỗi đơn và miền đơn và các mảnh của nó. Các mảnh chức năng bao gồm các mảnh liên kết kháng nguyên vào đích được chọn trước. Các ví dụ về mảnh liên kết bao hàm trong thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị đơn bao gồm miền VL, VH, CL và CH; (ii) mảnh F(ab')₂, mảnh hóa trị hai bao gồm hai mảnh Fab được liên kết bằng cầu disulfua ở vùng bản lề; (iii) mảnh Fd bao gồm miền VH và CH; (iv) mảnh Fv bao gồm miền VL và VH của nhánh đơn của kháng thể, (v) mảnh dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), mà bao gồm miền VH; và (vi) vùng xác định bổ trợ (CDR) được phân lập. Ngoài ra, mặc dù hai miền của mảnh Fv, VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng rẽ, chúng có thể được nối, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng chất liên kết tổng hợp mà có thể làm cho chúng như là chuỗi protein đơn mà trong đó cặp vùng VL và VH tạo ra các phân tử hóa trị đơn (được biết đến là chuỗi đơn Fv (scFv); xem, ví dụ, Bird et al., (1988) *Science* 242:423-426, and Huston et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn như vậy cũng nhằm bao hàm trong thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể. Các mảnh kháng thể thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và các đoạn này được sàng lọc về tiện ích theo cách giống nhau là các kháng thể trợ. Ngược lại, các thư viện của các cấu trúc scFv có thể được sử dụng để sàng lọc khả năng liên kết kháng nguyên và sau đó, bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, tách thành ADN khác mã hóa các trình tự gen dòng mầm của người. Một ví dụ về thư viện này là "HuCAL: Human Combinatorial Antibody Library-thư viện kháng thể tổ hợp của người" (Knappik, A. et al., *J Mol Biol* (2000) 296(1):57-86).

Thuật ngữ "CDR" đề cập đến vùng xác định bổ trợ hoặc các gốc axit amin của vùng siêu biến của kháng thể mà tham gia hoặc chịu trách nhiệm liên kết kháng nguyên. Vùng siêu biến hoặc CDR của kiểu phụ IgG người của kháng thể bao gồm các gốc axit amin từ các gốc 24-34 (L1), 50-56 (L2) và 89-97 (L3) trong miền biến đổi chuỗi nhẹ và 31-35 (H1), 50-65 (H2) và 95-102 (H3) trong miền biến đổi chuỗi nặng như được mô tả bởi Kabat và các đồng tác giả, (1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, Md.) và/hoặc các gốc từ vòng siêu biến (tức là các gốc từ 26-32 (L1), 50-52 (L2) và 91-96 (L3) trong miền biến đổi chuỗi nhẹ và 26-32 (H1), 53-55 (H2) hoặc định nghĩa hiện tại của Chothia H2 về 52-57, và 96-101 (H3) trong miền biến đổi chuỗi nặng như được mô tả bởi (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)).

Khung hoặc các gốc FR1-4 là các gốc của miền biến đổi khác với và nhóm các vùng siêu biến. Gần đây, hệ thống đánh số toàn cầu đã được phát triển và được chấp nhận rộng rãi, *international Immunogenetics information system*® (IMGT) (LaFranc, et al., 2005. Nucl Acids Res. 33:D593–D597).

Ở đây, CDR nhằm đề cập đến cả hai trình tự axit amin và vị trí trong chuỗi nhẹ hoặc nặng theo cách đánh số theo thứ tự. Về "vị trí" của CDR trong cấu trúc của miền biến đổi globulin miễn dịch được bảo toàn giữa các loài và có mặt trong cấu trúc được gọi là vòng, bằng cách sử dụng hệ thống đánh số mà sắp xếp thẳng hàng các trình tự miền biến đổi theo các dấu hiệu cấu trúc, CDR và các gốc khung đã được nhận diện. Thông tin này được sử dụng trong việc ghép và thay thế các gốc CDR từ các globulin miễn dịch của một loài vào khung nhận từ, cụ thể là, kháng thể ở người.

Thuật ngữ "CD27" đề cập đến siêu họ thụ thể TNF của người (TNF receptor superfamily-TNFSF27), sản phẩm của gen 939 của người (gen CD27), cũng được gọi là thụ thể CD27L của người, MGC20393, S152, T14, kháng nguyên hoạt hóa tế bào T CD27 và bao gồm tất cả các biến thể, dạng đồng phân và thể tương đồng loài của CD27. CD27 được biểu hiện của người (Đăng ký NCBI số NP_001233) là polypeptit gồm 260 axit amin theo độ dài có 20 tín hiệu tiết axit amin ở đầu N. Do đó, các kháng thể theo sáng chế có thể, trong một số trường hợp, phản ứng chéo với CD27 từ loài khác với người. Trong các trường hợp khác, các kháng thể có thể đặc hiệu hoàn toàn đối với CD27 của người và không biểu hiện loài hoặc các dạng khác của phản ứng chéo. Các hoạt tính sinh học của CD27 có nghĩa là, hoạt tính sau đó bất kỳ thu được từ việc liên kết thụ thể CD27 và/hoặc hoạt hóa thu được từ sự hoạt hóa của CD27 bằng một hoặc nhiều phối tử, đặc biệt là polypeptit CD70 (TNFSF7, NP_001243), hoặc các phối tử khác, như SIVA. CD27 tải nạp các tín hiệu mà dẫn đến sự hoạt hóa của NF- κ - β và MAPK8/JNK. Protein gá lắp TRAF2 và TRAF5

được thể hiện làm trung gian quá trình tạo tín hiệu của thụ thể này. Các hoạt tính sinh học CD27 cũng có thể bắt nguồn từ sự liên kết một số dạng cắt cụt của CD27 hoặc các mảnh CD27 đến phổi tử mà chính chúng bộc lộ các hoạt tính sinh học, ví dụ, polypeptit mà bao gồm các gốc từ 21-191 của protein có độ dài đầy đủ có thể liên kết với CD70. Đuôi tế bào chất của kháng nguyên CD27, các gốc 213-260, liên kết với đầu N của protein SIVA (cũng được biết đến là nhân tố cảm ứng tế bào chết theo chương trình: CD27BP; SIVA1, Siva-1, NP_006418 (175 aa)); và Siva-2, SIVA2, NP_068355 (110 aa).

Thuật ngữ "epitop" có nghĩa là thể quyết định protein có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng thể. Các epitop thường bao gồm các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của các phân tử như các axit amin hoặc chuỗi bên của đường và thường có đặc tính cấu trúc ba chiều đặc hiệu, cũng như các đặc tính tích điện đặc hiệu. Các epitop cấu hình và phi cấu hình khác biệt ở chỗ việc liên kết với epitop cấu hình mà không phải là epitop phi cấu hình bị loại bỏ đi khi có mặt của các dung môi làm biến tính.

“Nhân hóa” (cũng được gọi là tái tạo hình hoặc ghép CDR) hoặc “thiết kế” bao gồm các kỹ thuật thiết lập để làm giảm tính sinh miễn dịch của các kháng thể đơn dòng (mAb) từ các nguồn ghép gen khác loại (loài gặm nhấm thông thường) và để cải thiện ái lực hoặc các chức năng của bộ phận tác động (ADCC, sự hoạt hóa bổ thể, liên kết C1q). mAb được thiết kế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, bằng cách sử dụng các trình tự ngẫu nhiên hóa biểu hiện thực khuẩn thể, hoặc được tổng hợp mới (de novo). Ví dụ, để cấu tạo kháng thể được nhân hóa với các vùng CDR được kết hợp từ loài không phải người, thiết kế này có thể bao gồm các biến thể, như thay thế axit amin bảo toàn trong các gốc của CDR, và thay thế ngược các gốc từ mAb không phải của người vào các vùng khung của người (đột biến ngược). Các vị trí có thể được phân biệt hoặc nhận diện bằng các phương pháp so sánh trình tự, phân tích trình tự liên ứng, hoặc phân tích cấu trúc của các cấu trúc 3D của vùng biến đổi. Các chương trình máy tính sẵn có mà minh họa và biểu hiện các cấu trúc có cấu hình ba chiều có thể của các trình tự globulin miễn dịch tiêu biểu được chọn. Sự xem xét kỹ các biểu hiện này cho phép phân tích vai trò có thể của các gốc trong việc tạo chức năng của trình tự globulin miễn dịch tiêu biểu, tức là

việc phân tích của các gốc mà ảnh hưởng đến khả năng của globulin miễn dịch tiêu biểu để liên kết với kháng nguyên của nó. Bằng cách này hoặc bằng các thuật toán sắp xếp thẳng hàng trình tự đơn giản (ví dụ, Clustal W), các gốc khung FR (FR-framework) có thể được chọn từ các trình tự kháng thể đã biết, được phát hiện trong các cơ sở dữ liệu truy cập công khai như VBASE hoặc Kabat, và các trình tự liên ứng được tối ưu hóa sao cho đặc tính kháng thể mong muốn, như ái lực đối với (các) kháng nguyên đích, đạt được. Do các tệp dữ liệu của các thông số đã biết đối với các cấu trúc kháng thể tăng lên, sự tinh vi và cải tiến của các kỹ thuật này cũng như vậy. Sự tiếp cận khác đối với việc nhân hóa là chỉ cải biến các gốc bề mặt của trình tự bộ gặm nhấm với các gốc thông thường nhất được phát hiện trong các mAb của người và được gọi là "tái tạo bề mặt" hoặc "lát bề mặt." Một lượng lớn trình tự Ig của người và không phải của người là đã được biết đến và sẵn có một cách tự do và được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, cơ sở dữ liệu và các công cụ được phát triển bởi LeFranc và đồng tác giả được phát hiện dưới tên IMGT; các trang web được quản lý bởi Trung tâm Sinh học quốc gia Hoa Kỳ (U.S National Center for Biologics-NCBI); Kabat và đồng tác giả, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Cơ quan y tế Hoa Kỳ (1983) cũng được mở rộng hơn và sẵn có trực tuyến. Việc nhân hóa hoặc thiết kế của các kháng thể theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã được biết đến hoặc các phương pháp được phát triển bằng cách sử dụng thông tin trình tự globulin miễn dịch của người. Các phương pháp như vậy được hướng dẫn trong, ví dụ, Winter U.S. Pat số 6982361 và Bowdish và đồng tác giả, WO03/025019.

Như được sử dụng ở đây, K_D đề cập đến hằng số phân ly, cụ thể là, K_D của kháng thể đối với kháng nguyên được xác định trước, và là phép đo ái lực của kháng thể đối với đích đặc hiệu. Các kháng thể ái lực cao có K_D là $10^{-8}M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là $10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn và tốt hơn nữa là $10^{-10}M$ hoặc nhỏ hơn, đối với kháng nguyên được xác định trước. Nghịch đảo của K_D là K_A , hằng số kết hợp. Thuật ngữ " k_{dis} " hoặc " k_2 ," hoặc " k_d " như được sử dụng ở đây, nhằm đề cập đến tốc độ phân ly của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. " K_D " là tỉ lệ của tốc độ phân ly (k_2), cũng được gọi là "tốc độ dừng-off rate (k_{off})" đối với tốc độ của tốc độ kết hợp

(k_1) hoặc “tốc độ chạy-on rate (k_{on}).” Do đó, K_D bằng k_2/k_1 hoặc k_{off} / k_{on} và được biểu hiện là nồng độ mol (M). Kéo theo đó là, K_D càng nhỏ, sự liên kết càng mạnh. Do đó, K_D là 10^{-6} M (hoặc 1 microM) chỉ sự liên kết yếu so với 10^{-9} M (hoặc 1nM). Các trị số này có thể được tính bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt và/hoặc phương pháp Kinexa đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” hoặc “chế phẩm chứa kháng thể đơn dòng” như được sử dụng ở đây đề cập đến dạng điều chế của các phân tử kháng thể của chế phẩm phân tử đơn. Chế phẩm chứa kháng thể đơn dòng biểu hiện tính đặc hiệu liên kết đơn và ái lực đối với epitop cụ thể. Thuật ngữ này cũng bao gồm “kháng thể tái tổ hợp” và “kháng thể đơn dòng tái tổ hợp” là tất cả các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các cách tái tổ hợp, như (một) các kháng thể được phân lập từ động vật hoặc tế bào lai được điều chế bằng cách dung hợp các tế bào động vật tiết kháng thể và chất dung hợp đi kèm, (b) các kháng thể được phân lập từ tế bào chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể, ví dụ, từ tế bào transfectoma, (c) các kháng thể được phân lập từ thể tái tổ hợp, thư viện tổ hợp kháng thể ở người hoặc loài khác, và (d) các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng phương tiện khác bất kỳ mà liên quan đến việc tách các trình tự gen globulin miễn dịch với các trình tự ADN khác. “Kháng thể được phân lập,” như được sử dụng ở đây, nhằm đề cập đến kháng thể hầu như không có các kháng thể khác có tính đặc hiệu kháng nguyên khác biệt. Tuy nhiên, kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với epitop, dạng đồng phân hoặc biến thể của CD27 của người có thể, có sự phản ứng chéo với các kháng nguyên liên quan khác, ví dụ, từ loài khác (ví dụ, thể tương đồng loài CD27). Hơn nữa, kháng thể được phân lập có thể hầu như không có vật chất tế bào và/hoặc các chất hóa học khác. Theo một phương án của sáng chế, tổ hợp của các kháng thể đơn dòng “được phân lập” có các tính đặc hiệu khác nhau được kết hợp trong chế phẩm được xác định tốt.

Như được sử dụng ở đây, “liên kết đặc hiệu,” “liên kết đặc hiệu miễn dịch” và “liên kết một cách đặc hiệu miễn dịch” đề cập đến kháng thể liên kết với kháng nguyên được xác định trước. Cụ thể là, kháng thể liên kết có hằng số phân ly (K_D) là 10^{-7} M hoặc nhỏ hơn, và liên kết với kháng nguyên được xác định trước với K_D mà ít

nhất nhỏ hơn hai lần so với K_D để liên kết với kháng nguyên không đặc hiệu (ví dụ, BSA, casein, hoặc polypeptit được đặc hiệu hóa bất kỳ khác) khác với kháng nguyên được xác định trước. Các cụm từ "kháng nguyên nhận biết kháng thể" và "kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên" ở đây được sử dụng thay thế với thuật ngữ "kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên." Như được sử dụng ở đây, liên kết "đặc hiệu cao" nghĩa là K_D của kháng thể có liên quan đối với epitop đích đặc hiệu ít nhất là nhỏ hơn 10 lần so với K_D để liên kết kháng thể này với các phối tử khác.

Như được sử dụng ở đây, "isotyp" đề cập đến lớp kháng thể (ví dụ, IgM hoặc IgG) mà được mã hóa bằng các gen của vùng hằng định chuỗi nặng. Một số lớp kháng thể còn bao gồm các lớp phụ mà cũng được mã hóa bằng vùng hằng định chuỗi nặng và còn được kèm theo oligosacarit ở các gốc đặc hiệu trong các miền vùng hằng định (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4) mà còn truyền các chức năng sinh học đến kháng thể. Ví dụ, trong các kháng thể ở người isotyp IgG1, IgG3 và với phạm vi nhỏ hơn, IgG2 biểu hiện chức năng của chất tác động làm các kháng thể IgG2a của chuột.

Chức năng của "bộ phận tác động" hoặc "bộ phận tác động dương" có nghĩa là kháng thể bao gồm các miền khác với các miền liên kết đặc hiệu kháng nguyên có khả năng tương tác với các thụ thể hoặc các thành phần trong máu khác như bổ thể, dẫn đến, ví dụ, sự thu góp các đại thực bào và các sự kiện dẫn đến sự phá hủy các tế bào được liên kết với các miền liên kết kháng nguyên của kháng thể. Các kháng thể có một vài chức năng của bộ phận tác động gián tiếp là sự liên kết của các phân tử bộ phận tác động. Ví dụ, sự liên kết của thành phần C1 của bổ thể với các kháng thể hoạt hóa hệ bổ thể. Sự hoạt hóa của bổ thể là quan trọng trong sự opsonin hóa và sự phân giải của các thể gây bệnh tế bào. Sự hoạt hóa của bổ thể kích thích đáp ứng viêm và cũng có thể được bao gồm trong tính quá mẫn tự miễn. Ngoài ra, các kháng thể liên kết với tế bào thông qua vùng Fc, với vị trí thụ thể Fc trên vùng kháng thể Fc liên kết với thụ thể Fc (FcR) trên tế bào. Có một số thụ thể Fc mà đặc hiệu đối với các lớp khác nhau của kháng thể, bao gồm IgG (các thụ thể gama), IgE (các thụ thể eta), IgA (các thụ thể alpha) và IgM (các thụ thể mu). Sự liên kết của kháng thể với các thụ thể Fc trên các bề mặt tế bào gây ra một số đáp ứng sinh học quan trọng và

đa dạng bao gồm sự nhấn chìm và phá hủy các hạt được bọc kháng thể, sự thanh thải của các phức hợp miễn dịch, sự phân giải của các tế bào đích được bọc kháng thể bằng các tế bào giết (còn gọi là tính độc tế bào qua trung gian là tế bào phụ thuộc vào kháng thể, hoặc ADCC), sự giải phóng của các chất trung gian gây viêm, sự truyền nhau thai và kiểm soát sự sản sinh globulin miễn dịch.

1. Thành phần của kháng thể theo sáng chế

Kháng thể trung hòa CD27 theo sáng chế là kháng thể mà ức chế, phong bế, hoặc gây nhiễu với ít nhất một hoạt tính CD27 hoặc CD70 liên kết, in vitro, in situ và/hoặc in vivo và không thúc đẩy, kích thích, cảm ứng, hoặc kích động hoạt tính CD27 hoặc liên kết phối tử và cũng không liên kết kháng thể tương tự như các hiệu quả hạ nguồn của sự gắn phối tử CD27, cụ thể là, sự tương tác của CD70 với CD27, như sự tải nạp tín hiệu trong tế bào chủ. Kháng thể trung hòa CD27 thích hợp, phần được làm đặc hiệu, hoặc biến thể cũng có thể, tùy ý, ảnh hưởng đến ít nhất một hoạt tính hoặc chức năng của CD27, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự tổng hợp ARN, ADN hoặc protein, sự giải phóng protein, sự hoạt hóa tế bào T, sự tăng sinh hoặc sự biệt hóa tế bào B, sự tiết kháng thể, sự tạo tín hiệu của thụ thể CD27, sự phân cắt CD27, sự liên kết phối tử CD27, CD27 hoặc sự cảm ứng, tổng hợp hoặc tiết CD70.

Liên quan đến hoạt tính phong bế con đường đồng kích thích CD27:CD70 của các kháng thể trung hòa CD27 theo sáng chế, việc điều trị các rối loạn tự miễn với các chức năng của bộ phận tác động tế bào T hoặc B được gia tăng có thể là có ích.

Sáng chế dựa trên sự phát hiện của các kháng thể đơn dòng kháng CD27 của người có khả năng ức chế sự hoạt hóa CD27 bằng CD70 và không có khả năng tự hoạt hóa CD27 mà không có CD70 kích thích. Các tế bào lai và tế bào transfectoma có khả năng tiết kháng thể này được tạo ra. Thử nghiệm gen thông báo NF- κ B được sử dụng để nhận diện một vài các kháng thể tiêu biểu có khả năng ức chế sự hoạt hóa tế bào chủ biểu hiện CD27 bằng gen thông báo NF- κ B qua trung gian là CD70. Thứ hai, các kháng thể này được mô tả là không thể cảm ứng hoạt tính chủ vận phụ thuộc liều khi được ủ với các tế bào được chuyển nhiễm gen thông báo luxiferaza kết hợp với CD27 mà không có CD70 kích thích. Thứ ba, được chứng tỏ rằng các kháng thể

này ức chế phụ thuộc liều sự tăng sinh của tế bào T CD4 nguyên thể của người phụ thuộc vào CD70. Thứ tư, các kháng thể trung hòa CD27 được tạo ra có khả năng làm giảm sự kích thích tạo ra tế bào huyết tương qua trung gian CD70 từ các tế bào B sơ cấp của người theo cách phụ thuộc liều. Thứ năm, không quan sát thấy hoạt tính chủ vận phụ thuộc liều đáng kể trong các tế bào T hoặc B sơ cấp với các kháng thể kháng CD27 được thử nghiệm.

Các kháng thể theo sáng chế có thể gây nhiều khi gắn CD27:CD70, ức chế cả các chức năng của bộ phận tác động tế bào T và sự biệt hóa tế bào B với các tế bào huyết tương trong nuôi cấy tế bào và do đó có thể là có ích trong việc điều trị các bệnh qua trung gian miễn dịch bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính hoặc hội chứng, bệnh lý, bệnh khác hoặc rối loạn liên quan đến chức năng sai lệch hoặc sự hoạt hóa của các quần thể tế bào biểu hiện CD27. Các kháng thể liên kết với CD27 được mô tả ở đây nhận biết ít nhất ba vùng khác biệt trên miền ngoại bào của CD27 của người, chỉ ra sự phát hiện bổ sung về nhiều vị trí trên CD27 thích hợp làm đích của các kháng thể hoặc các hợp chất khác với khả năng phong bế chức năng tương tự. Do đó, sự biểu hiện và tinh sạch các miền liên kết kháng thể được đề cập ở đây là các trình tự axit amin còn đề xuất công cụ mà có thể là phương tiện để chọn lọc các phân tử mới biểu hiện hoạt tính trung hòa CD27.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD27 của người, có vùng liên kết bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 76-144 và kháng thể hoặc phần liên kết của nó liên kết miễn dịch đặc hiệu CD27. Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với protein CD27 và, ngoài ra, các kháng thể có các tính chất chức năng đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế, như:

liên kết với CD27 của người được cố định;

ức chế sự liên kết của CD27 hòa tan được của người với các tế bào biểu hiện CD70;

ức chế sự tạo tín hiệu CD27 qua trung gian CD70 của người được đo bằng thử nghiệm gen thông báo NF-kappaB ở IC50 nhỏ hơn 0,5ug/ml;

ức chế sự tăng sinh qua trung gian CD70 của các tế bào T nguyên thể;

ức chế sự tạo ra nguyên tương bào qua trung gian CD70 từ các tế bào B sơ cấp của người;

ức chế sự giải phóng chất trung gian hòa tan qua trung gian CD70 của người từ các tế bào hoặc dòng tế bào T và B sơ cấp;

liên kết với CD27 của người với K_d nhỏ hơn 100nM ($10^{-7}M$);

hoạt hóa tối thiểu sự tạo tín hiệu CD27 mà không có CD70 kích thích; và

liên kết với epitop trên miền ngoại bào CD27 của người mà các Mab có một hoặc nhiều trình tự vùng biến đổi là SEQ ID NO: 76-144 liên kết với và cạnh tranh để liên kết với các Mab được nhận diện có một hoặc nhiều trình tự vùng biến đổi là SEQ ID NO: 76-144.

Do đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này là các miền CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đóng vai trò quan trọng cụ thể trong tính đặc hiệu/ái lực liên kết của kháng thể đối với kháng nguyên, các kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế được bộc lộ ở đây tốt hơn là bao gồm một hoặc nhiều CDR của chuỗi nặng và nhẹ là SEQ ID NO: 1-75. Các kháng thể này có thể được điều chế bằng cách liên kết hóa học với các phần khác nhau (ví dụ, CDR, khung) của kháng thể bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, bằng cách điều chế và biểu hiện phân tử axit nucleic (tức là một hoặc nhiều) mà mã hóa kháng thể bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường của công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp khác bất kỳ.

Theo một phương án, các kháng thể ở người theo sáng chế có trình tự của một hoặc nhiều CDR của chuỗi nặng và nhẹ là SEQ ID NO: 1-75. Ngoài các trình tự CDR này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng một số sai lệch từ các trình tự CDR chính xác là có thể hoặc có thể mong muốn trong khi vẫn giữ được khả năng của kháng thể là liên kết với CD27 (ví dụ, các thay thế bảo

toàn). Do đó, theo một phương án khác, kháng thể ở người có thể bao gồm một hoặc nhiều CDR mà, ví dụ, giống 90%, 95%, 98% hoặc 99,5% với CDR được liệt kê trong SEQ ID NO: 1-75.

Trong một phương án khác, epitop được liên kết bởi các kháng thể theo sáng chế, bao gồm ít hơn năm epitop đối với tất cả các gốc 21-191 của protein CD27 hoặc trình tự mã hóa axit nucleic, do đó, có thể được sử dụng để gây miễn dịch cho đối tượng để sản sinh các kháng thể theo sáng chế một cách trực tiếp trong cơ thể chủ nhằm mục đích điều trị, phòng ngừa, hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc các triệu chứng của bệnh liên quan đến sự sản sinh CD27.

2. Tạo ra kháng thể trung hòa CD27

Kháng thể trung hòa CD27 biểu hiện phổ hoạt tính sinh học mong muốn như được lấy làm ví dụ ở đây bằng các kháng thể được bộc lộ và được mô tả, có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm kỹ thuật lai tạo tế bào soma tiêu chuẩn (phương pháp lai) của Kohler và Milstein (1975) *Nature* 256:495. Trong phương pháp lai, chuột hoặc động vật chủ thích hợp khác, như chuột hamster hoặc khỉ macaca, được gây miễn dịch như được mô tả ở đây để kích thích các tế bào lympho mà sản sinh hoặc có khả năng sản sinh các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với protein được sử dụng để gây miễn dịch. Theo một cách khác, các tế bào lympho có thể được gây miễn dịch in vitro. Sau đó, các tế bào lympho được dung hợp với các tế bào u tủy bằng cách sử dụng chất dung hợp thích hợp, như polyetylen glycol, để tạo ra tế bào lai (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles và Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Kháng thể trung hòa CD27 cũng có thể tùy ý được tạo ra bằng cách gây miễn dịch động vật chuyển gen (ví dụ, chuột, chuột nhắt, chuột hamster, động vật linh trưởng không phải người, và động vật tương tự) có khả năng sản sinh danh mục các kháng thể ở người, như được mô tả ở đây và/hoặc đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các tế bào mà sản sinh kháng thể kháng CD27 của người có thể được phân lập từ các động vật này và được cố định bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp, như các phương pháp được mô tả ở đây. Theo một cách khác, các trình tự

mã hóa kháng thể có thể tách dòng vô tính, đưa vào vector thích hợp, và sử dụng để chuyển nhiễm vào tế bào chủ để biểu hiện và phân lập kháng thể bằng các phương pháp được chỉ dẫn ở đây và các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc sử dụng chuột chuyển gen mang ổ gen globulin miễn dịch của người (Ig) trong cấu hình dòng mầm của chúng nhằm phân lập các kháng thể đơn dòng đầy đủ của người có ái lực cao kháng các đích khác nhau bao gồm các kháng nguyên bản thân của người mà hệ miễn dịch của người bình thường dung nạp (Lonberg, N. et al., US5569825, US6300129 and 1994, *Nature* 368:856-9; Green, L. et al., 1994, *Nature Genet.* 7:13-21; Green, L. & Jakobovits, 1998, *Exp. Med.* 188:483-95; Lonberg, N and Huszar, D., 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Kucherlapati, et al., US6713610; Bruggemann, M. et al., 1991, *Eur. J. Immunol.* 21:1323- 1326; Fishwild, D. et al., 1996, *Nat. Biotechnol.* 14:845-851; Mendez, M. et al., 1997, *Nat. Genet.* 15:146-156; Green, L., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Yang, X. et al., 1999, *Cancer Res.* 59:1236-1243; Brüggemann, M. and Taussig, M J., *Curr. Ổ gen globulin miễn dịch nội sinh trong chuột này có thể bị đứt hoặc loại bỏ để loại bỏ khả năng của động vật sản sinh các kháng thể được mã hóa bởi các gen nội sinh. Ngoài ra, các công ty, như Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) và Medarex (San Jose, Calif.) có thể kết hợp để tạo ra các kháng thể ở người trực tiếp kháng kháng nguyên được chọn bằng cách sử dụng công nghệ như được mô tả trên đây.*

Theo một phương án khác, kháng thể ở người được chọn từ thư viện thực khuẩn thể, mà thực khuẩn thể này bao gồm các gen globulin miễn dịch của người và thư viện biểu hiện miễn liên kết kháng thể ở người như, ví dụ, các kháng thể chuỗi đơn (single chain antibody-scFv), Fab, hoặc một số cấu trúc khác bộc lộ vùng biến đổi kháng thể ghép cặp hoặc không ghép cặp (Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996); Sheets et al., *PITAS (USA)* 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Các kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế cũng có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp biểu hiện thực khuẩn thể để sàng lọc các thư viện của các gen globulin miễn dịch của người. Các phương pháp

biểu hiện thực khuẩn thể này để phân lập các kháng thể ở người được thiết lập trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ: Patent Mỹ số 5223409; 5403484; và 5571698 của Ladner và đồng tác giả; Patent Mỹ số 5427908 và 5580717 của Dower và đồng tác giả; Patent Mỹ số 5969108 và 6172197 của McCafferty và đồng tác giả; và Patent Mỹ số 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 và 6593081 của Griffiths và các đồng tác giả.

Việc điều chế các kháng sơ cấp miễn dịch, và sản xuất kháng thể đơn dòng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật thích hợp bất kỳ, như sản xuất protein tái tổ hợp. Các kháng sơ cấp miễn dịch có thể được cho động vật dùng dưới dạng protein được tinh sạch, hoặc các hỗn hợp protein bao gồm toàn bộ các phần chiết của một hoặc nhiều tế bào hoặc mô, hoặc kháng nguyên có thể được tạo ra mới (de novo) trong cơ thể động vật từ các axit nucleic mã hóa kháng nguyên này hoặc một phần của nó.

Các axit nucleic được phân lập theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng (a) các phương pháp tái tổ hợp, (b) các kỹ thuật tổng hợp, (c) các kỹ thuật tinh sạch, hoặc các tổ hợp của nó, như đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. ADN mã hóa các kháng thể đơn dòng đã được phân lập và xác định trình tự bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, bằng cách sử dụng các đoạn dò oligonucleotit mà có khả năng liên kết đặc hiệu với các gen mã hóa chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể chuột). Nếu tế bào lai được tạo ra, các tế bào này có thể nhằm làm nguồn ADN này. Theo cách khác, bằng cách sử dụng các kỹ thuật biểu hiện, trong đó trình tự mã hóa và sản phẩm dịch mã được liên kết, như các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể hoặc thể ribosom, việc chọn chất liên kết và axit nucleic được đơn giản hóa. Sau khi chọn thực khuẩn thể, các vùng mã hóa kháng thể từ thực khuẩn thể có thể được phân lập và sử dụng để tạo ra toàn bộ các kháng thể, bao gồm các kháng thể ở người, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên mong muốn bất kỳ khác, và được biểu hiện trong vật chủ mong muốn bất kỳ, bao gồm các tế bào của động vật có vú, các tế bào của côn trùng, các tế bào thực vật, nấm men, và vi khuẩn.

Các kháng thể được nhân hóa

Sáng chế còn đề xuất các globulin miễn dịch (hoặc các kháng thể) được nhân hóa (được thiết kế hoặc làm thích ứng với người) mà liên kết với CD27 của người. Dạng được nhân hóa của các globulin miễn dịch có (các) vùng khung biến đổi hầu như từ globulin miễn dịch của người (gọi là globulin miễn dịch của thụ thể) và các CDR hầu như từ Mab không phải của người mà liên kết đặc hiệu với CD27. (Các) vùng hằng định, nếu có, hầu như cũng từ globulin miễn dịch của người. Các kháng thể được nhân hóa có K_D đối với CD27 ít nhất là khoảng $10^{-6}M$ (1 microM), khoảng $10^{-7}M$ (100 nM), hoặc nhỏ hơn. Ái lực liên kết của các kháng thể được nhân hóa có thể lớn hơn hoặc nhỏ hơn so với ái lực liên kết của kháng thể chuột mà chúng thu được. Để ảnh hưởng đến sự thay đổi trong ái lực, ví dụ, cải thiện ái lực, của kháng thể được nhân hóa đối với các thay thế CD27 trong các gốc CDR hoặc các gốc của người có thể được tạo ra.

Sự thay thế của CDR chuột vào khung miễn biến đổi của người gần như có thể dẫn đến việc duy trì sự định hướng lập thể chính xác của chúng nếu khung miễn biến đổi của người chấp nhận cấu hình giống hoặc tương tự với khung biến đổi của chuột mà các CDR được bắt nguồn. Việc này đạt được bằng cách thu các miền biến đổi của người từ các kháng thể ở người mà các trình tự khung biểu hiện mức độ giống về trình tự cao với các miền khung biến đổi của chuột mà các CDR thu được. Vùng khung biến đổi chuỗi nặng và nhẹ có thể thu được từ các trình tự kháng thể ở người giống hoặc khác nhau. Các trình tự kháng thể ở người có thể là các trình tự của các kháng thể ở người xuất hiện tự nhiên, thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người, hoặc có thể là các trình tự liên ứng của một vài trình tự kháng thể ở người và/hoặc dòng mầm.

Các trình tự kháng thể ở người thích hợp được nhận diện bằng cách so sánh qua máy tính các trình tự axit amin của các vùng biến đổi của chuột với các trình tự các kháng thể ở người đã được biết đến. Việc so sánh được thực hiện riêng biệt đối với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nhưng về nguyên lý là tương tự như nhau.

Trong một ví dụ, trình tự axit amin của mAb trung hòa CD27 được sử dụng để truy vấn cơ sở dữ liệu về kháng thể ở người được tập hợp từ các cơ sở dữ liệu về trình tự kháng thể. Vùng biến đổi chuỗi nặng được bộc lộ hoặc được mô tả ở đây có

thể được sử dụng để phát hiện vùng biến đổi của người với mức độ giống về trình tự cao nhất. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được bộc lộ hoặc được mô tả ở đây có thể, tương tự, được sử dụng để phát hiện vùng biến đổi của người với mức độ giống về trình tự cao nhất. Cấu trúc ADN mà trong đó các vùng mã hóa cho các CDR của một trong số các vùng biến đổi chuỗi nặng từ thể cho Mab của chuột được truyền vào trình tự biến đổi chuỗi nặng của người được chọn, việc thay thế các CDR của vùng biến đổi của người được chuẩn bị đối với từng vùng biến đổi của chuột.

Vị trí kề nhau không tự nhiên của các vùng CDR của chuột với vùng khung biến đổi của người có thể dẫn đến các cản trở cấu hình không tự nhiên, mà, trừ khi được điều chỉnh bằng cách thay thế một số gốc axit amin, dẫn đến hao hụt ái lực liên kết. Như được nêu trên đây, các kháng thể được nhân hóa theo sáng chế bao gồm (các) vùng khung biến đổi hầu như từ globulin miễn dịch của người và các CDR hầu như từ globulin miễn dịch của chuột (ví dụ, các kháng thể chuột C2177, C2186, C2191, hoặc C2192). Sau khi đã nhận biết các CDR của các kháng thể chuột và các trình tự globulin miễn dịch của người nhận thích hợp, bước tiếp theo là xác định, liệu, các gốc từ các thành phần này có nên được thay thế để tối ưu hóa các tính chất của kháng thể được nhân hóa thu được. Nói chung, sự thay thế các gốc axit amin của người với chuột nên được tối thiểu hóa, vì việc đưa vào các gốc của chuột làm tăng nguy cơ kháng thể gây ra đáp ứng HAMA ở người. Các axit amin được chọn để thay thế dựa trên khả năng có thể ảnh hưởng của chúng đến cấu hình CDR và/hoặc việc liên kết với kháng nguyên. Nghiên cứu về các khả năng có thể ảnh hưởng này có thể được thực hiện bằng cách tạo mô hình, kiểm tra các đặc tính của axit amin ở các vị trí cụ thể, hoặc quan sát thực nghiệm các tác dụng của việc thay thế hoặc phát sinh đột biến của các axit amin cụ thể. Về phương pháp thực nghiệm, phát hiện ra rằng đặc biệt thuận lợi nhằm tạo ra thư viện của các trình tự biến thể mà có thể được sàng lọc về hoạt tính, ái lực liên kết hoặc tính đặc hiệu mong muốn. Một phương thức tạo ra thư viện của các biến thể này là vectơ biểu hiện thực khuẩn thể. Theo một cách khác, các biến thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp khác mà biến đổi trình tự axit nucleic mã hóa các gốc đích trong miền biến đổi.

Một phương pháp khác xác định liệu rằng việc thay thế thêm có được yêu cầu

hay không, và việc chọn các gốc axit amin để thay thế, có thể được hoàn thành bằng cách sử dụng tạo mô hình trên máy tính. Phần cứng và phần mềm máy tính để tạo ra các hình ảnh ba chiều của các phân tử globulin miễn dịch là sẵn có một cách rộng rãi. Nói chung, các mô hình phân tử được tạo ra bắt đầu từ các cấu trúc được giải đối với các chuỗi globulin miễn dịch hoặc các miền của nó. Các chuỗi được tạo mô hình này được so sánh tính tương tự về trình tự axit amin với các chuỗi hoặc miền của cấu trúc ba chiều được giải, và các chuỗi hoặc miền này thể hiện tính tương tự về trình tự lớn nhất được chọn làm điểm ban đầu cho cấu trúc của mô hình phân tử. Các cấu trúc bắt đầu đã được giải được biến đổi để cho phép sự khác nhau giữa các axit amin thật trong các chuỗi hoặc miền globulin miễn dịch được tạo mô hình, và chuỗi hoặc miền trong cấu trúc bắt đầu. Sau đó, các cấu trúc được biến đổi được kết hợp vào globulin miễn dịch đa hợp. Cuối cùng, mô hình này được cải tiến bằng cách tối thiểu hóa năng lượng và bằng cách xác thực rằng tất cả các nguyên tố là nằm trong các khoảng cách thích hợp với nguyên tố khác và độ dài và góc liên kết là nằm trong các giới hạn chấp nhận được về mặt hóa học.

Thông thường, các vùng CDR trong các kháng thể được nhân hóa hầu như giống hệt, và thông thường hơn, giống hệt với các vùng CDR tương ứng trong kháng thể chuột mà chúng thu được từ đó. Mặc dù không thường được mong muốn, đôi khi có thể tạo ra một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bảo toàn của các gốc CDR mà không ảnh hưởng đáng kể đến ái lực liên kết của globulin miễn dịch được nhân hóa thu được. Đôi khi, sự thay thế của các vùng CDR có thể tăng cường ái lực liên kết.

Khác với sự thay thế axit amin đặc hiệu được đề cập trên đây, các vùng khung của các globulin miễn dịch được nhân hóa hầu như thường giống hệt, và, thông thường hơn nữa, giống hệt với các vùng khung của các kháng thể ở người mà chúng thu được từ đó. Tất nhiên là, nhiều trong số các axit amin trong vùng khung tạo ra sự đóng góp nhỏ hoặc không tạo ra sự đóng góp trực tiếp vào tính đặc hiệu hoặc ái lực của kháng thể. Do đó, nhiều sự thay thế bảo toàn riêng biệt của các gốc khung có thể được dung nạp mà không thay đổi đáng kể tính đặc hiệu hoặc ái lực của globulin miễn dịch được nhân hóa thu được.

Do sự suy biến mã, các trình tự axit nucleic khác nhau sẽ mã hóa từng trình tự

axit amin của globulin miễn dịch. Các trình tự axit nucleic mong muốn có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp ADN pha rắn mới (de nova) hoặc bằng cách phát sinh đột biến PCR của biến thể được điều chế trước đó của polynucleotit mong muốn. Tất cả các axit nucleic mã hóa các kháng thể được mô tả trong đơn này được bao gồm tuyệt đối trong sáng chế.

Đoạn biến đổi của các kháng thể được nhân hóa được tạo ra như được mô tả trên đây được liên kết đặc hiệu với ít nhất một phần vùng hằng định globulin miễn dịch của người. Kháng thể sẽ chứa cả vùng hằng định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng thường bao gồm miền CH1, bản lề, CH2, CH3, và, đôi khi, CH4.

Các kháng thể được nhân hóa có thể bao gồm loại miền hằng định bất kỳ từ lớp kháng thể bất kỳ, bao gồm IgM, IgG, IgD, IgA và IgE, và lớp phụ bất kỳ (isotyp), bao gồm IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Khi được mong muốn rằng kháng thể được nhân hóa biểu hiện hoạt tính độc tế bào, miền hằng định thường là miền hằng định định vị bổ thể và lớp cụ thể là IgG1. Khi hoạt tính độc tế bào này là không mong muốn, miền hằng định có thể là lớp IgG2. Kháng thể được nhân hóa có thể bao gồm các trình tự từ nhiều hơn một lớp hoặc isotyp.

Axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng được nhân hóa, tùy ý được liên kết với các vùng hằng định, được xen vào các vector biểu hiện. Chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể được tách dòng vô tính trong các vector biểu hiện giống hoặc khác nhau. Các đoạn ADN mã hóa chuỗi globulin miễn dịch được liên kết hoạt động với các trình tự kiểm soát trong (các) vector biểu hiện mà đảm bảo sự biểu hiện của polypeptit của globulin miễn dịch. Các trình tự kiểm soát này bao gồm trình tự tín hiệu, trình tự khởi đầu, trình tự tăng cường, và trình tự kết thúc phiên mã (xem, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029 (1989); WO 90/07861; Co et al., J. Immunol. 148, 1149 (1992)).

Tính hiệu quả của protein điều trị có thể bị giới hạn bởi các phản ứng miễn dịch không mong muốn. Các kháng thể đơn dòng không phải của người có thể có các đoạn hầu như căng duỗi trong các trình tự axit amin thẳng và các cấu hình cấu

trúc cục bộ mà có thể gây ra đáp ứng miễn dịch ở người. Nỗ lực đầu tiên để làm giảm tính sinh miễn dịch của các kháng thể không phải của người là cấu trúc dạng khảm của các kháng thể người-chuột, mà sau đó là các phương pháp nhân hóa các dạng khảm này trong nửa cuối những năm 1980 (xem trong: Almagro and Fransson, *Front Biosci* 13: 1619-1633, 2008).

Một trong số các phương pháp nhân hóa thường được sử dụng nhất còn được gọi là “ghép vùng xác định hỗ trợ (CDR)” trong đó CDR của chuột được ghép vào các vùng khung kháng thể ở người (framework region-FR's). Tuy nhiên, việc áp dụng phương pháp này thường xuyên hơn dẫn đến sự hao hụt đáng kể sự liên kết với kháng nguyên và do đó là làm giảm sự hiệu nghiệm của dược chất dựa trên kháng thể. Do đó, được đánh giá cao khi sử dụng các nguyên lý thiết kế hợp lý để tạo ra các phân tử kháng thể mà gây ra các phản ứng sinh miễn dịch tối thiểu trong khi duy trì sự liên kết và profin sinh lý của phân tử gốc không phải của người khi được tiêm vào người.

Việc nhân hóa của 2177 và 2191, hai kháng thể đơn dòng chuột (mAb) có tính đặc hiệu liên kết với CD27 được mô tả. Các khung (framework-FR) của các kháng thể này được thay thế bằng các FR gen dòng mầm của người bằng cách sử dụng bước thứ nhất của công nghệ nhân hóa độc quyền của Janssen được gọi là sự thích ứng khung của người (Human Framework Adaption-HFA) được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent của Raghunathan, G., US20090118127 A1 và còn được lấy làm ví dụ trong Fransson và đồng tác giả (*J Mol Biol* 398:214-231, 2010). Công nghệ này làm cho bộ mAb đặc hiệu đối với CD27 có tính chất liên kết và ức chế tốt hơn so với các mAb được đánh giá đối với các kháng thể chuột 2177 và 2191 gốc.

3. Phương pháp sử dụng kháng thể kháng CD27

Như được mô tả chi tiết dưới đây, sáng chế chứng tỏ rằng bốn kháng thể đơn dòng được phân lập (C2177, C2186, C2191, và C2192) liên kết ba epitop không chồng nhau trên CD27 và biểu hiện in vitro và/hoặc in vivo các hoạt tính ức chế CD27. Đáng kể là, tính phản ứng của các mAb bao gồm khả năng tương tác của CD27 phong bế phụ thuộc liều với CD70, làm giảm việc tạo tín hiệu của CD27 khi

có mặt của CD70, làm giảm sự sản sinh IL-4 và IFN γ bằng các tế bào T, và ức chế sự tăng sinh của tế bào T CD4 $^{+}$ nguyên thể của người phụ thuộc CD70, sự tăng sinh tế bào B phụ thuộc CD70 và sự tạo ra tế bào huyết tương. Hơn nữa, các kháng thể được phân lập không cảm ứng một cách đáng kể sự hoạt hóa CD27 khi không có CD70 kích thích.

Các tính chất của các kháng thể đơn dòng được đưa ra như được mô tả trong sáng chế, các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó là thích hợp làm chất điều trị bệnh và phòng ngừa bệnh để điều trị hoặc phòng ngừa các tình trạng bệnh liên quan đến CD27 ở người và động vật.

Nói chung, việc sử dụng bao gồm cho đối tượng mắc hoặc đối tượng biểu hiện tình trạng bệnh mà trong đó hoạt tính CD27 được biết đến là có các di chứng bệnh lý, như các rối loạn miễn dịch hoặc sự phát triển khối u và sự di căn dùng một lượng hữu hiệu để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh của một hoặc nhiều các kháng thể đơn dòng hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế, hoặc kháng thể hoặc phân tử được chọn để có phổ tương tự của hoạt tính liên kết và sinh học. Dạng hoạt tính bất kỳ của kháng thể có thể được dùng, bao gồm các đoạn Fab và F(ab') $_2$.

Tốt hơn là, các kháng thể được sử dụng có thể tương thích với loài nhận sao cho đáp ứng miễn dịch với các mAb không dẫn đến thời gian bán hủy tuần hoàn ngắn không chấp nhận được hoặc kích thích đáp ứng miễn dịch với các mAb trong đối tượng này. Các mAb được sử dụng có thể biểu hiện một số chức năng phụ, như liên kết với các thụ thể Fc của đối tượng và hoạt hóa cơ chế của ADCC, để làm suy kiệt quần thể tế bào đích bằng cách sử dụng cơ chế hủy tế bào hoặc độc tế bào hoặc chúng có thể được thiết kế bằng cách giới hạn hoặc không có các chức năng phụ của bộ phận tác động này để bảo quản quần thể tế bào đích.

Việc điều trị bệnh cho các cá thể có thể bao gồm việc dùng một lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của các kháng thể theo sáng chế. Các kháng thể có thể được tạo ra trong kit như được mô tả dưới đây. Các kháng thể có thể được sử dụng hoặc dùng ở dạng hỗn hợp, ví dụ, với các lượng bằng nhau, hoặc riêng biệt, được dùng lần lượt, hoặc được dùng đồng thời. Khi dùng các kháng thể, hoặc các mảnh của nó cho bệnh

nhân, có khả năng liên kết với CD27, hoặc kháng thể có khả năng bảo vệ kháng CD27 trong bệnh nhân nhận, liều của chất được dùng sẽ thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố như tuổi, cân nặng, chiều cao, giới tính, tình trạng sức khỏe chung, tiền sử sức khỏe trước đó, v.v. của bệnh nhân.

Theo cách tiếp cận tương tự, việc sử dụng điều trị bệnh khác của các kháng thể đơn dòng theo sáng chế là gây miễn dịch hoạt tính cho bệnh nhân bằng cách sử dụng kháng thể kháng idiotyp kháng một trong các kháng thể đơn dòng này. Việc gây miễn dịch với kháng idiotyp mà bắt chước cấu trúc của epitop có thể gây ra đáp ứng kháng CD27 hoạt tính (Linthicum, D. S. and Farid, N. R., *Anti-idiotypes, Receptors, and Molecular Mimicry* (1988), pp 1-5 và 285-300).

Tương tự, việc gây miễn dịch hoạt tính có thể được kích thích bằng cách dùng một hoặc nhiều các epitop kháng nguyên và/hoặc sinh miễn dịch làm thành phần của vaccin. Việc tiêm vaccin có thể được thực hiện theo đường miệng hoặc đường ngoài ruột với lượng đủ để làm cho đối tượng nhận tạo ra các kháng thể bảo vệ kháng vùng chức năng sinh học này, phòng ngừa bệnh hoặc điều trị bệnh. Vật chủ có thể được gây miễn dịch hoạt tính với peptit kháng nguyên/sinh miễn dịch ở dạng tinh khiết, mảnh của peptit này, hoặc dạng biến đổi của peptit này. Một hoặc nhiều axit amin, không tương ứng với trình tự protein gốc có thể được bổ sung vào đầu amino hoặc carboxyl của peptit gốc, hoặc dạng cắt cụt của peptit. Các axit amin thêm này là hữu dụng trong việc ghép cặp peptit này với peptit khác, thành protein mang lớn hơn, hoặc thể hỗ trợ. Các axit amin mà hữu dụng cho các mục đích này bao gồm: tyrosin, lysin, axit glutamic, axit aspartic, cystein và các dẫn xuất của nó. Các kỹ thuật biến đổi protein thay thế có thể được sử dụng, ví dụ, axetyl hóa NH₂ hoặc amin hóa đầu COOH, để tạo ra phương tiện bổ sung để ghép cặp hoặc dung hợp peptit với phân tử protein hoặc peptit khác hoặc với thể hỗ trợ.

Các kháng thể có khả năng bảo vệ kháng hoạt tính sinh học CD27 không mong muốn được sử dụng cho các đối tượng nhận với lượng đủ để có tác dụng làm giảm, phân giải, hoặc cải thiện triệu chứng hoặc bệnh lý liên quan đến CD27. Lượng được coi là đủ hoặc "lượng hữu hiệu điều trị bệnh" để "có tác dụng" làm giảm các triệu chứng nếu liều dùng, đường dùng, v.v. của chất là đủ để ảnh hưởng đến đáp

ứng này. Các đáp ứng với việc dùng kháng thể có thể được đo bằng cách phân tích các mô, cơ quan hoặc tế bào bị ảnh hưởng của đối tượng như bằng các kỹ thuật tạo ảnh hoặc bằng phân tích ex vivo của các mẫu mô. Một chất là đáng kể về mặt sinh lý học nếu sự có mặt của nó dẫn đến sự thay đổi có thể nhận thấy trong sinh lý của bệnh nhân nhận.

Các ứng dụng điều trị bệnh

Các kháng thể trung hòa CD27 theo sáng chế, các mảnh liên kết kháng nguyên, hoặc các biến thể đặc hiệu của nó có thể được sử dụng để đánh giá hoặc gây ra tác dụng trong tế bào, mô, cơ quan hoặc động vật (bao gồm động vật có vú và người), để chẩn đoán, giám sát, điều biến, điều trị, giảm đau, giúp phòng ngừa tỷ lệ mắc, hoặc làm giảm các triệu chứng, của tình trạng bệnh qua trung gian, bị ảnh hưởng hoặc điều biến bằng CD27 hoặc các tế bào biểu hiện CD27. Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp điều biến hoặc điều trị ít nhất một bệnh liên quan đến CD27, trong tế bào, mô, cơ quan, động vật, hoặc bệnh nhân, đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc như được mô tả ở đây, bằng cách sử dụng ít nhất một kháng thể CD27 theo sáng chế. Các chỉ dẫn cụ thể được mô tả dưới đây.

Bệnh liên quan đến miễn dịch

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều biến hoặc điều trị bệnh viêm liên quan đến miễn dịch, trong tế bào, mô, cơ quan, động vật, hoặc bệnh nhân bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp dạng thấp ở thiếu niên, bệnh viêm khớp dạng thấp xâm nhập toàn bộ cơ thể ở thiếu niên, bệnh vảy nến, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh loét dạ dày, các bệnh khớp cơ và mô, bệnh viêm khớp xương, bệnh viêm ruột, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh luput ban đỏ hệ thống, hội chứng kháng thể kháng phospholipit, bệnh viêm tế bào đốm sắc/viêm nhãn cầu mạch vỏ bọc/viêm thần kinh thị giác, bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh viêm mạch/u hạt wegener, bệnh saccoit, bệnh viêm tinh hoàn/bệnh liên quan đến các quá trình phẫu thuật nối ống dẫn tinh, bệnh dị ứng/bệnh lạc chỗ dị ứng, bệnh hen, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh eczema, bệnh viêm da tiếp xúc dị ứng, bệnh viêm kết mạc dị ứng, bệnh phổi tăng mẫn cảm, các bệnh cấy ghép, bệnh thải bỏ cấy ghép cơ quan,

bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ, hội chứng đáp ứng viêm hệ thống, hội chứng nhiễm khuẩn, bệnh nhiễm khuẩn gram dương, bệnh nhiễm khuẩn gram âm, bệnh nhiễm khuẩn canh trường âm, bệnh nhiễm khuẩn nấm, bệnh sốt do giảm bạch cầu, bệnh nhiễm khuẩn niệu, bệnh viêm màng não cầu khuẩn, chấn thương/xuất huyết, bỏng, bệnh do tiếp xúc với bức xạ ion hóa, bệnh viêm tụy cấp, hội chứng suy kiệt phổi cấp tính ở người lớn, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm gan cảm ứng bởi rượu, các bệnh viêm mạn tính, bệnh socola, bệnh Crohn, bệnh thiếu máu hồng cầu lưỡi liềm, bệnh tiểu đường, bệnh hư thận, các bệnh lạc chỗ dị ứng, các phản ứng mẫn cảm, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh sốt mùa hè, bệnh viêm mũi kinh niên, bệnh viêm kết mạc, bệnh lạc nội mạc tử cung, bệnh hen, bệnh mê đay, bệnh phản vệ toàn thân, bệnh viêm da, bệnh thiếu máu ác tính, bệnh tan máu, bệnh thiếu phiến huyết nhỏ, bệnh thải bỏ mảnh ghép của cơ quan hoặc mô bất kỳ, bệnh thải bỏ ghép thận, bệnh thải bỏ ghép tim, bệnh thải bỏ ghép gan, bệnh thải bỏ ghép lá lách, bệnh thải bỏ ghép phổi, bệnh thải bỏ ghép tủy xương (bone marrow transplant-BMT), bệnh thải bỏ ghép mô ở da, bệnh thải bỏ ghép sụn, bệnh thải bỏ ghép xương, bệnh thải bỏ ghép ruột non, bệnh thải bỏ cấy dưới da tuyến ức thai nhi, bệnh thải bỏ ghép tuyến cận giáp, bệnh thải bỏ ghép ngoại lai của cơ quan hoặc mô bất kỳ, bệnh thải bỏ mảnh dị ghép, các phản ứng mẫn cảm kháng thụ thể, bệnh Graves, bệnh Raynaud, bệnh tiểu đường kháng insulin typ B, bệnh hen, bệnh nhược cơ, tính độc tế bào qua trung gian là kháng thể, các phản ứng mẫn cảm typ III, luput ban đỏ hệ thống, hội chứng đa dây thần kinh, cơ quan cảm giác, bệnh nội tiết, bệnh gama đơn dòng, hội chứng thay da POEMS (POEMS-polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, và skin changes syndrome), hội chứng kháng thể kháng phospholipid, bệnh pemphigut, bệnh cứng da, bệnh mô liên kết, bệnh Addison tự phát, bệnh đái tháo đường, bệnh viêm gan mạn hoạt động, bệnh viêm gan nguyên phát, bệnh bạch biến, bệnh viêm mạch, hội chứng mở tim sau MI, bệnh mẫn cảm typ IV, bệnh viêm da tiếp xúc, bệnh phổi tăng mẫn cảm, bệnh thải bỏ mảnh dị ghép, u hạt do các cơ quan nội bào, bệnh nhạy cảm với dược chất, trao đổi chất/tự phát, bệnh Wilson, bệnh thặng dư sắt mô, bệnh thiếu men alpha-1-antitrypsin, bệnh vồng mạc tiểu đường, bệnh viêm tuyến giáp, bệnh xốp xương, bệnh bình tuyến tuyến dưới đồi-tuyến yên-

tuyến thượng thận, bệnh xơ gan mật nguyên phát, bệnh viêm tuyến giáp, bệnh viêm não, bệnh suy giảm sức khỏe, bệnh xơ nang, bệnh phổi mạn tính ở trẻ sơ sinh, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính (chronic obstructive pulmonary disease-COPD), hội chứng thực bào lympho tế bào máu di truyền, các tình trạng bệnh ngoài da, bệnh vảy nến, bệnh hói, hội chứng hư thận, bệnh viêm thận, bệnh viêm cầu thận, bệnh suy thận cấp, bệnh thâm tách máu, bệnh ure-huyết, tính độc, bệnh tiền sản giật, liệu pháp OKT3, liệu pháp kháng CD3, liệu pháp xytokin, liệu pháp hóa học, liệu pháp bức xạ (ví dụ, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh suy nhược, bệnh thiếu máu, bệnh suy giảm sức khỏe, và bệnh tương tự), bệnh ngộ độc salixylat mạn tính, và bệnh tương tự.

Bệnh phổi

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều biến hoặc điều trị bệnh phổi hoặc màng phổi trong tế bào, mô, cơ quan, động vật hoặc bệnh nhân, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, điều biến đáp ứng miễn dịch liên quan hoặc các tế bào phụ thuộc hoặc các quá trình tế bào liên quan đến CD27, ví dụ, bệnh viêm phổi; bệnh áp xe phổi; bệnh phổi nghề nghiệp gây ra bởi các chất dưới dạng bụi, khí, hoặc sương mù; bệnh hen, bệnh tắc nghẽn xơ cuống phổi, bệnh suy hô hấp, các bệnh mãn cảm của phổi bao gồm bệnh phổi tăng mẫn cảm (bệnh viêm phế nang dị ứng ngoại lai), bệnh phế quản phổi dị ứng tiên phát, và các phản ứng với thuốc; hội chứng suy kiệt phổi cấp tính ở người lớn (ARDS), hội chứng Goodpasture, rối loạn phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), các bệnh phổi mô kẽ tự phát như bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh saccoit, bệnh viêm phổi mô kẽ vảy, bệnh viêm phổi mô kẽ cấp tính, bệnh phổi mô kẽ có liên quan đến hô hấp cuống phổi, bệnh tắc nghẽn cuống phổi tự phát với bệnh viêm phổi hoạt động, bệnh viêm phổi mô kẽ tế bào lympho, bệnh u hạt tế bào Langerhans, bệnh nhiễm hemosiderin phổi cấp tính; bệnh viêm phế quản cấp tính, bệnh tích protein mô túi phổi, bệnh giãn phế quản, các rối loạn màng phổi, bệnh xẹp phổi, bệnh xơ nang, và các khối u phổi, và bệnh tắc mạch phổi.

Bệnh ác tính

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều biến hoặc điều trị bệnh ác tính trong

tế bào, mô, cơ quan, động vật hoặc bệnh nhân, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, điều biến đáp ứng miễn dịch liên quan đến hoặc các tế bào phụ thuộc hoặc các quá trình tế bào liên quan đến CD27, ít nhất một trong số: bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu cấp tính, bệnh bạch cầu lympho cấp tính (acute lymphoblastic leukemia-ALL), ALL tế bào B, tế bào T hoặc FAB, bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính (acute myeloid leukemia-AML), bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính (chronic myelocytic leukemia-CML), bệnh bạch cầu lympho mạn tính (chronic lymphocytic leukemia-CLL), bệnh bạch cầu tế bào lông, hội chứng loạn sản tủy (myelodysplastic syndrome-MDS), u lympho, bệnh Hodgkin, u lympho ác tính, u lympho không phải Hodgkin, u lympho Burkitt, bệnh đa u tủy, các khối u dạng rắn là bệnh nguyên phát hoặc bệnh di căn, bướu thịt Kaposi, bệnh ung thư biểu mô đại trực tràng, bệnh ung thư biểu mô tuyến tụy, bệnh ung thư biểu mô tế bào thận, bệnh ung thư phổi bao gồm u trung biểu mô, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư biểu mô mũi-họng, u mô bào ác tính, hội chứng cận ung thư/hội chứng tăng canxi huyết ác tính, các bệnh ung thư tuyến, bệnh ung thư biểu mô tế bào vảy, các bướu thịt, khối u ác tính, khối u di căn đặc thù, u mạch, bệnh di căn, bệnh loãng xương liên quan đến bệnh ung thư, bệnh nhức xương liên quan đến bệnh ung thư, và bệnh tương tự.

Bệnh tim mạch

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều biến hoặc điều trị bệnh tim mạch trong tế bào, mô, cơ quan, động vật, hoặc bệnh nhân, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, điều biến đáp ứng miễn dịch liên quan đến hoặc các tế bào phụ thuộc hoặc các quá trình tế bào liên quan đến CD27, ít nhất một trong số bệnh nhồi máu cơ tim, bệnh suy tim sung huyết, đột quỵ, đột quỵ do thiếu máu cục bộ, chứng xuất huyết, chứng xơ cứng động mạch, chứng xơ vữa động mạch, bệnh tái phát hẹp nặng, bệnh xơ vữa động mạch do tiểu đường, chứng tăng huyết áp, chứng tăng huyết áp động mạch, chứng tăng huyết áp tĩnh mạch, ngất, sốc, bệnh giang mai của hệ tim mạch, bệnh suy tim, bệnh tim phổi, chứng tăng huyết áp do phổi nguyên phát, bệnh loạn nhịp tim, chứng đập lạc vị tâm nhĩ, bệnh cuồng động tâm nhĩ, bệnh rung tâm nhĩ (kéo dài hoặc bộc phát), hội chứng sau truyền dịch, đáp ứng viêm tim phổi nhân tạo, chứng nhịp tim tâm nhĩ nhiều ổ nhanh hoặc loạn, chứng nhịp tim nhanh QRS hẹp

đều đặn, rối loạn nhịp tim đặc hiệu, chứng rung tâm thất, rối loạn nhịp tim bó His, bệnh nghẽn nhĩ thất, bệnh nghẽn bó nhánh, các rối loạn thiếu máu cục bộ cơ tim, bệnh động mạch vành, chứng đau thắt ngực, bệnh nhồi máu cơ tim, bệnh cơ tim, bệnh cơ tim sung huyết mở rộng, bệnh cơ tim hạn chế, các bệnh về van tim, bệnh viêm màng trong tim, bệnh màng ngoài tim, các khối u ở tim, bệnh mỏng động mạch ngoại biên và động mạch chủ, bệnh tách thành động mạch chủ, bệnh viêm của động mạch chủ, chứng bít cơ của động mạch chủ mạc bụng và các nhánh của nó, các rối loạn mạch ngoại biên, các rối loạn động mạch bít cơ, bệnh xơ cứng động mạch ngoại biên, bệnh viêm tắc mạch, các rối loạn động mạch ngoại biên chức năng, hiện tượng và bệnh Raynaud, chứng xanh tím chân tay, chứng đau đỏ chân tay, các bệnh về tĩnh mạch, chứng huyết khối tĩnh mạch, chứng giãn tĩnh mạch, chứng thông động tĩnh mạch, bệnh bạch cầu, chứng phù mỡ, bệnh đau thắt ngực không ổn định, tổn thương do thiếu máu, hội chứng sau bơm, tổn thương do thiếu máu cục bộ, và bệnh tương tự.

Bệnh thần kinh

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều biến hoặc điều trị bệnh thần kinh trong tế bào, mô, cơ quan, động vật hoặc bệnh nhân, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, điều biến điều biến đáp ứng miễn dịch liên quan đến hoặc các tế bào phụ thuộc hoặc các quá trình tế bào liên quan đến CD27 trong: các bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh đa xơ cứng, bệnh đau nửa đầu, bệnh suy giảm nhận thức do AIDS, các bệnh đa dây thần kinh loại bỏ myelin, như bệnh đa xơ cứng và bệnh viêm tủy ngang cấp tính; các rối loạn ngoại tháp và tiểu não như các thương tổn của hệ vỏ não-tủy sống; các rối loạn của hạch nền hoặc các rối loạn tiểu não; các rối loạn tăng động vận động, như chứng múa giật Huntington và chứng múa giật lão suy; các rối loạn vận động cảm ứng do thuốc, như các rối loạn cảm ứng do thuốc mà phong bế các thụ thể CNS dopamin; các rối loạn vận động giảm hoạt động, như bệnh Parkinson; bệnh liệt trên nhân tiến triển; các thương tổn cấu trúc của tiểu não; các bệnh thoái hóa tiểu não, như bệnh loại bỏ điều hòa tủy sống, bệnh loại bỏ điều hòa Friedreich, các bệnh thoái hóa vỏ tiểu não, các bệnh thoái hóa đa hệ (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, và Machado-Joseph); các rối loạn hệ thống (bệnh Refsum, rối loạn gen lặn nhiễm sắc thể thường, bệnh loại bỏ điều hòa, chứng giãn mao mạch, và rối loạn đa

hệ ti thể); các rối loạn lõi loại bỏ myelin, như bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm tủy ngang cấp tính; và các rối loạn của cơ vận động, như các bệnh teo cơ do thần kinh (bệnh suy thoái tế bào sừng trước, như bệnh xơ cứng teo cơ một bên, bệnh teo cơ tủy ở trẻ em và bệnh teo cơ tủy ở thanh thiếu niên); bệnh Alzheimer; bệnh Down; bệnh thể Lewy lan tỏa; chứng lú lẫn tuổi già liên quan đến sự phát triển của thể Lewy; hội chứng Wernicke-Korsakoff; chứng nghiện rượu lâu năm; bệnh Creutzfeldt-Jakob; bệnh viêm não xơ hóa bán cấp tiến triển, bệnh Hallerorden-Spatz; và chứng sa sút trí tuệ do chấn thương, và bệnh tương tự. Phương pháp này có thể tùy ý bao gồm dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm hoặc dược phẩm bao gồm ít nhất một kháng thể TNF hoặc một phần đặc hiệu hoặc biến thể cho tế bào, mô, cơ quan, động vật hoặc bệnh nhân cần điều biến, điều trị hoặc trị liệu bệnh.

Việc sử dụng để điều trị bệnh khác của các kháng thể trung hòa CD27

Ngoài các tình trạng bệnh và bệnh được mô tả trên đây, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều biến hoặc điều trị các tình trạng bệnh xơ hóa của các bệnh nguyên học khác nhau bằng cách điều biến đáp ứng miễn dịch liên quan đến hoặc các tế bào phụ thuộc hoặc các quá trình tế bào liên quan đến CD27 trong, ví dụ: bệnh xơ hóa gan (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh xơ gan kích thích do rượu, bệnh xơ gan kích thích do virus, bệnh viêm gan kích thích do tự miễn); bệnh xơ hóa phổi (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh cứng da, bệnh xơ hóa phổi tự phát); bệnh xơ hóa thận (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh cứng da, bệnh thận đái tháo đường, bệnh viêm cầu thận, bệnh viêm thận luput); bệnh xơ hóa da (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh cứng da, chứng sẹo phì đại và sẹo lồi, vết bỏng); bệnh xơ tủy xương; bệnh u xơ thần kinh; u xơ; bệnh xơ hóa ruột; và các bệnh kết dính xơ hóa do quá trình phẫu thuật.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều biến hoặc điều trị hoặc làm thuyên giảm các triệu chứng của bệnh lây nhiễm trong tế bào, mô, cơ quan, động vật hoặc bệnh nhân, bằng cách điều biến đáp ứng miễn dịch liên quan đến hoặc các tế bào phụ thuộc hoặc các quá trình tế bào liên quan đến CD27 trong, ví dụ: bệnh nhiễm vi khuẩn cấp tính hoặc mạn tính, các quá trình ký sinh hoặc lây nhiễm cấp tính và mạn tính, bao gồm các lây nhiễm vi khuẩn, virus và nấm mốc, lây nhiễm HIV /bệnh thần

kinh do HIV, bệnh viêm màng não, bệnh viêm gan (A,B hoặc C, hoặc tương tự), bệnh viêm khớp nhiễm trùng, bệnh viêm phúc mạc, bệnh viêm phổi, bệnh viêm tiểu thiet, E. coli, hội chứng ure huyết tan máu, bệnh sốt rét, bệnh sốt xuất huyết, bệnh leishmania, bệnh phong, hội chứng sốc độc, bệnh viêm cơ liên khuẩn cầu, bệnh hoại tử sinh hơi, bệnh lao do vi khuẩn mycobacterium, bệnh lây nhiễm do phức hợp mycobacterium, bệnh viêm phổi do nhiễm trùng bào tử, bệnh viêm vùng chậu, bệnh viêm tinh hoàn hoặc viêm mào tinh hoàn, bệnh viêm phổi do legionella, bệnh lyme, bệnh cúm a, virus Epstein-Barr, hội chứng thực bào tế bào máu liên quan đến sự sống, bệnh viêm não/viêm màng não vô trùng sống, và bệnh tương tự.

Các dấu hiệu khác theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng trong phần mô tả các phương án lấy làm ví dụ sau mà được đưa ra nhằm để minh họa sáng chế và không nhằm để giới hạn phạm vi của sáng chế.

4. Dược phẩm

Sáng chế đề xuất các chế phẩm ổn định chứa kháng thể trung hòa CD27, mà tốt hơn là muối đệm phosphat trong nước hoặc dung dịch muối được trộn, cũng như các dung dịch và chế phẩm được bảo quản, cũng như các chế phẩm được bảo quản dùng cho nhiều mục đích thích hợp để sử dụng trong ngành dược hoặc thú y, bao gồm ít nhất một kháng thể trung hòa CD27 trong dược phẩm. Các chất dẫn thích hợp và chế phẩm của chúng, bao gồm các protein của người khác, ví dụ, albumin huyết thanh người, được mô tả, ví dụ, trong, ví dụ, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5.

Để tạo ra dược phẩm thích hợp để dùng hữu hiệu, các chế phẩm này sẽ chứa lượng hữu hiệu của các hợp chất được mô tả trên đây cùng với lượng thích hợp của chất dẫn mang. Các phương pháp dược lý bổ sung có thể được sử dụng để kiểm soát khoảng thời gian hoạt động. Các chế phẩm giải phóng có kiểm soát có thể thu được bằng cách sử dụng các polyme để tạo phức hợp hoặc hấp thụ các hợp chất. Một phương pháp có thể khác để kiểm soát khoảng thời gian hoạt động bằng các chế phẩm giải phóng có kiểm soát là để kết hợp các hợp chất theo sáng chế vào trong các

hạt bao gồm các vật liệu polyme như polyeste, axit polyamino, hydrogel, poly(axit lactic) hoặc etylen vinylaxetat copolyme. Theo cách khác, thay vì kết hợp các chất này vào các hạt polyme, có thể bẫy các vật liệu này trong các vi nang được điều chế, ví dụ, polyme hóa mặt phân cách, ví dụ, lần lượt là hydroxymetylxenluloza hoặc gelatin-vi nang và poly(metylmetylat)-vi nang, hoặc trong các hệ phân phối được chất dạng keo, ví dụ, liposome, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano, và nang nano hoặc trong thể nhũ tương lớn. Các kỹ thuật được bộc lộ trong Remington trên đây (2006).

5. Sử dụng kháng thể trung hòa CD27

Ít nhất một kháng thể trung hòa CD27 trong các chế phẩm hoặc các dung dịch ổn định hoặc được bảo quản được mô tả ở đây, có thể được sử dụng cho bệnh nhân theo sáng chế thông qua các phương pháp phân phối khác nhau bao gồm trong tĩnh mạch (I.V.), trong cơ (I.M.); dưới da (S.C.); qua da, trong phổi, qua niêm mạc, bằng cách sử dụng chế phẩm qua cấy ghép, bơm thẩm thấu, hộp chứa, bơm siêu nhỏ, hoặc các phương tiện khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, cũng như là được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong một phương pháp dùng kháng thể trung hòa CD27, dược chất được đưa vào trong tĩnh mạch từ ống thông được lắp đặt trước đó được trang bị túi truyền. Kháng thể trung hòa CD27 được cấp trong các lọ dùng một lần dung tích 20ml, như các lọ được cung cấp bởi ImmunoGen, Inc. (Cambridge, MA). Mỗi lọ chứa protein với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 2,0mg/ml trong dung dịch đệm (pH 6,5 ± 0,5) bao gồm chủ yếu là kali phosphat monobazơ (0,57mg/ml), natri phosphat monohydrat monobazơ (0,20mg/ml), natri phosphat hai bazơ (0,555mg/ml), và natri clorua (8,16mg/ml) trong nước tinh khiết, USP. Dược chất được lọc sơ bộ hai lần sau đó truyền thể tích liều vào túi truyền bằng cách cho đi qua bộ lọc 5-μ liên kết protein thấp và cho bệnh nhân dùng thông qua bộ lọc dây chuyền 0,22μm trong 8 giờ điều chế. Sau khi truyền, dòng i.v. nên được rửa bằng chất lỏng để đảm bảo sự phân phối của liều được chất đầy đủ.

Nói chung, nếu dùng liều nội hấp của kháng thể, được mong muốn là cấp cho

người nhận liều kháng thể mà nằm trong khoảng từ 1ng/kg-100ng/kg, 100ng/kg-500ng/kg, 500ng/kg-1 ug/kg, 1 ug/kg-100 ug/kg, 100 ug/kg-500 ug/kg, 500 ug/kg-1 mg/kg, 1 mg/kg-50 mg/kg, 50mg/kg-100mg/kg, 100mg/kg-500mg/kg (trọng lượng cơ thể người nhận), mặc dù liều thấp hơn hoặc cao hơn có thể được dùng. Liều thấp như là 1,0mg/kg có thể được mong đợi để thể hiện một số tính hiệu quả. Tốt hơn là, khoảng 5mg/kg là liều chấp nhận được, mặc dù liều nâng lên đến khoảng 50mg/kg cũng được ưu tiên đặc biệt là để sử dụng điều trị bệnh. Theo một cách khác, việc dùng lượng đặc hiệu của kháng thể có thể được đưa ra mà không dựa trên trọng lượng của bệnh nhân như lượng nằm trong khoảng từ 1ug – 100ug, 1mg – 100 mg, hoặc 1gm – 100gm. Ví dụ, việc dùng đặc hiệu theo vị trí có thể vào ngăn hoặc khoang của cơ thể như trong cơ, trong phế quản, trong bụng, trong khớp, trong sụn, trong khoang, trong khoang bụng, trong tiểu não, trong não thất, trong kết tràng, trong cổ tử cung, trong dạ dày, trong gan, trong cơ tim, trong xương, trong xương chậu, trong ngoài màng tim, trong màng bụng, trong màng phổi, trong tuyến tiền liệt, trong phổi, trong trực tràng, trong thận, trong võng mạc, trong cột sống, trong hoạt dịch, trong ngực, trong tử cung, trong bàng quang, trong thương tổn, âm đạo, trực tràng, miệng, dưới lưỡi, trong mũi, hoặc qua da.

Việc điều trị có thể được đưa ra trong liệu trình liều duy nhất, hoặc tốt hơn là liệu trình đa liều mà trong đó quá trình điều trị căn bản có thể là 1-10 liều riêng biệt, sau đó là các liều khác được đưa ra với các khoảng thời gian tiếp theo đòi hỏi để duy trì và hoặc củng cố đáp ứng, ví dụ, từ 1-4 tháng cho liều thứ hai, và nếu cần thiết, (các) liều tiếp theo sau một vài tháng. Các ví dụ về các liệu trình điều trị thích hợp bao gồm: (i) 0, 1 tháng và 6 tháng, (ii) 0, 7 ngày và 1 tháng, (iii) 0 và 1 tháng, (iv) 0 và 6 tháng, hoặc các liệu trình khác đủ để gây ra các đáp ứng mong đợi để làm giảm các triệu chứng của bệnh, hoặc làm giảm mức độ trầm trọng của bệnh.

6. Các vật dụng sản xuất bao gồm kháng thể trung hòa CD27

Sáng chế bao gồm vật dụng sản xuất chứa các vật liệu hữu dụng để điều trị các rối loạn được mô tả trên đây bao gồm kháng thể trung hòa CD27, đồ chứa và nhãn dán hoặc bao gói đi kèm hoặc liên quan đến đồ chứa. Vật dụng sản xuất này tốt hơn là chứa ít nhất một lọ bao gồm dung dịch của ít nhất một kháng thể trung hòa

CD27 với các chất đệm và/hoặc chất bảo quản được kê, tùy ý trong chất pha loãng trong nước, trong đó vật liệu bao gói này bao gồm nhãn dán mà chỉ ra rằng dung dịch như vậy có thể được giữ trong một khoảng thời gian. Sáng chế có thể bao gồm vật dụng sản xuất, bao gồm vật liệu bao gói, lọ thứ nhất bao gồm kháng thể trung hòa CD27 được đông khô, và lọ thứ hai bao gồm chất pha loãng trong nước của chất đệm và/hoặc chất bảo quản được kê, trong đó vật liệu bao gói này bao gồm nhãn dán mà chỉ dẫn cho bác sĩ hoặc bệnh nhân cách thức hoàn nguyên kháng thể trung hòa CD27 trong chất pha loãng trong nước để tạo ra dung dịch.

Các đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, ống tiêm, v.v.. Đồ chứa có thể được tạo ra từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc nhựa. Bình chứa này có thể có cổng vào vô trùng (ví dụ, đồ chứa có thể là túi dung dịch dùng trong tĩnh mạch hoặc lọ có nắp, tùy ý, có khả năng được đâm xuyên qua bằng mũi kim tiêm dưới da).

Ít nhất một chất hoạt tính trong chế phẩm là kháng thể trung hòa CD27. Nhãn dán hoặc bao gói đi kèm chỉ ra rằng chế phẩm này được sử dụng để điều trị theo chỉ dẫn lựa chọn, như SLE. Bao gói đi kèm ở đây có thể chỉ ra rằng kháng thể hoặc chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh mà không đáp ứng, hoặc đáp ứng yếu, để điều trị với tiêu chuẩn chăm sóc như nêu ở đây cho các bệnh và chẩn đoán cụ thể. Theo các phương án khác, bao gói này có thể chỉ ra rằng kháng thể, kháng thể-liên hợp hoặc chế phẩm cũng có thể được sử dụng để điều trị bệnh được mô tả bằng nhu cầu điều biến đáp ứng miễn dịch của các quá trình tế bào liên quan đến CD27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kit để phát hiện CD27 trong mẫu sinh học. Kit này bao gồm đồ chứa chứa một hoặc nhiều kháng thể mà liên kết epitop của CD27 và các chỉ dẫn để sử dụng kháng thể nhằm mục đích liên kết với CD27 để tạo ra phức hợp miễn dịch và phát hiện sự tạo ra của phức hợp miễn dịch sao cho sự không có mặt hoặc có mặt của phức hợp miễn dịch tương quan với sự có mặt hoặc không có mặt CD27 trong mẫu. Các ví dụ về đồ chứa bao gồm các đĩa nhiều lỗ mà cho phép phát hiện CD27 đồng thời trong nhiều mẫu.

Trong khi đã mô tả sáng chế bằng các thuật ngữ nói chung, các phương án theo sáng chế còn được bộc lộ trong các ví dụ sau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: chất phản ứng CD27 và phương pháp

Để tạo ra và thử nghiệm các kháng thể đơn dòng liên kết với CD27, các cấu trúc protein được tạo ra mà thể hiện độ dài đầy đủ của CD70 của người và CD27 của người và miền ngoại bào (ECD) của CD27 của người.

CD27 của người (SEQ ID NO: 149) là protein xuyên màng typ 1 bao gồm miền peptit tín hiệu (các gốc từ 1 đến 20), miền ngoại bào (ECD, các gốc từ 21 đến 191), miền xuyên màng (TM, các gốc từ 191 đến 212) và miền nội bào (ICD, các gốc từ 213 đến 260). CD70 của người (SEQ ID NO: 2) là polypeptit xuyên màng typ 2 gồm 193 axit amin theo độ dài bao gồm, từ đầu N, miền nội bào (intracellular domain-ICD, các gốc từ 1 đến 17), miền xuyên màng (transmembrane-TM, các gốc từ 18 đến 38) và miền ngoại bào (extracellular domain-ECD, các gốc từ 39 đến 193). Trình tự mã hóa CD70 hoàn chỉnh được biểu hiện dòng vô tính trên bề mặt của các tế bào HEK 293.

Đối với các thử nghiệm liên kết trực tiếp dựa trên Proteon và mAb ELISA, các axit amin 1-121 của ECD CD27 được biểu hiện tạm thời trong các tế bào HEK293 với peptit nhãn His6 đầu C và được tinh sạch bằng sắc ký ion kim loại. Đối với việc sàng lọc thực khuẩn thể và các thử nghiệm ELISA, các axit amin 1-173 của ECD với nhãn His6 đầu C được biểu hiện HEK và tinh sạch bằng sắc ký ion kim loại sau đó là bằng sắc ký loại trừ kích cỡ trên Superdex 75. Cả hai protein CD27 này được biotinyl hóa bằng cách sử dụng các gốc amin tạo đích hóa học NHS-este trên protein. Đối với việc kết tinh hóa, các axit amin 1-101 với nhãn His6 đầu C được biểu hiện trong hệ baculovirus và được tinh sạch bằng sắc ký ion kim loại của Protease, Inc. Đối với việc gây miễn dịch cho chuột, protein CD27-Fc được mua của R&D systems. Đối với một số nghiên cứu, trình tự mã hóa CD27 hoàn chỉnh được biểu hiện dòng vô tính trên bề mặt của các tế bào HEK 293.

Các dòng vô tính cADN của CD27 của người và CD70 của người được mua của Open Biosystems. Các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn được sử dụng để tạo ra các cấu trúc biểu hiện. Tóm lại, khung đọc mở của các gen CD27 và CD70 được

khuếch đại bằng PCR và tách dòng vô tính trong vector biểu hiện của động vật có vú thông qua sự phân cắt và gắn endonucleaza giới hạn, hoặc thông qua tách dòng vô tính độc lập ligaza (ligase independent cloning-LIC). Gen CD27 và CD70 có độ dài đầy đủ được tách dòng vô tính trong vector biểu hiện và được biểu hiện dòng vô tính trên bề mặt của các tế bào của động vật có vú. Miền ngoại bào của CD27 được tách dòng vô tính trong vector biểu hiện của động vật có vú và được biểu hiện tạm thời trong các tế bào HEK293 với đuôi sáu his.

Ví dụ 2: Tạo ra kháng thể trung hòa CD27

Các kháng thể kháng CD27 của người ở chuột được tạo ra bằng phương pháp lai của Kohler và Milstein (1975). Mười con chuột 12-14 tuần tuổi C3H/HeJ thu được từ Charles River Laboratories. Gây miễn dịch các con chuột này dưới da (SQ) ở gốc đuôi (BOT) với 50 microgm Hu CD27 Fc (R&D Systems) kết hợp với $0,33 \times 10^5$ đơn vị mỗi interferon-alpha và -beta của chuột (Biosource) với thể tích cuối cùng là 100 microL trong ngày 1. Trong ngày 2 và 3, các con chuột này được tiêm SQ BOT với các interferon (liều giống như trong ngày 1). Các con chuột này được dùng liều cao với 50 microgm Hu CD27-Fc kết hợp với 50 microgm chất chủ vận Mab kháng CD40 của chuột (R&D Systems, MAB440) được cho SQ BOT trong PBS trong ngày 14; bốn ngày trước khi thu gom lá lách để dung hợp.

Để đánh giá độ chuẩn, tiến hành pha bắt EIA. Tóm lại, các đĩa (Nunc-Maxisorp) được phủ bằng 0,1 microgram kháng ms Fc của dê (Jackson Immunotech) trong chất đệm bicarbonat qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau bước phong bế và rửa, bổ sung các phân pha loãng của huyết thanh và ủ các đĩa này trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau bước rửa, ủ các đĩa này trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng với 0,25 microgm/mL Hu CD27-ECD được biotinyl hóa trong chất đệm phong bế và dò bằng Streptavidin được dán nhãn HRP (Jackson Immunotech) pha loãng theo tỉ lệ 1:40.000 trong BSA/PBS 0,4% trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa này như được mô tả trên đây; sau đó bổ sung dung dịch cơ chất OPD (các bảng nhanh Sigma), ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, việc hiện cơ chất màu được dừng bằng cách bổ sung axit sulfuric 4N ở 25 microL/lỗ, và đo sự hấp thụ ở 490nm.

Ngân hàng tế bào của chất dung hợp đi kèm u tủy của chuột không tiết BALB/c, FO mua được của ATCC (# CRL-1646). Một lọ đông băng chứa các tế bào FO được làm tan băng và tái tạo huyền phù trong DMEM bằng môi trường GlutamaxTM (được biến đổi) (Invitrogen) được bổ sung bằng FBS (10% (thể tích/thể tích) Hyclone). Làm giãn nở các tế bào, bảo quản lạnh và gần như vô trùng và không có vi khuẩn mycoplasma bằng Thư viện Charles River (Charles River Laboratories). Dòng tế bào C1833A (Centocor) cũng được sử dụng trong quá trình dung hợp này. Dòng tế bào này thu được nội tuyến bằng cách làm giảm sự biểu hiện của gen CHOP trong dòng tế bào FO vì vậy nó đòi hỏi sự sinh trưởng trong sự chọn lọc với genetixin. Xử lý các tế bào như là FO nêu trên ngoại trừ việc sinh trưởng trong DMEM với môi trường GlutamaxTM (được biến đổi) được bổ sung với FBS 10% (thể tích/thể tích) (Hyclone) và 500ug/mL genetixin (Gibco). Cả dòng tế bào FO và C1833A được đưa vào đồng bộ hóa tế bào trước khi dung hợp. Tóm lại, cấy 1,5-2 x10⁸ tế bào vào 180mL DMEM với môi trường GlutamaxTM (được biến đổi) được bổ sung với FBS 0,25% (thể tích/thể tích) (Hyclone) và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 13 giờ. Bổ sung 20mL FBS bổ sung đối với nồng độ cuối cùng FBS là 10% và ủ thêm trong 13 giờ ở nhiệt độ 37°C trước khi sử dụng. Các tế bào C1833A là ổn định trong điều kiện chọn lọc genetixin xuyên suốt quá trình đồng bộ hóa tế bào. Rửa các tế bào u tủy trong PBS, đếm, và xác định khả năng sống được (>78%) thông qua phần mềm Guava Viacount trước khi dung hợp.

Trong ngày dung hợp, làm chết các động vật bằng cách làm ngạt bằng CO₂. Loại bỏ lá lách theo cách vô trùng và nhúng trong 10mL muối được đệm phosphat lạnh (phosphat-buffered saline-PBS) chứa các kháng sinh (PSA) (Sigma).

Điều chế huyền phù tế bào lá lách đơn và đưa vào phân tích RBC bằng cách sử dụng chất đệm phân tích RBC (Sigma). Dán nhãn các tế bào được rửa để phân loại từ tính theo mỗi chỉ dẫn của nhà sản xuất, bằng cách sử dụng các hạt từ tính kháng Thy1.2 của chuột, kháng CD11b của chuột/người và kháng IgM của chuột (Miltenyi Biotec # lần lượt là 130-049-101, 130-149-601 và 130-047-301) và sau đó phân loại bằng cách sử dụng dụng cụ AutoMacs Pro bằng cách chạy chương trình làm tan máu. Gom cả phân đoạn tế bào không được dán nhãn (tế bào nguyên tương

bào B được làm giàu) và phân đoạn tế bào được dán nhãn, sau đó đếm thông qua Guava PCA. Loại bỏ các tế bào được dán nhãn dương. Chia đôi các tế bào không được dán nhãn để dung hợp với chất dung hợp đi kèm FO và C1833A. Tiến hành dung hợp với tỉ lệ 1:1 của các tế bào u tủy của chuột với các tế bào lá lách sống được theo phương pháp của De St. Groth (J Immunological Methods. 35:1-21. 1980). Tóm lại, trộn các tế bào lá lách và u tủy với nhau, tạo viên và rửa một lần trong 50mL PBS. Tái tạo huyền phù các viên này bằng 1mL dung dịch polyetylen glycol (PEG) (2g PEG trọng lượng phân tử 4000, 2mL DMEM, và 0,4mL DMSO) ở nhiệt độ 37°C trong 30 giây. Sau đó, nhúng hỗn hợp tế bào/dung hợp trong bể nước 37°C trong khoảng 60 giây có khuấy nhẹ. Dùng phản ứng dung hợp bằng cách bổ sung từ từ DMEM 37°C trong 1 phút. Cho phép các tế bào đã được dung hợp nghỉ hoặc 5 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó ly tâm ở 150 x g trong 5 phút. Sau đó, tái tạo huyền phù các tế bào trong môi trường HAT [DMEM với GlutamaxTM (được biến đổi), được bổ sung với FBS 20%, Origen 5%, 25 microg/mL gentamixin (Sigma) và HAT (100 microM hypoxantin, 0,4 microM aminopterin, và 16 microM tymidin (Sigma), và cấy trong các đĩa nuôi cấy mô polystyren đáy bằng có 96 lỗ (Corning # 3997) hoặc môi trường metyloxenuloza (StemCell Technologies, MediumD cat# 03804) chứa ~2,25µg/mL CD27 của người AF488 (Janssen Research & Development, LLC). Ủ các đĩa này trong thiết bị ủ được tạo ẩm 37°C với CO₂ 7% trong 7-10 ngày. Các khuẩn lạc đơn được chọn từ các đĩa metyloxenuloza để sàng lọc bằng cách sử dụng ClonepixFL hoặc dưới kính hiển vi ánh sáng màu trắng.

Ví dụ 3: Hoạt tính sinh học của Mab tái tổ hợp

Khả năng của các miền liên kết từ các kháng thể chuột để liên kết với CD27 và để phong bế một số hoạt tính sinh học của CD27 được phân tích bằng cách sử dụng các thử nghiệm in vitro khác nhau như được mô tả dưới đây.

Sử dụng pha rắn EIA để sàng lọc phân dịch nổi tế bào lai đối với các kháng thể có khả năng liên kết với CD27 của người. Phủ các đĩa (Nunc-Maxisorp #446612) qua đêm với 4µg/mL Fab của dê kháng huFc (Fab goat anti-huFc) (Jackson #109-006-098) trong chất đệm Bicarbonat O/N ở 4°C. Không rửa, phong bế các lỗ bằng 200 microL albumin huyết thanh của bò (bovine serum albumin-BSA) 0,4% (trọng

lượng/thể tích) trong PBS trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa bằng muối 0,15M chứa Tween 0,02% (trọng lượng/thể tích), bổ sung 20, 50 microl huCD27-Fc trong BSA/PBS 0,4% vào các đĩa trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa lại, ủ 50 microl phân dịch nổi tế bào lai không được hòa tan trên các đĩa được phủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa này ba lần và sau đó ủ bằng 50 microL kháng thể của dê kháng Fc của chuột HRP (goat anti-murine Fc HRP) (Jackson # 115-036-071) được pha loãng theo tỉ lệ 1:10.000 trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Rửa lại các đĩa này và hiện màu như được mô tả ở trên để đánh giá độ chuẩn. Để đánh giá khả năng liên kết tương đối của thử nghiệm tương tự Mab tế bào lai được tiến hành bằng cách sử dụng các đĩa Maxisorp có 384 lỗ (NUNC 464718) với phân dịch nổi tế bào lai được pha loãng theo bậc (chuẩn hóa đến nồng độ bắt đầu là 5 microg/mL. Thử nghiệm này nhận diện 386 tế bào lai dương tính.

Sàng lọc tất cả 386 tế bào lai đặc hiệu CD27 về khả năng ức chế liên kết của huCD27 với huCD70 bằng cách sử dụng các thử nghiệm liên kết sinh hóa với các tế bào IM-9, dòng tế bào B-lymphoblastoit được phát hiện biểu hiện nội sinh CD70 của người. Phủ các đĩa Maxisorp (VWR # 62409-314) bằng CD27/Fc tái tổ hợp của người (R&D Systems, Cat# 382-CD) ở 250 nanogram (ng)/mL và ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Ngày tiếp theo, phong bế các đĩa bằng chất đệm phong bế (Pierce, Cat#37543) và sau đó rửa bằng chất đệm rửa I, mà chứa PBS không có Ca⁺⁺ hoặc Mg⁺⁺, Tween-20 0,01%. Đối chứng (MAB chuột với hCD27, R&D Systems, Cat# MAB382; đối chứng isotyp IgG1 của chuột, R&D Systems, Cat# MAB002; đối chứng isotyp IgG2a của chuột, R&D Systems, Cat# MAB003) được bao gồm trên mỗi đĩa. Trộn 50uL/lỗ mẫu tế bào lai hoặc đối chứng với 50µL/lỗ tế bào IM-9 được thu gom, dòng tế bào B-lymphoblastoit của người (ATCC, CCL-159) và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng mà không lắc. Kết thúc việc ủ, rửa các đĩa bằng chất đệm rửa II, để loại bỏ tất cả các tế bào không được liên kết, và sau đó ly giải với 50uL/lỗ chất phản ứng Cell Titer Glo (Promega, Cat# G7571). Sau 10 phút ủ và lắc, đọc các đĩa trên Envision (PerkinElmer, 2102 Multilabel reader). Tín hiệu phát quang được tạo ra tỷ lệ với lượng ATP có mặt và trực tiếp tương quan với số lượng các tế bào sống có mặt trong lỗ được bắt bằng cách liên kết với CD27. Dựa trên các kết quả của

thử nghiệm liên kết sinh hóa, khoảng 50% các dòng vô tính đặc hiệu CD27 được làm trung hòa.

Để loại bỏ lượng dư trong số các dòng vô tính trung hòa, tiến hành các thử nghiệm liên kết cạnh tranh để gom các kháng thể vào các nhóm cạnh tranh. Trong thử nghiệm này, đánh giá riêng rẽ phần dịch nổi tế bào lai làm chất phản ứng bắt và chất phản ứng dò tìm với mỗi tế bào lai dương tính trong bảng. Các kháng thể tạo ra các chất phản ứng bắt/dò tìm hữu hiệu với nhau có thể nhận biết các epitop được tách ra từng phần trên protein CD27, do đó cho phép cả hai kháng thể liên kết với protein đích đồng thời. Các nhóm dòng vô tính thể hiện các kiểu hoạt tính tương tự qua toàn bộ bảng có thể liên kết với các epitop tương tự. Do đó, việc chọn các dòng vô tính từ các nhóm khác nhau tạo ra các kháng thể nhận biết các epitop khác nhau. Tóm lại, phủ các đĩa Nunc Maxisorp 384 lỗ (464718) bằng kháng thể của dê kháng Fc của chuột (JIR115-005-071) trong chất đệm phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, phong bế các đĩa bằng BSA 0,4% trong PBS trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Ở bước này và tất cả các bước tiếp theo, rửa các đĩa bằng PBS, Tween-20 0,02%. Mỗi lỗ của một hàng (một hàng cho mỗi phần dịch nổi) nhận 20uL phần dịch nổi (sử dụng phần dịch nổi nguyên chất để sàng lọc ban đầu nhưng để sàng lọc lại các dòng vô tính phụ, chuẩn hóa các dòng vô tính mức cao đến 2ug/ml mAb) cùng với các đối chứng (kháng thể của chuột kháng huCD27, R&D Systems, Cat# MAB382; đối chứng isotyp của chuột Cat#555439, Becton-Dickenson) sau đó ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa, 25uL nhãn Hu CD27-ECD-His không được dán nhãn được điều chế trong PBS cộng 10% huyết thanh của chuột (Bioreclamation mouse serum CD-1 lot#MSEBREC.18565) ở 0,3 (hoặc 0,8 đối với nồng độ được chuẩn hóa) microg/ml được bổ sung vào tất cả các lỗ, sau đó là 30 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng sau đó rửa. Bổ sung từng phần dịch nổi xuống cột đơn và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng với 25uL hỗn hợp được điều chế như sau: (các phần dịch nổi trước ủ với kháng thể của dê kháng Fc của chuột HRP (goat anti mouse Fc HRP) (Jackson 115-036-008), bằng cách trộn 150uL với tỉ lệ 1:1000 kháng thể của dê kháng Fc của chuột HRP với từng 1000uL phần dịch nổi (để sàng lọc cơ bản) hoặc 90uL với tỉ lệ 1:2000 cho mỗi 600uL phần dịch nổi được điều chỉnh đến

2ug/mL: (để sàng lọc lại các dòng vô tính phụ). Sau 30 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, bổ sung 200 microL huyết thanh chuột bình thường 100% cho mỗi mL và ủ thêm 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa sau đó ủ trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng với 100uL/lỗ dung dịch cơ chất xitrat-phosphat (axit xitric 0,1M và natri phosphat 0,2 M, H₂O₂ 0,01%, và 1mg/ml OPD). Dùng hiện màu cơ chất bằng cách bổ sung 25uL axit sulfuric 4N và đo sự hấp thụ ở 490nm bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa tự động. Thử nghiệm gom (binning assay) này nhận diện ba nhóm mà nhận biết các vị trí liên kết không chồng nhau trên kháng nguyên huCD27. Gia tăng các kháng thể được chọn từ tất cả ba nhóm để sản sinh, tinh sạch kháng thể và còn thử nghiệm trong các thử nghiệm chức năng.

Ức chế tạo tín hiệu tế bào

Sự liên kết của CD70 với CD27 cảm ứng việc tạo tín hiệu mà dẫn đến sự hoạt hóa sau đó của nhân tố phiên mã, NF-k β . Thử nghiệm gen thông báo NF-k β được thiết lập để mô tả thêm về kháng thể. Thử nghiệm này được tiến hành theo hai hình thức: (1) để đánh giá chất đối kháng kháng thể bằng sự trung hòa của việc hoạt hóa CD27 được cảm ứng bởi CD70 và (2) để đánh giá chất chủ vận kháng thể bằng sự hoạt hóa của việc tạo tín hiệu CD27 khi không gắn CD70. Chuyển nhiễm các tế bào HEK-293F với tổng cộng 36ng ADN chứa cả CD27 của người và cấu trúc luxiferaza, dưới sự kiểm soát của gen thúc đẩy NF-k β . Tế bào chuyển nhiễm HEK-293F được đưa vào đĩa với 5×10^4 tế bào cho mỗi lỗ trong 40uL môi trường Freestyle (Gibco) trong các đĩa 96 lỗ. Bổ sung các phần pha loãng của mAb của tế bào lai trung hòa CD27 vào đĩa thử nghiệm trong môi trường Freestyle (Gibco) với nồng độ cuối là 50ug/mL với tỉ lệ pha loãng 1:3 và ủ các đĩa ở nhiệt độ 37°C (95% O₂/5% CO₂) trong một giờ. Để thử nghiệm khả năng của mAb của các tế bào lai để trung hòa việc tạo tín hiệu CD70:CD27, bổ sung các tế bào episom HEK-293E CD70 đã được bức xạ (4000 rad) ở 20% số lượng các tế bào chuyển nhiễm CD27 vào đĩa thử nghiệm. Để thử nghiệm hoạt tính chất chủ vận của mAb của các tế bào lai, bỏ qua việc bổ sung các tế bào episom CD70. Ủ các đĩa thử nghiệm qua đêm ở nhiệt độ 37°C (95% O₂/5% CO₂) và hiện màu bằng cách sử dụng hệ thử nghiệm Steady-Glo® Luxiferaza (Promega) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Bốn mAb của tế bào lai trung

hòa CD27, C2177, C2186, C2191, và C2192, mà việc tạo tín hiệu CD27 qua trung gian CD70 được phong bế phụ thuộc liều mà không gây ra sự hoạt hóa chủ vận phụ thuộc vào liều đáng kể của thụ thể CD27 khi không có CD70 kích thích được chọn để mô tả thêm. Các IC₅₀ để phong bế tế bào IM-9 liên kết với CD27 và tạo tín hiệu qua trung gian CD70 trong thử nghiệm gen thông báo NF- κ B được tóm tắt đối với bốn kháng thể này trong Bảng 1. Hoạt tính chủ vận trong thử nghiệm gen thông báo NF- κ B được thể hiện là tăng gấp nhiều lần trong việc tạo tín hiệu CD27 so với kháng thể đối chứng isotyp không tương ứng (IgG1 của chuột với protein EMP của chuột nhắt) khi không có CD70 kích thích ở nồng độ thử nghiệm lớn nhất của kháng thể.

Ái lực đối với CD27

Đo K_D của các kháng thể C2177, C2186, C2191, và C2192 đối với CD27 hòa tan được monome ở nhiệt độ 25°C bằng Biacore và được thông báo trong Bảng 1. Tiến hành các thử nghiệm trên thiết bị cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) BIACORE 3000 (BIAcore, Inc.). Điều chế các mẫu trong muối đệm phosphat Dulbecco có độ pH = 7,4 chứa chất hoạt tính bề mặt 0,005% (polysorbat 20). Kháng thể đặc hiệu của dê kháng Fc của chuột (Jackson ImmunoResearch laboratories Prod # 115-005-071) được liên kết đồng hóa trị với các bề mặt vàng được phủ carboxymethyl dextran (CM-5 Chip, Biacore). Trước khi cố định, xử lý sơ bộ mạch với 50mM NaOH, 100mM HCl và natri dodecyl sulfat 0,1% có tiêm nước được khử ion hóa ở giữa các xử lý sơ bộ. Pha loãng các kháng thể với 10mM chất đệm natri axetat có độ pH = 4,5 và được kết hợp với bề mặt dextran được carboxymethyl hóa của mạch sử dụng các chỉ dẫn của nhà sản xuất về hóa học kết hợp amin. Khử hoạt tính các nhóm phản ứng còn lại trên bề mặt này bằng cách sử dụng etanolamin-HCl. Bất mAb trên bề mặt cảm biến thông qua miền Fc. Sự kết hợp ECD CD27 của người được tiêm ở các nồng độ tăng dần (0,6-150nM, loạt phần pha loãng gấp 4 lần) được giám sát trong ba phút và sự phân ly trong mười phút. Tối ưu hóa sự tái tạo của các bề mặt bắt với đường cơ sở bằng cách sử dụng xung 3 giây của 100mM axit phosphoric. Xử lý dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm Scrubber, phiên bản 1.1g (BioLogic Software). Sự loại trừ tham chiếu kép dữ liệu được tiến hành để điều chỉnh sự đóng góp của chất đệm vào tín hiệu và nhiễu thiết bị. Tiến hành phân tích

động học của dữ liệu được xử lý bằng cách sử dụng phần mềm Biaevaluation 4.0.1 (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden). Profin liên kết được mô tả bằng mô hình liên kết 1:1 chỉ ra liên kết hóa trị một của CD27.

Bảng 1

IM-9					
Biacore		liên kết ¹		gen thông báo NF-κβ	
		K _D		IC ₅₀ ²	
mAb	isotyp	nM	ug/ml	ug/ml	Chất chủ vận ³ ở 50ug/ml
C2177	mIgG1	3,07	0,063	0,040	1,850
C2186	mIgG1	2,55	0,059	0,105	2,547
C2191	mIgG1	2,62	0,059	0,080	3,053
C2192	mIgG2a	0,21	0,054	0,232	5,394

¹ IC₅₀ đối với sự ức chế mAb của các tế bào IM-9 liên kết với CD27 cố định

² IC₅₀ đối với sự ức chế mAb trong thử nghiệm gen thông báo

³ Hoạt tính chủ vận của mAb ở 50ug/ml khi không có mặt CD70, được đo là tăng gấp nhiều lần trong tín hiệu gen thông báo so với các kháng thể đối chứng isotyp.

Ức chế sự tăng sinh tế bào

Sự tăng sinh của các tế bào T được hoạt hóa gần tối ưu trong canh trường với các kháng thể kháng CD3 cộng kháng CD28 được tăng cường bằng cách gắn CD70 của CD27 được biểu hiện trên các tế bào T. Đánh giá bốn tế bào trung hòa của chuột về khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào T của chúng khi có mặt của CD70 và cảm ứng sự tăng sinh khi không có mặt CD70. Các tế bào T CD4⁺ đông lạnh được mua của AllCells, LLC. Làm tan băng các tế bào này và đặt vào môi trường IMDM chứa FBS 10%, l-glutamin 1%, và Penixilin-Streptomycin 1%. Trước khi đặt các tế bào vào đĩa, phủ kháng thể kháng CD3 (OKT3) lên trên đĩa đáy hình chữ U ở 1ug/mL trong PBS qua đêm ở 4°C. Đếm các tế bào, điều chỉnh nồng độ 1x10⁶ tế bào/mL, và được đặt vào đĩa ở 1x10⁵ tế bào/lỗ. Bổ sung kháng thể kháng CD28 hòa tan được làm tín hiệu hoạt hóa thứ cấp ở 1ug/mL cho mỗi lỗ. Chuyển nhiễm các tế bào HEK

đã được bức xạ (6000 rad) với CD70 của người hoặc bổ sung vector riêng rẽ (mô phỏng) vào các lỗ thích hợp ở mức 2×10^4 tế bào/lỗ (20%). Các tế bào được kích thích trong 3 ngày, bổ sung 0,9 uCi tymidin [methyl-3H] vào tất cả các lỗ mẫu và ủ các tế bào trong 18-24 giờ. Trong ngày kích thích thứ tư, thu gom các tế bào lên trên đĩa lọc bằng cách sử dụng thiết bị thu gom PE Filtermate. Để khô đĩa và bổ sung 30uL MicroScintTM-20 vào tất cả các lỗ mẫu. Đọc đĩa trên PE TopCount NXT, và thu dữ liệu làm CPM. Kháng thể C2177 thể hiện sự ức chế phụ thuộc liều của sự tăng sinh tế bào T qua trung gian là CD70 và hoạt tính chủ vận nội tại rất yếu khi không có mặt CD70 (Fig.1). Quan sát các kết quả tương tự đối với các kháng thể C2186, C2191 và C2192. IC₅₀ và % tối đa sự ức chế đối với các kháng thể này được thông báo trong Bảng 2. Không có kháng thể nào thể hiện sự kích thích tăng sinh thích hợp khi không có gắn CD70, chỉ ra sự thiếu hoạt tính chủ vận nội tại.

Ngoài ra, các kháng thể C2177, C2186, C2191 và C2192 thể hiện sự ức chế phụ thuộc liều sự tăng sinh của tế bào T qua trung gian CD70 như được đo trong thử nghiệm CSFE mà không có tác động lên sự tăng sinh khi không có CD70 kích thích. Mua các tế bào T CD3+ đóng băng của AllCells, LLC. Làm tan băng các tế bào và đặt vào môi trường IMDM chứa FBS 10%, L-glutamin 1%, và Penixilin-Streptomycin 1%. Dán nhãn trước các tế bào với 2,5mM CFSE (Invitrogen), ngừng phản ứng bằng FBS và rửa bằng môi trường T tế bào. CFSE là thuốc nhuộm mà khuếch tán thụ động vào các tế bào và phát huỳnh quang cao khi liên kết với các amin nội bào. Khi phân chia tế bào, mỗi tế bào con sẽ chứa một nửa nhãn CFSE của tế bào gốc, do đó sự tăng sinh tế bào có thể được giám sát bằng số lượng vết các tế bào với mật độ CFSE khác nhau. Điều chỉnh các tế bào đến nồng độ 1×10^6 tế bào/mL, và đặt vào đĩa ở mức 1×10^5 tế bào/lỗ. Trước khi đặt các tế bào vào đĩa, phủ kháng thể kháng CD3 (OKT3) lên trên đĩa đáy hình chữ U ở 0,5ug/mL trong PBS qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Bổ sung kháng thể kháng CD28 hòa tan được làm tín hiệu hoạt hóa thứ cấp ở 0,1ug/mL cho mỗi lỗ. Chuyển nhiễm các tế bào HEK đã được bức xạ (6000 rad) với CD70 của người hoặc bổ sung vector riêng rẽ (mô phỏng) vào các lỗ thích hợp ở 2×10^4 tế bào/lỗ (20%). Kích thích các tế bào trong 4 ngày và phân tích bằng phép phân tích FACS để đếm các tế bào được phân chia chứa mức nhãn

CFSE với các mật độ khác nhau.

Ức chế sự biệt hóa nguyên tương bào (plasma blast)

mAb của tế bào lai trung hòa CD27 cũng được thử nghiệm trong thử nghiệm biệt hóa nguyên tương bào với các tế bào B sơ cấp của người. Nuôi cấy các tế bào lympho B CD19⁺ của người mà được chọn âm tính từ máu ngoại biên của thể cho thông thường (thu được từ AllCells) trong 6 ngày khi có mặt 1 μ g/mL kháng thể kháng CD40 (dòng vô tính MAB89, Abcam) và 100ng/mL Interleukin 21 (Invitrogen) hoặc 1 μ g/mL phối tử CD40 tái tổ hợp hòa tan được của người và 2 μ g/mL ‘chất tăng cường dùng cho các phối tử’ (Alexis Biochemicals) và 100ng/ml Interleukin 21 trong các đĩa 96 lỗ với 10⁵ tế bào B cho mỗi lỗ. Bổ sung tế bào lai trung hòa CD27 hoặc các kháng thể đối chứng isotyp khi có mặt hoặc không có mặt 2x10⁴ các tế bào HEK 293 biểu hiện CD27 đã được bức xạ (6000 rad) hoặc các tế bào HEK 293 được chuyển nhiễm giả. Sử dụng mAb của tế bào lai trung hòa CD27 và các đối chứng isotyp ăn khớp ở mức 25, 2,5, và 0,25 μ g/mL. Trong ngày 6, phân tích các mẫu tế bào bằng đếm tế bào theo dòng chảy và các phân đoạn nguyên tương bào được nhận diện là phân tán về phía trước/cao, IgD^{minus}, CD38^{bright}, CD20^{low}. Tác dụng của mAb trung hòa CD27 được tính là tần suất nguyên tương bào trong các canh trường tế bào B chứa các tế bào biểu hiện CD70 và mAb của các tế bào lai được chuẩn hóa đến tần suất nguyên tương bào tương ứng với các canh trường tế bào B chứa các tế bào được chuyển nhiễm giả. Phần trăm ức chế do mAb C2177, C2186, C2191 hoặc C2192 ở mức 2,5 μ g/mL được thể hiện trong Bảng 2. Hoạt tính chủ vận khi không có CD70 kích thích không được quan sát đối với mAb bất kỳ này.

Bảng 2

MAb	sự tăng sinh của tế bào T - tế bào CD4+		Sự biệt hóa nguyên tương bào
	IC ₅₀ ug/ml	% ức chế ở nồng độ cao nhất (30 μ g/ml) (Trung bình $\pm$ SEM)	% ức chế ở 2,5 μ g/ml (Trung bình $\pm$ SEM)
C2177	0,245	75,4 $\pm$ 4,1 (n=6, 2 thể cho)	78 $\pm$ 20 (n = 4)

C2186	0,775	65,3±4,4 (n=6, 2 thể cho)	93 ± 27 (n = 4)
C2191	0,3	58,3±6,0 (n=6, 2 thể cho)	105 ± 9 (n = 4)
C2192	0,445	75,7±5,7 (n=6, 2 thể cho)	74 ± 0 (n = 2)

Ví dụ 4: Lập bản đồ epitop và tạo nhóm

Để đánh giá cẩn thận hơn về sự gom ban đầu (binning assay), tiến hành các thử nghiệm cạnh tranh với một số mAb trung hòa được tinh sạch và kháng thể trung hòa CD27, MAB 382 (R&D Systems). Tóm lại, phủ 5 μ l (10 μ g/mL) protein thể khảm CD27-Fc (R&D Sysytems, Cat# 382-CD) trên đĩa MSD HighBind (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) cho mỗi lỗ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Bổ sung chất đệm MSD Blocker A 5% (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) vào mỗi lỗ và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa ba lần với chất đệm HEPES 0,1M, có độ pH = 7,4, sau đó là bổ sung hỗn hợp của kháng thể CD27 được dán nhãn 10nM với các nồng độ khác nhau của kháng thể cạnh tranh (nằm trong khoảng từ 1nM đến 2 μ M). Dán nhãn các kháng thể với MSD Sulfo-TagTM NHS-este, một este của N-hydroxysuccinimide phản ứng với amin mà liên kết với các nhóm amin sơ cấp của protein để tạo ra liên kết amit ổn định. Sau 2 giờ ủ và lắc nhẹ ở nhiệt độ trong phòng, rửa các đĩa 3 lần với chất đệm HEPES 0,1M (pH = 7,4). Pha loãng chất đệm MSD Read buffer T với nước cất (gấp 4 lần) và phân phối theo thể tích 150 μ L/lỗ. Phân tích các đĩa bằng cách sử dụng thiết bị đọc SECTOR Imager 6000 mà dò tìm miễn dịch điện hóa phát quang qua các nhãn Sulfo-Tag mà phát ra ánh sáng khi kích thích điện hóa được bắt đầu ở bề mặt điện cực của các đĩa siêu nhỏ MSD.

Các nghiên cứu cạnh tranh xác định ba nhóm cạnh tranh đối với các kháng thể được tóm tắt trong Bảng 3, xác nhận các thử nghiệm gom ban đầu. C2179, C2192 và MAB382 tạo thành một nhóm; C2177, C2182, C2186 và C2193 là nhóm thứ hai; và C2191 tạo thành nhóm tách biệt.

Bảng 3.

Chất cạnh tranh	Kháng thể được dán nhãn
-----------------	-------------------------

	C2179	C2177	C2182	C2186	C2191
C2177	-	+	+	+	-
C2179	+	-	-	-	-
C2182	-	+/-	+	+	-
C2186	-	+	+	+	-
C2191	-	-	-	-	+
C2192	+	-	+	+	-
C2193	-	+/-	+	+	-
MAB382	+	-	-	-	-

Ví dụ 5: Nhận diện epitop và paratop bằng tinh thể học tia X

Xác định các epitop và các paratop cụ thể của các kháng thể C2177 và C2191 bằng cách đồng kết tinh các Fab tương ứng của chúng với mảnh CD27 ECD (các gốc 1-101) làm phức hợp ba thành phần và xác định cấu trúc bằng tinh thể học tia X. Biểu hiện phiên bản thể khảm được dán nhãn His (miền biến đổi của chuột, miền hằng định của người) Fab của C2177 và Fab của C2191 trong các tế bào HEK293 và tinh sạch bằng cách sử dụng ái lực và sắc ký loại trừ kích cỡ. Mảnh ECD được dán nhãn His (các gốc 1-101) của CD27 của người còn được tinh sạch bằng sắc ký trao đổi anion. Điều chế phức hợp ba thành phần CD27:Fab của C2177: Fab của C2191 bằng cách trộn CD27 với lượng dư Fab với tỉ lệ mol 1:1,25:1,25. Ủ phức hợp này trong 2 giờ ở nhiệt độ 4°C, tách ra khỏi loài không được tạo phức hợp bằng cách sử dụng sắc ký loại trừ kích cỡ, và tạo nồng độ là 12mg/ml trong Tris 20mM có độ pH = 8,5, NaCl 250mM. Tiến hành kết tinh phức hợp bằng phương pháp khuếch tán hơi với các giọt liên tục ở nhiệt độ 20°C. Thu được các tinh thể của phức hợp từ PEG 3350 24%, amoni clorua 0,2M, chất đệm Tris 0,1M, độ pH = 8,5. Để thu thập dữ liệu tia X, ngâm một tinh thể trong một vài giây trong dung dịch bảo vệ lạnh chứa dung dịch kết tinh được bổ sung với glyxerol 20%, và làm đông nhanh trong dòng nitơ ở 100K. Thu được dữ liệu nhiễu xạ ở bộ phát tia X Rigaku MicroMax™-007HF được trang bị bộ phận dò tìm Saturn 944 CCD và hệ làm lạnh sâu (cryocooling system) X-stream 2000 (Rigaku) khi xoay tinh thể 240° với sự tiếp xúc 2 phút mỗi ảnh 0,25° và xử lý bằng chương trình XDS (Kabsch W. 2010. Acta Crystallogr. D66:125-132).

Các tính thể thuộc về nhóm không gian đơn tà P21 với thông số tế bào đơn vị: $a = 141,1 \text{ \AA}$, $b = 53,0 \text{ \AA}$, $c = 143,4 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 112,2^\circ$, $\gamma = 90^\circ$.

Cấu trúc tinh thể của phức hợp ba thành phần được xác định ở độ phân giải $3,5 \text{ \AA}$ và được tinh chế tới nhân tố R trong tinh thể học là 26%. Các Fab của C2177 và C2191 liên kết với CD27 ở các epitop không chồng nhau phân biệt từng phần (Fig.2). Fab của C2177 liên kết phần đầu N (ngoài cùng từ bề mặt tế bào) của CD27. Epitop bao phủ $700 \text{ \AA}^2$ và bao gồm 9 gốc: K5, S6, P8, H11, W13, G16, K17, H36, R37 (Fig.3). Paratop được xác định là các gốc kháng thể tiếp xúc (trong $4 \text{ \AA}$) với kháng nguyên. Paratop C2177 bao gồm 5 gốc từ VL (Y31, Y36, Y53, N57, N96) và 9 gốc từ VH (S31, W33, Y52, D55, D57, Y101, Y102, D104, Y105) (Fig.3). Tất cả 6 CDR này bao gồm trong việc nhận biết kháng nguyên. H36 và R37 là các gốc ở giữa của epitop. Chúng chồng lên Y31 của VL và Y102 của VH; H36 cũng tạo ra cầu muối với D104 của VH.

Fab của C2191 liên kết với CD27 ở bề mặt 'bên' (Fig.2) và bao phủ $800 \text{ \AA}^2$ của bề mặt. Epitop bao gồm 10 gốc: F28, D43, P44, I46, P47, G48, V49, H60, S63, H66. Paratop C2191 bao gồm 7 gốc từ VL (Y34, F36, Y53, L54, R96, L98, W100) và 8 gốc từ VH (S31, Y32, Y50, N57, Y59, R100, G101, N102) (Fig.4). Sự tương tác kháng thể-kháng nguyên bị chi phối bởi sự tương tác kỵ nước giữa các gốc 44-49 của CD27 và mảnh kỵ nước ở các CDR của VL.

Vị trí khác nhau của epitop C2177 và C2191 gợi ý về các cơ chế hoạt động khác nhau của các kháng thể này. C2191 có thể cạnh tranh trực tiếp với ECD của CD70 để các epitop chồng lên trên bề mặt 'bên' của CD27. Ngược lại, kháng thể C2177 không cạnh tranh với cùng một epitop nhưng ngăn chặn sự tiếp cận của các tế bào mang CD27 và CD70. Việc quan sát này được hỗ trợ vì sự thật là C2191 ngăn chặn sự liên kết của ECD của CD70 hòa tan được với CD27 trong khi C2177 thì không.

Ví dụ 6: Điều biến kháng thể của đáp ứng tế bào lympho ở người

Mô hình chuột thiếu hụt miễn dịch, chuột NOD/SCID-IL2R γ null (NSG), được phát triển để nghiên cứu các khía cạnh về kiểm soát hệ miễn dịch của người

bằng các đáp ứng tế bào T (Markus G Manz & James P Di Santo Renaissance for mouse models of human hematopoiesis and immunobiology Nature Immunology 10, 1039 - 1042 (2009)). Phương pháp chuyển các PBMC nuôi của người vào chuột được làm tổn thương miễn dịch (NSG) được sử dụng để đánh giá các tác dụng của kháng thể kháng CD27 lên sự ghép và/hoặc sự tăng sinh tế bào của người. Mô hình này cho phép đánh giá các tác dụng của CD27 của người đích lên việc sản sinh kháng thể và các đáp ứng qua trung gian tế bào T.

Các kháng thể C2177 và C2191 được dùng tại thời điểm chuyển tế bào và sau đó là hai lần một tuần trong 3 tuần. Trong ngày 21, chuột bị giết, các tế bào được tinh sạch từ máu và lá lách và lần lượt được mô tả bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. CTLA4-Ig (Orencia, BMS) được bao gồm làm đối chứng dương để ức chế miễn dịch. Đo sự ghép/sự phát triển tế bào của người bằng cách đánh giá sự có mặt của các tế bào CD45+ của người trong các mẫu máu và lá lách.

Giám sát chặt chẽ chuột và thời điểm giết được xác định dựa trên các triệu chứng XGVH tương ứng với các chỉ dẫn bảo vệ động vật. Sử dụng các thông tin dựa trên thí nghiệm để đánh giá các tác dụng của việc điều trị kháng CD27 bao gồm: trọng lượng cơ thể (hai lần hằng tuần), các dấu hiệu quan sát được của XGVH (hai lần hằng tuần), như tư thế, mức hoạt động, cử chỉ, các tổn thương da (cụ thể là, quanh mắt và tai) bằng cách sử dụng 1-5 hệ điểm, đếm chính xác các tập con tế bào của người và tình trạng hoạt hóa bằng cách sử dụng phép phân tích đếm tế bào theo dòng chảy (1) PBMC của người được tiêm, (2) PB của chuột (một lần/tuần), và (3) lá lách và tủy xương; xác định tất cả Ig, IgM và IgG của người trong huyết thanh, lá lách và BM bằng cách sử dụng ELISA, và, khi chết, mô học hoặc hóa mô miễn dịch để xác định các mức độ thâm nhiễm của người trong các cơ quan đích, như gan, thận, phổi và lá lách.

Các nhóm điều trị như sau:

1. PBMC (20 đến 40 triệu tế bào cho mỗi con chuột, i.p.)
2. PBMC + CTLA4-Ig (10mg/kg)
3. PBMC + Kháng thể đối chứng isotyp, 2x/tuần trong 3 tuần

4. PBMC + kháng thể kháng CD27 2x/tuần trong 3 tuần

Chuột được dùng liều 10mg/kg mAb kháng CD27, C2177 và C2191, (các kháng thể của tế bào lai được tạo khảm trên IgG4 của người (ala/ala, ser->pro) scaffold) có các tế bào CD45+ của người ít hơn đáng kể theo số liệu thống kê khi so với riêng PMBC hoặc đối chứng isotyp trong các PMBC được phân lập từ các mẫu máu hoặc lá lách.

Ví dụ 7: Sự thích ứng với khung của người của mAb của C2177 và của C2191

Vị trí và vùng liên kết kháng nguyên được sử dụng để chuyển tính đặc hiệu kháng nguyên từ các kháng thể C2177 và C2191 vào FR của người được phân loại lại như được tóm tắt trong Raghunathan G. US20090118127 A1, 2009. Tóm lại, các vùng liên kết kháng nguyên được xác định bằng cách sử dụng các thuật ngữ khác nhau (xem trong Almagro và Fransson, *Front Biosci* 13: 1619-1633, 2008). Thuật ngữ “vùng xác định hỗ trợ (CDR)” là dựa trên sự biến đổi trình tự (Wu và Kabat, *J. Exp. Med.* 132:211-250, 1970). Có sáu CDR; ba đối với VH (H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3), và ba đối với VL (L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). “Vùng siêu biến,” “HVR,” hoặc “HVL” đề cập đến vùng của miền biến đổi kháng thể mà biến đổi về cấu trúc như được xác định bằng Chothia and Lesk (Chothia and Lesk, *Mol. Biol.* 196:901-917, 1987). Có sáu HVR, ba đối với VH (H1, H2, và H3) và ba đối với VL (L1, L2, và L3).

Trong phương pháp HFA, vùng nhằm chuyển tính đặc hiệu của kháng thể không phải của người vào FR của người (HFR) là các CDR như được xác định bằng Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991) ngoại trừ vùng tương ứng với CDR-1 của VH. Đối với vùng này, tổ hợp của CDR và HVL (CDR-1 được kéo dài của VH) được chuyển từ kháng thể không phải của người vào FR của người (như được nêu trong các bảng 30, 31, 34, 35). Ngoài ra, các biến thể với CDR-H2 được chuyển ngắn hơn (gọi là Kabat-7 [Raghunathan G. US20090118127 A1, 2009]) được tạo ra và thử nghiệm.

Chọn FR của người

FR của người, được xác định là các vùng trong vùng V không được bao gồm trong vị trí liên kết kháng nguyên, được chọn từ kho các gen dòng mầm chức năng của người IGHV, IGKV, IGKJ và IGHJ. Kho các trình tự gen dòng mầm của người thu được bằng cách tìm kiếm cơ sở dữ liệu IMGT (Kaas, et al., Nucl. Acids. Res. 32, D208-D210, 2004; Lefranc M.-P et al., Nucl. Acids Res., 33, D593-D597, 2005) và biên soạn tất cả "01" alen như là 01/10/2007. Từ biên soạn này, các gen thừa (100% giống hệt nhau ở mức axit amin) và các gen với các gốc xystein không được ghép cặp được loại bỏ khỏi biên soạn này.

Việc chọn ban đầu các trình tự của người đối với HFR được dựa trên tính tương đồng trình tự của gen dòng mầm IGHV của người với toàn bộ độ dài của vùng VH chuột bao gồm FR-1 đến 3 cũng như H-CDR-1 và H-CDR-2. Ở giai đoạn tiếp theo, các trình tự của người được chọn được xếp hạng theo thứ tự bằng cách sử dụng điểm mà tính đến cả độ dài của các CDR và tính tương đồng trình tự giữa các CDR của chuột và các trình tự của người. Ma trận đột biến chuẩn, như ma trận thay thế BLOSUM 62 (Henikoff và Henikoff, Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 10915-9, 1992) được sử dụng để tính điểm xếp thẳng hàng của các CDR của chuột và các trình tự của người và điểm phạt lớn được áp dụng nếu có sự thêm và/hoặc loại bỏ trong vòng CDR. FR-4 được chọn dựa trên tính tương đồng trình tự của gen dòng mầm IGHJ (Kaas, et al., Nucl. Acids. Res. 32, D208-D210, 2004; Lefranc M.-P et al., Nucl. Acids Res., 33, D593-D597, 2005) với các trình tự của các kháng thể chuột C2177 và C2191. Quy trình tương tự được sử dụng để chọn FR của người cho VL. IGVK, gen dòng mầm được sử dụng để chọn FRs 1-3 và L-CDR 1-3. Gen dòng mầm IGJK được sử dụng để chọn FR-4.

Ngoài tiêu chuẩn về trình tự, mô hình tương đồng 3D cho các mảnh Fv được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng Modeler (Sali and Blundell. J. Mol. Biol. 234: 779,1993) trong chương trình thích hợp của Accelrys, Inc. Sử dụng các mô hình này để phân tích các biến thể HFR, bao gồm mô tả CDR và đánh giá sự đáng tin cậy trong khả năng triển khai. Các cân nhắc bổ sung để chọn các biến thể HFR để tối thiểu hóa số lượng các gốc metionin và tryptophan tiếp xúc, loại bỏ các vị trí N-

glycosyl hóa tiềm tàng và tạo điều kiện cho các dòng mầm của người có profin biểu hiện cao nhất *in silico* (de Wildt, J. Mol. Biol. 185: 895, 1999).

Để thích ứng khung đường dẫn 1 (path 1) và tối ưu hóa C2177, sáu biến thể HFR V_H và bốn biến thể HFR V_L được bao gồm trong thư viện. Ghép cặp các biến thể HFR V_H và V_L theo cách kết hợp để thu được 24 cặp biến thể HFR cộng 10 đối chứng ghép cặp các biến thể HFR với vùng V đối chứng của C2177 cộng chính C2177 gốc để thu được tổng cộng 35 tổ hợp. Tương tự đối với C2191, năm biến thể HFR V_H và bốn biến thể HFR V_L được ghép cặp theo cách kết hợp để thu được 20 HFR cộng 9 đối chứng kết hợp tất cả các biến thể HFR V ghép cặp với vùng V đối chứng của C2191 cộng chính C2191 gốc cho tổng cộng 30 biến thể. ADN mã hóa các miền biến đổi được chọn được tái tổ hợp bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn để tập hợp các MAb hoàn chỉnh với vùng hằng định IgG1 và kapa của người. Kháng thể của thể khảm tham chiếu thu được của C2177, M40 được chỉ định, bao gồm các vùng biến đổi H7 và L18. Kháng thể của thể khảm tương ứng của C2191, M41 được chỉ định, bao gồm các vùng biến đổi H10 và L20. Các mAb được biểu hiện tạm thời trong các đĩa 48 lỗ trong các tế bào HEK 293E. Phân dịch nổi từ các canh trường được thử nghiệm về sự biểu hiện và hoạt tính liên kết 96 giờ sau khi chuyển nhiễm. Mức biểu hiện của mAb được tiết được đánh giá bằng cách sử dụng công nghệ Octet để đo tốc độ kháng thể liên kết với các bộ cảm biến sinh học Protein A. Mức biểu hiện được định lượng bằng cách so với các mẫu chuẩn của nồng độ kháng thể đã biết. Đường cong chuẩn 8 điểm bao gồm phần pha loãng theo bậc 1:2 của kháng thể gồm isotyp giống hệt, được tập hợp, bắt đầu ở 100ug/ml. Các bộ cảm biến sinh học được hydrat hóa trong 10 phút trong môi trường tiêu hao, và tốc độ liên kết của các mẫu chuẩn và không biết được đo trong 2 phút. Phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng công thức đáp ứng liều gồm 5 thông số và thuật toán tốc độ liên kết theo độ dốc ban đầu. Các mẫu có sự biểu hiện >1ug/ml được pha loãng đến 1ug/ml trong môi trường tiêu hao và được sàng lọc bằng cách sử dụng điểm duy nhất trong phương pháp ELISA. Đối với phương pháp ELISA này, các đĩa maxisorp màu đen 96 lỗ được phủ bằng 50uL 3ug/ml FC của dê kháng IgG của người được pha loãng trong chất đệm carbonat-bicarbonat, pH = 9,4 ở nhiệt độ 4°C qua đêm và sau

đó rửa ba lần bằng chất đệm rửa (PBS với Tween-20 0,05%), phong bế bằng 300 μ l dung dịch StartingBlock (Thermo Scientific) trong 1 giờ, sau đó rửa như trước đó. Các mẫu hoặc mẫu chuẩn được pha loãng đến 100ng/ml trong môi trường tiêu hao, và bổ sung 50 μ L vào đĩa thử nghiệm ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và lắc. Rửa các đĩa ba lần và 50 μ L cho mỗi lỗ ECD của CD27 của người với nhãn His được bổ sung ở 60ng/ml được pha loãng trong chất đệm thử nghiệm (PBS với FBS 1% và Tween-20 0,05%) và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa, 50 μ L cho mỗi lỗ Qiagen peroxidase kết hợp penta-his với tỉ lệ pha loãng 1:2000 trong chất đệm thử nghiệm được bổ sung và ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và lắc. Trộn cơ chất BM ChemiLum (BM Chemilum, POD, Roche) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất, và bổ sung 50 μ L vào các đĩa sau lần rửa cuối cùng. Sau 10 phút, đọc các đĩa trên bộ đọc Perkin Elmer Envision.

Các kết quả sàng lọc thư viện tổ hợp C2177 thể hiện rằng tất cả các vùng V liên kết với CD27 với các độ dài khác nhau. Một vài biến thể HFR tạo ra tín hiệu liên kết cao hơn so với C2177 gốc trong khi các biến thể khác thể hiện liên kết mà có thể so sánh được hoặc thấp hơn so với các biến thể gốc. Tất cả các VL liên kết kháng nguyên ở các mức có thể dò tìm được và không ảnh hưởng sự liên kết các biến thể HFR được biểu hiện ở mức độ chấp nhận được nhưng thấp hơn so với biến thể gốc. Hai tư kháng thể HFR C2177 (tổ hợp VH, VL) thể hiện sự liên kết với CD27 và sự biểu hiện >1 μ g/ml.

Các kết quả sàng lọc thư viện tổ hợp C2191 thể hiện rằng tất cả ngoại trừ một VH liên kết với CD27 với các tín hiệu thay đổi. Với việc ngoại trừ ghép cặp với VH này, tất cả VL thể hiện sự liên kết với CD27. Một vài biến thể HFR tạo ra tín hiệu liên kết cao hơn so với C2177 gốc, trong khi các biến thể khác thể hiện sự liên kết mà có thể so sánh được hoặc thấp hơn so với các biến thể gốc. Mười bảy kháng thể HFR C2191 (tổ hợp VH, VL) thể hiện sự liên kết với CD27 và sự biểu hiện >1 μ g/ml.

Dựa trên ái lực liên kết tương đối đối với CD27 được đo bằng ELISA, mười lăm biến thể C2177 và mười một biến thể C2191 được chọn để biểu hiện và tinh sạch ở quy mô nhỏ. Tiến hành biểu hiện ở quy mô nhỏ tạm thời trong các tế bào CHO-S ở thể tích 750ml. Tinh sạch các phần dịch nổi thu gom được thông qua sắc

ký Protein A và đánh giá các protein được tinh sạch về ái lực và hoạt tính chức năng của chúng.

Ái lực của các biến thể MAb HFR C2177 của người được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) bằng cách sử dụng hệ tia tương tác protein ProteOn XPR36 (BioRad). Tốc độ kết hợp và phân ly CD27 được đo với từng biến thể. Chuẩn bị bề mặt bộ cảm biến sinh học bằng cách ghép cặp đồng hóa trị các kháng thể của dê kháng IgG của người (Fc) vào bề mặt của mạch GLC (BioRad) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất về hóa học ghép cặp amin. Gần 5.000 RU (RU-response unit: đơn vị đáp ứng) của kháng thể được cố định. Tiến hành các thử nghiệm động học ở 25°C trong chất đệm chạy (PBS, P20 0,01%, BSA 0,01%). Pha loãng theo bậc 1:3 của ECD của CD27 của người từ, bắt đầu từ 300nM được điều chế trong chất đệm chạy. Khoảng 350RU mAb được bắt trên từng kênh của mạch bộ cảm biến. Đối chứng kháng thể khớp với isotyp được cố định trong kênh 6 và sử dụng làm bề mặt tham chiếu. Bắt mAb, sau đó là ba phút tiêm (pha kết hợp) kháng nguyên ở 30uL/phút, sau đó là 10 phút của dòng chất đệm (pha phân ly). Tái tạo bề mặt mạch bằng cách tiêm axit phosphoric 0,85% ở 100uL/phút. Xử lý dữ liệu trên phần mềm công cụ. Loại trừ tham chiếu kép dữ liệu được tiến hành bằng cách loại trừ các đường cong được tạo ra bằng cách tiêm chất đệm từ các đường cong được loại trừ để tham chiếu để tiêm chất đang được phân tích (analyte). Tiến hành phân tích động lực học của dữ liệu bằng cách sử dụng 1:1 mô hình liên kết Langmuir với sự vừa vặn toàn cầu. Kết quả đối với mỗi mAb được thông báo dưới dạng K_a (Tốc độ chạy), K_d (Tốc độ dừng), K_D (hằng số phân ly cân bằng), và phần trăm hoạt tính. Các ái lực của các biến thể HFR C2177 tương tự với mAb M40 gốc, thể hiện nhỏ hơn ba lần thay đổi trong K_D đối với tất cả các biến thể. Tương tự, các ái lực của các biến thể mAb HFR C2191 của người thể hiện chênh lệch nhỏ hơn hai lần so với mAb M41 gốc.

Hoạt tính sinh học của các biến thể HFR được đo bằng sự ức chế cảm ứng NFkB qua trung gian CD70 của chúng trong thử nghiệm gen thông báo Luxiferaza. Chuyển nhiễm các tế bào HEK với vector pGL4-32-NFkB-Luc2 (Promega) biểu hiện luxiferaza cảm ứng được NFkB, và plasmit biểu hiện CD27 hoặc vector rỗng và ủ

qua đêm trong môi trường biểu hiện Freestyle (Gibco, #12338). Ngày tiếp theo, các tế bào được đặt trong đĩa nuôi cấy 96 lỗ trong 40 uL, và 50.000 tế bào cho mỗi lỗ. Sau đó, 40uL kháng thể hoặc đối chứng được bổ sung vào các tế bào bằng cách sử dụng pha loãng theo bậc 1:3, bắt đầu từ nồng độ cuối trong lỗ 30ug/ml, và ủ trong 1 đến 2 giờ. Trong quá trình ủ này, các tế bào episom CD70 được điều chế để kích thích. Tóm lại, các tế bào bám dính được tái tạo huyền phù bằng cách sử dụng các kỹ thuật nuôi cấy tế bào chuẩn và ủ trong 1 giờ với Mitomycin C ở 25ug/mL để dừng sự phát triển tế bào. Sau khi ủ, rửa các tế bào CD70+ trong môi trường, pha loãng, và bổ sung 40uL với 10.000 tế bào cho mỗi lỗ. Ủ các đĩa này qua đêm. Ngày tiếp theo, điều chế chất phản ứng Steady Glo (Promega) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và bổ sung 120uL cho mỗi lỗ. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút trong khi lắc. Sự phát quang được đo trên bộ đọc Perkin Elmer Envision. Các IC₅₀ của các biến thể HFR C2177 tương tự với nhau và với MAb gốc M40, nằm trong khoảng từ 0,11nM đến 0,21nM. Các IC₅₀ của các biến thể HFR C2191 cũng tương tự với nhau và với gốc M41, thay đổi từ 0,13nM đến 1,39 nM.

Việc xem xét về ái lực, hoạt tính sinh học và các tính chất sinh lý dẫn đến sự chọn lọc biến thể M69 C2177, bao gồm các vùng biến đổi H28 (SEQ ID NO: 111) và L35 (SEQ ID NO: 82), và biến thể M91 C2191, bao gồm các vùng biến đổi H31 (SEQ ID NO: 131) và L42 (SEQ ID NO: 140), để thành thực ái lực. Tóm tắt về K_D, hiệu suất tinh sạch, sự liên kết với ECD CD27 đối với các phân dịch nổi nuôi cấy tế bào ("ELISA"), và sự ức chế (IC₅₀) đáp ứng NFκβ qua trung gian CD27 bằng CD70 đối với gốc M40 và biến thể HFR M69 của nó và đối với gốc M41 và biến thể M91 được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

Protein ID	VH	VL	Protein K _D (nM)	Hiệu suất (mg)	Tín hiệu ELISA	NFκB IC ₅₀ (nM)
M40 gốc C2177	H7	L18	0,96	n,d,	1,00	0,14
M69	H28	L35	0,77	10,08	1,09	0,11

M41 gốc C2191	H10	L20	10,3	n,d,	1,00	0,30
M91	H31	L42	7,9	5,64	1,09	0,28

Ví dụ 8: tối ưu hóa M69 MAB HFR C2177

M69 có ái lực khoảng 1nM với ECD CD27 của người và chứa các CDR giống như C2177, và CD27M40 gốc HFA. Việc tối ưu hóa M69 liên quan đến nhiều thư viện để làm tăng ái lực và loại bỏ các vị trí PTM được đưa vào hoặc được nhận diện trong quy trình.

Như được mô tả trong Ví dụ 9, sự tiếp cận thư viện biểu hiện thực khuẩn thể song song đối với HFR và việc tối ưu hóa C2177 nhận diện được sự đa dạng trong prolin ở vị trí 52a của CDR-H2. Vị trí này không được ngẫu nhiên hóa trong thiết kế thư viện. Đồng cấu trúc của C2177 và Fab của C2191 với CD27 (Ví dụ 5) chỉ ra rằng P52a không liên quan trực tiếp trong việc liên kết kháng nguyên. Tuy nhiên, sự đột biến ở vị trí này có thể thay thế sự tạo cấu hình vòng CDR-H2 và tạo ra các tương tác tối ưu hơn với CD27 bằng các gốc bao quanh D27. Do đó, thư viện được thiết kế để đa dạng hóa một cách ngẫu nhiên P52a và các gốc Y52, G53 và D54 liền kề của nó bằng cách sử dụng sự phát sinh đột biến NNK (thư viện C27H28L2). Cũng trong sự tối ưu hóa đường dẫn 2, Y32 với đột biến F trong CDR-L1 thể hiện sự liên kết được cải thiện. Do đó, thư viện thứ hai được thiết kế có sự đa dạng ngẫu nhiên trong Y32 cùng với sự đa dạng trong các gốc Y30a, D30d, A50, mà nằm trong cùng mặt phẳng cấu trúc như Y32 (thư viện C27L35L2).

Ngoài ra, vòng CDR-H3 và CDR-L1 hoàn thiện được đánh giá bằng cách sử dụng các thư viện có sự đa dạng được giới hạn. Bảng 5 và 6 thể hiện sự thiết kế của các thư viện này.

Bảng 5. Thiết kế thành thực ái lực đa dạng được giới hạn đối với CDR-H3 (C27H28L3)

axit amin gốc VH và vị trí	Sự đa dạng
Ser95	A,S

Asp96	A,D
Tyr97	A,D,S,Y
Tyr98	A,D,S,Y
Gly99	A,G
Asp100	A, D
Tyr100a	A,D,S,Y
Gly100b	A,G
Phe100c	A,F,S,V
Ala101	A,G
Tyr102	A,D,S,Y

Bảng 6. Thiết kế thành thực ái lực đa dạng được giới hạn đối với CDR-L1 (C27L35L3)

axit amin gốc VH và vị trí	Sự đa dạng
Lys24	A,K,E,T
Ala25	A,G
Ser26	A,S
Gln27	A,Q,E,P
Ser28	A,S
Val29	A,V
Asp30	A,D
Tyr30a	A,D,S
Ala30b	A,G
Gly30c	A,G
Asp30d	A,D
Ser31	A,S
Tyr32	A,D,S
Met33	A,M,T,V
Asn34	A,N,D,T

Các thư viện Fab được tạo cấu trúc trong hệ biểu hiện Fab thực khuẩn thể pIX

như được mô tả trong WO2009/085462, Shi et al., J Mol Biol 397: 385-396 (2010), và Tornetta et al., J Immunol Methods 360: 39-46 (2010) với các biến đổi nhỏ với các vị trí enzym giới hạn. Các thư viện này được sàng lọc để kháng ECD của CD27 được biotinyl hóa theo các sơ đồ sàng lọc đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được mô tả trong WO2009/085462 và trong Shi et al., J Mol Biol 397: 385-396 (2010), nhằm làm tăng ái lực bằng cách chọn tốc độ dừng chậm hơn hoặc tốc độ chạy nhanh hơn. Thực khuẩn thể được sản sinh bằng cách nhiễm thực khuẩn thể hỗ trợ. Các chất liên kết được phục hồi bằng cách bổ sung các hạt để tạo ra phức hợp hạt/kháng nguyên/thực khuẩn thể. Sau khi rửa lần cuối, thực khuẩn thể được giải phóng bằng cách nhiễm các tế bào coli Escherichia TG-1 phát triển theo hàm mũ. Thực khuẩn thể lại được sản sinh và đưa vào các vòng sàng lọc bổ sung.

Để tiếp tục sàng lọc, điều chế ADN từ các nguyên liệu glyxerol của các vòng sàng lọc thực khuẩn thể và cắt bỏ gen pIX bằng cách phân giải *NheI/SpeI*. Sau khi gấn, biến nạp ADN vào các tế bào TG-1 và sinh trưởng trên các đĩa LB/Agar qua đêm. Ngày tiếp theo, chọn lọc các khuẩn lạc, cho sinh trưởng qua đêm, và sử dụng các canh trường để (i) thực hiện PCR khuẩn lạc và xác định trình tự của các vùng V, và (ii) kích thích sản sinh Fab. Để sản sinh Fab, canh trường qua đêm được pha loãng gấp 10-100 lần trong môi trường mới và sinh trưởng trong 5-6 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sự sản sinh Fab được kích thích bằng cách bổ sung môi trường mới chứa IPTG và các canh trường được sinh trưởng qua đêm ở nhiệt độ 30°C. Ngày tiếp theo, các canh trường được xoáy tròn (spun down) và các phần dịch nổi, chứa protein Fab hòa tan được, được sử dụng cho ELISA Fab. Đối với ELISA, protein Fab hòa tan được được bắt lên trên các đĩa bằng kháng thể kháng Fd(CH1) đa dòng. Sau khi rửa và phong bế, bổ sung ECD CD27 của người được biotinyl hóa ở nồng độ 0,2nM. Nồng độ này làm có thể xếp hạng các biến thể Fab, được xác định ở dạng phần trăm liên kết của Fab gốc, mà trong đó Fab gốc, có mặt như là đối chứng trong tất cả các đĩa, được xác định là 100% liên kết. Dò tìm ECD CD27 được biotinyl hóa bằng streptavidin tiếp hợp HRP và đọc sự quang hóa trong bộ đọc đĩa. Ở nồng độ của CD27 này, việc xếp hạng các biến thể Fab, chuẩn hóa Fab gốc, là có thể. Theo tiêu chuẩn này, 10 chuỗi nặng và 6 chuỗi nhẹ liên kết với CD27 của người ở 100% hoặc

cao hơn so với Fab M69 được chọn.

Từ thư viện CDR-H2 (C27H28L2), Y gốc được ưu tiên chọn ở vị trí 52 chỉ ra sự ưu tiên đối với gốc này. Ở vị trí 52a, P được thay thế bằng các gốc A, S, V, và G trong số các Fab với hoạt tính liên kết tốt nhất. Ở vị trí 53, G gốc được chọn cùng với R và N. Ở vị trí 54, chỉ có D gốc được thu hồi. Chín dòng vô tính từ thư viện này (Bảng 7) được tạo dòng vô tính phụ trong vector IgG để biểu hiện và mô tả như mAb.

Bảng 7. chín dòng vô tính VH được chọn từ thư viện đa dạng đầy đủ C27H28L2

Peptit ID	Y52	P52a	G53	D54
H237	F	V	R	D
H238	Y	V	G	D
H239	Y	A	G	D
H240	Y	A	R	D
H241	Y	G	R	D
H242	Y	A	N	D
H243	Y	G	G	D
H244	Y	S	G	D
H245	Y	S	R	D

Đối với thư viện CDR-H3 (C27H28L3), sự đa dạng duy nhất thu hồi được là S95A và A101G. Một dòng vô tính từ thư viện này chứa hai đột biến (Bảng 8) được tạo dòng vô tính phụ trong vector IgG để biểu hiện và mô tả như mAb.

Bảng 8. dòng vô tính VH duy nhất được chọn từ C27H28L3

Peptit ID	S95	D96	Y97	Y98	G99	D100	Y100a	G100b	F100c	A101	Y102
H236	A	D	Y	Y	G	D	Y	G	F	G	Y

Đối với thư viện bốn vị trí L-CDR1 (C27L35L2), vị trí 30a thể hiện sự giàu Y

và W gốc. Ở vị trí 30d, các gốc S, H, và E được làm giàu cùng với D gốc. Ở vị trí 32, Y gốc được thay thế bằng F và W. Ở vị trí 50, T được ưu tiên hơn so với A gốc. Nói chung, các dòng vô tính tốt nhất có chuỗi bên kỵ nước hơn so với gốc. Năm dòng vô tính từ thư viện này (Bảng 9) được tạo dòng vô tính phụ trong vector IgG để biểu hiện và mô tả như các mAb.

Đối với thư viện CDR-L1 hoàn thiện với sự đa dạng hạn chế (C27L35L3), chỉ có một trình tự được thu hồi, với sự khác nhau duy nhất với gốc là Y32 thay đổi thành F, tương tự như thư viện VL bốn vị trí nêu trên. Thư viện CDR-L1 hoàn thiện này không bao gồm F ở vị trí 32, và do đó dòng vô tính thu hồi được có thể là chất tạp nhiễm từ thư viện VL bốn vị trí. Dòng vô tính này (L255) được tạo dòng vô tính phụ trong vector IgG để biểu hiện và mô tả như mAb (Bảng 9).

Bảng 9. Sáu dòng vô tính VL được chọn từ C27L35L1 và C27L35L2

Peptit ID	Y30a	D30d	Y32	A50
L255	Y	D	F	A
L256	Y	D	W	V
L257	Y	D	W	T
L258	Y	S	F	T
L260	W	H	W	T
L261	Y	S	F	E

Các chuỗi nhẹ 6 biến thể được ghép cặp với các chuỗi nặng 10 biến thể để tạo ra 60 tổ hợp mà được biểu hiện bởi các tế bào HEK293E. Các phản dịch nổi được sàng lọc về mức độ biểu hiện, liên kết với ECD CD27 của người như được đo bằng ELISA, và ái lực như được đo trên thiết bị ProteOn. Mức độ biểu hiện của tất cả các biến thể là đủ cho các mục đích sàng lọc. Ái lực được làm tăng gấp 40 lần đối với một số biến thể. Hai mAb M596 và M600, được chọn cho sự phát sinh đột biến tiếp để loại bỏ các vị trí tiềm tàng của các cải biến sau dịch mã. Các tổ hợp chuỗi VH và VL đối với các mAb này được nêu trong Bảng 10. Các kháng thể khác nhau chỉ do hai gốc trong chuỗi nhẹ của chúng.

Bảng 10. Sự ghép cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở các đầu được thành thực ái lực của C2177

Kháng thể ID	Peptit Chuỗi nhẹ ID	CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	Peptit Chuỗi nặng ID	CDR-H2 (SEQ ID NO:)
M596	L257	KASQSVDYAGDSWMN (26)	TASNLES (39)	H239	RIYAGDGD TN (các gốc 1-10 của 15)
M600	L255	KASQSVDYAGDSFMN (25)	AASNLES (37)	H239	RIYAGDGD TN (các gốc 1-10 của 15)

M596 khác với phân tử gốc, M69, ở ba vị trí: P52aA trong CDR-H2, Y32W trong CDR-L1, và A50T trong CDR-L2. M600 khác với M69 ở hai vị trí: đột biến P52aA trong CDR-H2 và Y32F trong CDR-L1.

Ba vị trí cải biến sau dịch mã tiềm tàng được chia sẻ được nhận diện trong M596 và M600. Có một vị trí glycosyl hóa liên kết N tiềm tàng ở vị trí N58 trong CDR-H2 và hai vị trí isome hóa tiềm tàng trong CDR-H2 và CDR-L1 được mã hóa lần lượt bằng “DG” và “DS,”. Ngoài ra, M596 chứa gốc tryptophan không phải dòng mầm trong CDR-L1 mà có thể nhạy với sự oxy hóa.

Để loại bỏ nguy cơ glycosyl hóa, ba thay thế đơn riêng rẽ được tạo ra ở N58 và một thay thế ở S60 (Bảng 11). Các cấu trúc được biểu hiện trong các tế bào HEK293E và các phần dịch nổi được đánh giá về ái lực đối với CD27 bằng cách sử dụng thiết bị ProteOn. Tất cả các biến thể có các ái lực gần với các ái lực của các gốc mà là 25pM và 49pM đối với lần lượt M596 và M600. Các biến thể M680 và M678, đều thu được từ M600, được chọn để đánh giá sự thay thế thêm để loại bỏ các vị trí isome hóa. Các biến thể M680 và M678 có A ở lần lượt các vị trí 60 và 58, và có ưu điểm hơn về sự thiếu tryptophan trong CDR-L1 mà có mặt trong gốc M596.

Bảng 11.

axit amin gốc VH và vị trí	Sự đa dạng
Asn58	N, A, R, T
Ser60	S, A

Để đánh giá tác động của việc gây đột biến các vị trí isome hóa tiềm tàng trong M678 và M680, thư viện nhỏ được thiết kế để loại bỏ đồng thời cả hai vị trí. Mỗi đột biến được thay thế riêng rẽ trong CDR-H2 của chuỗi nặng hoặc CDR-L1 của chuỗi nhẹ thông thường và sau đó ghép cặp trong thư viện tổ hợp. Sự đa dạng của thư viện này được thể hiện trong Bảng 12.

Bảng 12

axit amin gốc VH và vị trí	Sự đa dạng
Asp54	D, E
Gly55	G, A
axit amin gốc VL và vị trí	Sự đa dạng
Asp34	D, E

Các mAb này được biểu hiện và ái lực được đánh giá về các biến thể vị trí glycosyl hóa. Đột biến D34E trong vị trí isome hóa tiềm tàng CDR-L1 dẫn đến sự tăng gấp hai lần thích hợp về ái lực và do đó vị trí này được loại bỏ thành công. Đột biến D54E trong vị trí isome hóa tiềm tàng CDR-H2 giảm ái lực lớn hơn 10 lần. Tuy nhiên, đột biến G55A không ảnh hưởng đáng kể đến ái lực. Các biến thể M703 và M706 giữ ái lực của gốc M600 và có nguy cơ làm giảm tác động lên chức năng từ PTM. Bảng 13 thể hiện các biến thể được chọn từ từng giai đoạn đánh giá nguy cơ PTM, sự ghép cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của chúng, ái lực, và các biến đổi trình tự trong các CDR. Đột biến được chọn để loại bỏ vị trí glycosyl hóa tiềm tàng được gạch chân. Các đột biến để loại bỏ hai vị trí isome hóa tiềm tàng được in đậm và gạch chân hai lần.

Bảng 13.

mAb ID	VH	VL	K _D (pM)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-L1 (SEQ ID NO:)
--------	----	----	---------------------	---------------------	---------------------

M596	H239	L257	25	RIYAGDGD ^T NYSPSFQG (165)	KASQSVDYAGDSWMN (26)
M600	H239	L255	49	RIYAGDGD ^T NYSPSFQG (165)	KASQSVDYAGDSFMN (25)
M678	H259	L255	53	RIYAGDGD ^T <u>A</u> YSPSFQG (166)	KASQSVDYAGDSFMN (25)
M680	H260	L255	30	RIYAGDGD ^T NY <u>A</u> PSFQG (167)	KASQSVDYAGDSFMN (25)
M703	H270	L267	28	RIYAGD <u>A</u> D ^T <u>A</u> YSPSFQG (168)	KASQSVDYAG <u>E</u> SFMN (29)
M706	H272	L267	13	RIYAGD <u>A</u> D ^T NY <u>A</u> PSFQG (169)	KASQSVDYAG <u>E</u> SFMN (29)

Ví dụ 9: HFR được kết hợp và sự tối ưu hóa MAB C2177

Theo cách tiếp cận này, việc đặt giới hạn các biến thể HFR được đánh giá trong định dạng (format) Fab về biểu hiện, biểu hiện pIX và sự liên kết và các lựa chọn tốt nhất sau đó được đưa lên tối ưu hóa. Các CDR từ C2177 được thích ứng với khung của người vào hai chuỗi nặng VH5-51 (SEQ ID NO: 102 H24) và VH1-46 (SEQ ID NO: 106 H25) và hai chuỗi nhẹ Vk4-1 và Vk012 (SEQ ID NO: 90 L36). Các miền biến đổi HFA được ghép cặp với nhau trong ma trận 2x2 làm các Fab với vùng hằng định CH1 và Ck của người trong vector biểu hiện thực khuẩn thể pIX Fab. Biến thể VH1-46/Vk012 (M55, H25/L36) thể hiện sự liên kết với CD27 và các đặc tính biểu hiện tốt và được chọn để tạo cấu trúc các thư viện thành thực ái lực.

Các thư viện Fab để biểu hiện thực khuẩn thể pIX được tạo cấu trúc như được mô tả trên đây trong ví dụ 8. Dựa trên đồng cấu trúc thử nghiệm của CD27 với C2191 và C2177 (Ví dụ 5), các thư viện đa dạng được thiết kế trong các gốc CDR trong và xung quanh paratop của kháng thể. Sự nhấn mạnh về thay đổi là ở các CDR L1, L3, và H2. Tổng 4-6 gốc trong từng CDR được đa dạng hóa với codon NNK, mã hóa cho tất cả 20 axit amin. Kích cỡ của thư viện được ước tính là $\leq 6 \times 10^7$ biến thể, mà có thể được phủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật tách dòng endonucleaza giới hạn

cho thư viện tiêu chuẩn. Bảng 14 thể hiện các gốc được đem đa dạng hóa đầy đủ trong các thư viện CDR khác nhau.

Bảng 14: Thiết kế thư viện thành thực ái lực đối với C2177

CDR của VH	axit amin gốc và vị trí
CDR-H2	Y52
	G53
	D54
	D56
	N58
CDR-H3	Y97
	Y98
	D100
	Y100a
CDR của VL	axit amin gốc và vị trí
CDR-L1	Y30a
	A30b
	G30c
	D30d
	Y32
CDR-L3	Q90
	N92
	E93
	D94
	Y96

Các thư viện Fab được biểu hiện trên protein bọc thực khuẩn thể IX được sàng lọc để kháng ECD của CD27/Fc được biotinyl hóa. Thực khuẩn thể được tạo ra bằng cách nhiễm thực khuẩn thể hỗ trợ của thư viện plasmit các biến thể. Các chất liên kết được phục hồi bằng cách bổ sung các hạt từ tính được bọc streptavidin để tạo ra phức hợp hạt/kháng nguyên/thực khuẩn thể. Sau khi rửa lần cuối cùng, thực khuẩn thể được giải phóng bằng cách tiêm các tế bào coli Escherichia MC1061F' phát triển theo hàm mũ. Thực khuẩn thể lại được sản sinh và đưa vào các vòng phân tích bổ sung. Fab hòa tan được từ các dòng vô tính được chọn được tạo ra và đánh giá về hoạt tính liên kết như được mô tả trong Đường dẫn 1. Việc đạt được kết quả chỉ thu được từ các thư viện CDR-L1 và CDR-L2. Hai mươi một dòng vô tính từ hai thư viện này chứng tỏ sự liên kết lớn hơn so với dòng vô tính của HFR Fab gốc. Các

dòng vô tính chứa C hoặc M trong các trình tự được đa dạng hóa được loại bỏ. Mười Fab được chuyển hóa để biểu hiện trong nền IgG4SPAAa/kapa để mô tả thêm. Chuỗi nặng IgG4PAA là IgG4 của người chứa serin để thay thế prolin trong vùng bản lề (Angal et al., Mol Immunol 30: 105 (1993) và sự thay thế alanin ở hai vị trí trong CH2 (ML Alegre et al., Transplantation; 57: 1537-43 (1994)). Các mAb được sản sinh trong các tế bào HEK293E như là các bản sao của Fab và như là ma trận của tổ hợp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Ái lực được đo trên thiết bị ProteOn bằng cách sử dụng các phản dịch nổi nuôi cấy (Bảng 15). Đột biến của P52a đối với Q (M158) hoặc S (M157) trong CDR-H2 làm giảm K_D 6 lần so với K_D của mAb gốc (M159). Đột biến Y36F trong CDR-L1 (M149) làm giảm K_D 4 lần và việc bổ sung đột biến G33H và D34E (M155) dẫn đến sự giảm K_D 6 lần. Tổ hợp của đột biến P52S với Y36F (M160) hoặc Y36F cộng G33H và D34E làm giảm K_D 20 lần đến 100pM. Các tổ hợp thay thế trong M158, M160 và M166 được chọn để mô tả thêm.

Bảng 15: Bảng ban đầu của các mAb thu được từ các thư viện thành thực Fab

Protein ADN ID	H&L	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-L1 (SEQ ID NO:)	K _D (nM)
M149	H25,L219	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYAGDSFMN (25)	0,54
M150	H25,L218	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYFGDSL MN (32)	4,04
M151	H25,L224	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYYNSSFMN (36)	1,07
M152	H25,L223	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYWSDSF MN (35)	1,54
M153	H25,L222	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYVGTSFMN (34)	1,41
M154	H25,L221	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYFRTSF MN (33)	1,56
M155	H25,L217	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYAHESFMN (31)	0,37

M156	H25,L216	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDFSEFSMN (170)	0,71
M157	H197,L220	RIYQGDGDTNYNGKFKG (22)	KASQSVDYAGDSYMN (24)	0,39
M158	H196,L220	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYAGDSYMN (24)	0,36
M159	H25,L220	RIYPGDGDTNYNGKFKG (3)	KASQSVDYAGDSYMN (24)	2,23
M160	H196,L219	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYAGDSFMN (25)	0,12
M161	H196,L218	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDFGDSLNM (32)	1,34
M162	H196,L224	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYNNSSFMN (36)	0,43
M163	H196,L223	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYWSDSFMN (35)	0,30
M164	H196,L222	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYVGTSMN (34)	0,27
M165	H196,L221	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDFRTSMN (33)	0,18
M166	H196,L217	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDYAHESFMN (31)	0,10
M167	H196,L216	RIYSGDGDTNYNGKFKG (19)	KASQSVDFSEFSMN (170)	0,91

Protein M158, M160 và M166 được tạo ra trong 750mL canh trường nuôi cấy các tế bào HEK293, tinh sạch, và phân tích về động học liên kết với CD27-His trên Biacore. Các trị số K_D là khoảng 1log cao hơn so với các trị số K_D được đo bằng ProteOn với phần dịch nổi thô nhưng thể hiện các trị số giống so với nhau (Bảng 16).

Bảng 16

mAb ID	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (pM)
--------	---	------------------------------	------------

M158	(1,5±0,03)E+06	(6,6±1,7)E-04	439±114
M160	(1,6±0,15)E+06	(1,8±0,01)E-04	117±11
M166	(1,62±0,04)E+06	(2,03±0,16)E-04	126±11

Khi đánh giá lại các tổ hợp HFA ban đầu, VH thích hợp với VH5-51 thể hiện K_D nhỏ hơn 2 lần so với khung VH1- 46. Đột biến P52aS trong H-CDR2 được đưa vào VH VH5-51 tạo ra H221. H221 được biểu hiện với chuỗi nhẹ L220, L219 và L217 từ mAb gốc HFA (M159) và lần lượt các biến thể được cải thiện ái lực M160 và M166, để tạo ra các mAb M171, M169 và M170. Các phép đo động học BIAcore trên mAb được tinh sạch thể hiện sự cải thiện gấp hai lần của K_D so với các biến thể VH1-46 tương ứng (các bảng so sánh 16 và 17).

Bảng 17

mAb ID	Peptit H/L ID	K_{on} trung bình ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} trung bình (s^{-1})	K_D trung bình (pM)
M169	H221,L219	(1,48± 0,13)E+06	1,02 ± 0,07)E-04	69 ± 8
M170	H221,L217	1,66E+06	1,16E-04	70
M171	H221,L220	1,53E+06	3,58E-04	234

Việc phân tích trình tự của M160, M169 và M170 nhận diện vị trí isome hóa tiềm tàng ở D54-G55 và vị trí khử amit tiềm tàng ở N61-G62 trong CDR-H2 của H196 và H221. Ngoài ra, vị trí isome hóa tiềm tàng được nhận diện ở D34 trong CDR-L1 của L219. Các đột biến được đưa vào để loại bỏ các vị trí này và đánh giá về tác động của chúng lên sự hoạt tính (Bảng 18). Các mAb được tinh sạch được phân tích về ái lực với CD27-His trên ProteOn. Các đột biến không có tác dụng hoặc có tác dụng tích cực lên K_D . Ví dụ, cả M668 và M671 có K_D gần như nhỏ hơn 2 lần so với lần lượt các mAb, M160 và CM169 gốc của chúng.

Bảng 18: Các biến thể mAb với các trình tự PTM được đột biến

mAb gốc	mAb ID	Peptit H/L ID	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-L1 (SEQ ID NO:)	k_{on} trung bình ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} trung bình (s^{-1})	K_D trung bình (pM)
---------	--------	---------------	---------------------	---------------------	--	-----------------------------------	-----------------------

M16 0	M16 0	H196,L2 19	RIYSGDGDNTNYNGKFKG (19)	KASQSVDDYAGDSFMN (25)	2,07E+ 06	2,23 E-04	108
M16 6	M16 6	H196,L2 17	RIYSGDGDNTNYNGKFKG (19)	KASQSVDDYAHESFMN (31)	1,84E+ 06	2,34 E-04	127
M16 9	M16 9	H221,L2 19	RIYSGDGDNTNYNGKFKG (19)	KASQSVDDYAGDSFMN (25)	2,36E+ 06	1,39 E-04	59
M16 0	M66 8	H255,L2 66	RIYSGDADTNYAQKFKG (20)	KASQSVDDYAGESFMN (29)	2,14E+ 06	1,29 E-04	60
M16 0	M66 9	H256,L2 66	RIYSGDADTNYNQKFKG (21)	KASQSVDDYAGESFMN (29)	2,49E+ 06	1,45 E-04	58
M16 9	M67 0	H257,L2 66	RIYSGDADTNYAQKFKG (20)	KASQSVDDYAGESFMN (29)	1,73E+ 06	1,13 E-04	65
M16 9	M67 1	H258,L2 66	RIYSGDADTNYNQKFKG (21)	KASQSVDDYAGESFMN (29)	2,52E+ 06	9,73 E-05	39
M16 6	M67 2	H255,L2 17	RIYSGDADTNYAQKFKG (20)	KASQSVDDYAGESFMN (29)	1,83E+ 06	2,64 E-04	144
M16 6	M67 3	H256,L2 17	RIYSGDADTNYNQKFKG (21)	KASQSVDDYAGESFMN (29)	1,89E+ 06	1,89 E-04	100

Ví dụ 10: sự tối ưu hóa MAB HFR M91 C2191

Các phương pháp được áp dụng để tối ưu hóa M91 (H31/L42) như được mô tả trong Ví dụ 8, trừ khi có quy định khác. Sự quét alanin/dòng mầm của CDR của C2191 được tiến hành trong định dạng Fab để đánh giá các vị trí quan trọng đối với sự tương tác với CD27, bằng cách sử dụng các vùng VH và VL gốc C2191 trong định dạng Fab với vùng hằng định Ch1 và Ck của người. Các thư viện thay thế các gốc trong CDR với alanin hoặc gốc có mặt trong trình tự dòng mầm tương ứng. Một số vị trí trong các CDR được loại trừ ra do chúng có sự tiếp xúc dung môi thấp hoặc không có sự tiếp xúc dung môi dựa trên việc tạo mô hình và sau đó dựa trên cấu trúc được xác định (Ví dụ 5). Đột biến soma giả định được làm đột biến ngược vào các axit amin dòng mầm của chuột để đánh giá sự đóng góp của chúng vào ái lực của kháng thể. Tóm lại, các vùng V của chuột được tách dòng vô tính thành vectơ biểu hiện pIX Fab và sự liên kết của gốc với protein ECD CD27 của người được biotinyl hóa được kiểm chứng bởi ELISA. Các đột biến đơn (theo thiết kế thư viện) được đưa vào bằng sự phát sinh đột biến trực tiếp vị trí, được tiến hành chủ yếu là như được mô tả bằng Stratagene (La Jolla, CA, USA). Các đột biến được xác nhận trình tự được chọn lọc theo màu anh đào vào các đĩa mới và sinh trưởng cùng với Fab gốc và các đối chứng Fab âm. Biến thể thay thế axit amin đơn cuối cùng được tạo ra trong

E. coli, và sau đó được sàng lọc về sự biểu hiện và liên kết với CD27 bằng ELISA. Sự biểu hiện và liên kết các tín hiệu đối với các dòng vô tính gốc được tính trung bình và đặt là 1,0 và các tín hiệu của đột biến được chuẩn hóa so với gốc. Hai dạng kháng nguyên được sử dụng trong ELISA: ECD CD27 (các gốc 1-173) và ECD CD27 - thể khảm Fc (R&D Systems).

Các kết quả quét này kết hợp với cấu trúc đồng tinh thể đưa ra cơ sở về sự thiết kế các thư viện thành thực ái lực. Đối với chuỗi nặng, các vị trí được chọn cho biến thể là T33 trong H-CDR1 và Y50, S52, S52a, N56 và Y58 trong CDR-H2 (Bảng 23). T33 không phải là gốc tiếp xúc nhưng đột biến T33A lại cải thiện liên kết. Các vị trí S52 và S52a không phải là các gốc tiếp xúc nhưng sự thay thế trong việc quét thể hiện một số liên kết tăng lên. Tyrosin ở các vị trí 50 và 58 là hai vị trí tiếp xúc và các thay thế ở các vị trí này được chọn trong quỹ đạo tối ưu hóa song song được mô tả trong Ví dụ 11. Vị trí N56 không được đánh giá trong việc quét alanin/dòng mầm nhưng nó là vị trí tiếp xúc và liên kết T33, S52, và S52a trong cấu trúc tinh thể. Đối với chuỗi nhẹ, các vị trí được chọn cho biến thể là T30a, S30b, G30c và Y30d trong CDR-L1 và L50 và N53 trong CDR-L2 (Bảng 23). Không có gốc nào trong số các gốc tiếp xúc trực tiếp kháng nguyên nhưng liên kết với các gốc tiếp xúc mà việc quét thể hiện có tác động hầu như là tiêu cực lên sự liên kết. Đột biến L50A có tác dụng vừa phải lên liên kết và, trong cấu trúc tinh thể, là gốc duy nhất trong CDR-L2 có thể tiếp xúc với kháng nguyên. Ngoài ra, N53 được chọn cho việc đa dạng hóa giới hạn. Hai thư viện song song được tạo cấu trúc, một thư viện có Y30d được đột biến với W, và thư viện còn lại với Y30d được giữ là Y, vì W có thể khiến cho paratop kỵ nước hơn và do đó ít phát triển được hơn. Các bảng 19 và 20 dưới đây thể hiện các thiết kế thư viện thành thực ái lực VH và VL đối với M91.

Bảng 19.

2191	HC_CDR1	HC_CDR2				
Kháng nguyên có tiếp	Không	Có	Không	Không	Có	Có

xúc hay không?						
Vị trí trong HC (SEQ ID NO: 131)	T33	Y50	S52	S52a	N56	Y58
Vị trí trong HC (SEQ ID NO: 131)	T33	Y50	S52	S53	N57	Y59
Sự đa dạng trình tự	Tất cả 20 axit amin	Y	Tất cả 20 axit amin	Tất cả 20 axit amin	Tất cả 20 axit amin	Y
		A				I
		W				L
		H				W

Bảng 20.

2191	LC_CDR1				LC_CDR2	
Kháng nguyên tiếp xúc	Không	Không	Không	Có	Có	No
Vị trí trong LC (SEQ ID NO: 140)	T30a	S30b	G30c	Y30d	L50	N53
Vị trí trong LC (SEQ ID	T31	S32	G33	Y34	L54	N57

NO: 140)						
Sự đa dạng trình tự	Tất cả 20 axit amin	Tất cả 20 axit amin	G	Y*	Tất cả 20 axit amin	N
			R	W*		K
						R

* Hai thư viện riêng rẽ chứa Y hoặc W ở vị trí này được tạo ra

Các thư viện Fab được biểu hiện trên protein bọc thực khuẩn thể IX được phân tích kháng ECD-CD27 được biotinyl hóa. Tổng 12 biến thể chuỗi nặng và 12 biến thể chuỗi nhẹ được chọn mà liên kết với CD27 bằng hoặc tốt hơn so với Fab thể khảm gốc của C2191. Các biến thể được chuyển hóa thành các kháng thể IgG1/kapa, được sản sinh trong các tế bào HEK293E là 144 tổ hợp, và các phần dịch nổi nuôi cấy được đánh giá về sự liên kết bằng ProteOn. Việc tăng đáng kể (>100 lần) ái lực được quan sát đối với một số biến thể. Trong 144 cặp VH và VL, 8 cặp được chọn để mô tả thêm (Bảng 21). Các mAb này được phân loại thành ba nhóm phụ: Các biến thể nhóm 1 có cùng chuỗi nặng (H227, SEQ ID NO: 133) được ghép cặp với bốn chuỗi nhẹ khác nhau, trong khi nhóm 2 và nhóm 3, mỗi nhóm có một chuỗi nhẹ được ghép cặp với hai chuỗi nặng khác nhau. Bốn chuỗi nhẹ được chọn được thay đổi ở tất cả bốn vị trí được đa dạng hóa trong CDR-L1 (RASKSVSX₁X₂X₃X₄SFMH) (SEQ ID NO: 158); mà X₁ là A, E, H, hoặc L; X₂ là D, G, V, hoặc W; X₃ là G hoặc R; và X₄ là W hoặc Y). Chúng cũng được thay đổi trong cả hai vị trí được đa dạng hóa trong CDR-L2 (X₁ASX₂LES) (SEQ ID NO:171); mà X₁ là L hoặc V; và X₂ là K, N, hoặc R). CDR-L3 không được thay đổi từ trình tự L42 (SEQ ID NO: 140) và là QHSRELPWT.

Bảng 21. Việc ghép cặp các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các đầu được thành thực ái lực của 2191 được chọn

Kháng thể ID	Peptit chuỗi nhẹ ID	CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	Peptit chuỗi nặng ID	CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)
M427	C27L244	RASKSVSAWGYFSM H (60)	VASRLS (68)	C27H227	GFTFSSYGMS (44)	YIDEGGGQTIYPDSVK G (47)
M429	C27L245	RASKSVSHVRWSF	LASKLE	C27H227	GFTFSSYGMS	YIDEGGGQTIYPDSVK

		MH (61)	S (69)		(44)	G (47)
M488	C27L249	RASKSVSEGRWSFM H (62)	VASRL S (68)	C27H227	GFTFSSYGMS (44)	YIDEGGGQTIYPDSVK G (47)
M489	C27L250	RASKSVSLDRWSFM H (63)	LASNLE S (67)	C27H227	GFTFSSYGMS (44)	YIDEGGGQTIYPDSVK G (47)
M492	C27L249	RASKSVSEGRWSFM H (62)	VASRL S (68)	C27H228	GFTFSSYSMS (45)	YIDAGGGFTIYPDSVK G (48)
M493	C27L250	RASKSVSLDRWSFM H (63)	LASNLE S (67)	C27H228	GFTFSSYSMS (45)	YIDAGGGFTIYPDSVK G (48)
M501	C27L250	RASKSVSLDRWSFM H (63)	LASNLE S (67)	C27H231	GFTFSSYSMS (45)	HIDAGGGRTWYPDSV KG (49)
M526	C27L249	RASKSVSEGRWSFM H (62)	VASRL S (68)	C27H222	GFTFSSYGMS (44)	YIDRGGGVTIYPDSVK G (50)

Tám biến thể này được sản sinh bằng cách biểu hiện tạm thời trong các tế bào HEK293E trong thể tích là 750ml. Các phân dịch nổi thu gom được được tinh sạch thông qua sắc ký Protein A, và mỗi biến thể được phân tích bằng SDS-PAGE và SE-HPLC để xác định độ tinh khiết của mẫu và phần trăm monome trong mẫu được tinh sạch. Tất cả các biến thể có độ tinh khiết lớn hơn 90% và tính monome lớn hơn 90%. Để đánh giá các tính chất kết hợp của các kháng thể, nhân tố duy trì (k') được xác định bằng cách tiến hành sắc ký tương tác chéo đối với từng biến thể được tinh sạch (Jacobs SA, Wu SJ, Feng Y, Bethea D & O'Neil KT (2010) Cross-interaction chromatography: a rapid method to identify highly soluble monoclonal antibody candidates. *Pharm Res* 27, 65-71). Trong phương pháp này, các kháng thể mẫu được cho đi qua cột được ghép cặp với IgG của người và đánh giá về tính duy trì so với các kháng thể đối chứng. Tóm lại, 50mg IgG của người (Sigma Aldrich) được ghép cặp với cột NHS-Sepharosa 1mL (GE Healthcare) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Loại bỏ IgG không được ghép cặp bằng cách rửa với Tris 0,1M, độ pH = 8, NaCl 0,5M và các NHS không phản ứng được phong bế với chất đệm tương tự. Tính hiệu quả ghép cặp được xác định bằng cách đo nồng độ protein còn lại trong chất đệm ghép cặp không được phản ứng và rửa bằng cách sử dụng kit thử nghiệm Kit Pierce's Coomassie Plus (Thermo Pierce) và loại trừ từ lượng protein trước khi cố định. Cột đối chứng cũng được chuẩn bị bằng cách sử dụng cùng phương pháp nhưng không có sự kết hợp của IgG với nhựa. Cột đối chứng trước tiên được chạy trên Dionex UltiMate 3000 HPLC sau khi được làm cân bằng với PBS, độ pH = 7 ở

tốc độ chảy là 0,1mL/phút. 20 μ L dung dịch protein gốc trước tiên được tiêm vào để đảm bảo các vị trí không liên kết đặc hiệu được phong bế sau đó là 20 μ L axeton 10% để kiểm tra tính nguyên vẹn của cột. Các mẫu được phân tích được pha loãng với 0,1mg/mL trong PBS, độ pH = 7. 20 μ L mỗi mẫu được tiêm lên trên từng cột và cho phép chạy với 0,1mL/phút trong 30 phút. Số lần duy trì được ghi lại và nhân tố duy trì (k') được tính đối với mỗi biến thể. Trị số k' được tính làm sự chênh lệch về số lần duy trì trên IgG và các cột trống. Tất cả các biến thể được tinh sạch có độ tinh khiết lớn hơn 90% dựa trên SDS-PAGE và SE-HPLC. Tất cả các trị số k' được tính để nhỏ hơn 0,3, chỉ ra các tính chất dung dịch tốt (Bảng 22).

Bảng 22. Phép phân tích theo mẻ các biến thể được thành thực ái lực được tinh sạch

Kháng thể ID	IHC	LC	Nồng độ (mg/ml)	Tổng Protein	% Monome	Gel	k'
M427	H227	L244	1,42	15,63	100	Ok	0,02
M429	H227	L245	0,97	10,21	100	Ok	0,07
M488	H227	L249	2,00	27,06	98,9	Ok	0,07
M489	H227	L250	1,59	23,03	100	Ok	0,17
M492	H228	L249	2,07	27,96	97,4	Ok	0,25
M493	H228	L250	0,58	8,12	100	Ok	0,24
M501	H231	L250	2,01	26,08	100	Ok	0,28
M526	H222	L249	0,90	10,74	100	Ok	0,10

Tám biến thể mAb và gốc HFR được đánh giá về ái lực của chúng với ECD CD27 bằng BIAcore và IC_{50} của chúng trong thử nghiệm gen thông báo $\kappa\beta$. Các hằng số động học và ái lực được đo bằng BIAcore. Bảng 23 tóm tắt các dữ liệu thu được từ các biến thể này. Sự biểu hiện và tín hiệu ELISA về sự liên kết với CD27 được đo từ các phần dịch nổi nuôi cấy nhỏ ban đầu cũng bao gồm trong bảng này.

Bảng 23: tóm tắt dữ liệu tập hợp con của thư viện C2191 AM

Protein ID	Sự biểu hiện (ug/ml)	Tín hiệu ELISA	NF κ B IC_{50} (pM)	k_a	k_d	K_D (pM)
M41	n,d,	n,d,	45	6,20E+05	8,44E-03	13650
M427	14,6	0,93	19	7,18E+05	3,00E-05	41,7
M429	16,1	0,86	42	6,62E+05	2,02E-05	30,4

M488	20,7	0,92	23	1,01E+06	3,96E-05	39,4
M489	24,2	0,96	41	9,06E+05	2,18E-05	24,1
M492	20,1	0,77	15	1,03E+06	1,47E-04	142,0
M493	24,5	0,85	14	7,23E+05	1,05E-04	145,0
M501	30,9	0,77	4	8,31E+05	6,16E-05	74,2
M526	14,3	0,69	6	1,00E+06	1,71E-04	171,0

Ví dụ 11: HFR được kết hợp và sự tối ưu hóa của mAb C2191

Theo cách tiếp cận này, việc đặt giới hạn các biến thể HFR được đánh giá trong định dạng Fab về biểu hiện, biểu hiện pIX và sự liên kết và các lựa chọn tốt nhất sau đó được đưa lên tối ưu hóa. Các CDR từ C2191 được thích ứng với khung của người vào hai chuỗi nặng (VH3-23 và VH3-11) và hai chuỗi nhẹ (Vk4-1 và Vk012). Các miền biến đổi HFA này được ghép cặp với nhau trong ma trận 2x2 làm Fab với vùng hằng định CH1 và Ck của người trong vectơ biểu hiện thực khuẩn thể pIX Fab. Biến thể VH3-23/Vk012 (H39 (SEQ ID NO: 145)) và L40 (SEQ ID NO: 137) thể hiện sự liên kết với CD27 và các đặc tính biểu hiện tốt và được chọn để tạo cấu trúc các thư viện thành thực ái lực. Fab được ưu tiên như là “gốc.”

Để chọn các kháng thể với ái lực được cải thiện, nhiều gốc trong số tất cả CDR ngoại trừ CDR-H3 của H39 được đa dạng hóa hoàn toàn bằng cách sử dụng codon suy biến NNK (Bảng 24). Mỗi thư viện CDR được tạo cấu trúc riêng rẽ và được đem sàng lọc thực khuẩn thể để chọn các biến thể được thành thực ái lực.

Bảng 24: Thiết kế thư viện thành thực ái lực đối với các biến thể C2191

CDR của VH	axit amin gốc và vị trí
CDR-H2	Y50
	S52
	S53
	N56
	Y58
CDR-H3	H95
	R96
	G97
	N98

	P99
CDR của VL	axit amin gốc và vị trí
CDR-L1	T30a
	S30b
	G30c
	Y30d
	F32
CDR-L2	L50
	A51
	S52
	N53
	L54
	E55
	S56
CDR-L3	H90
	R92
	E93
	L94
	Y96

Các thư viện C2191 với sự đa dạng trong CDR-H2, CDR-L1 hoặc CDR-L2 thu được 50 Fab độc nhất với sự liên kết được cải thiện với CD27 của người so với Fab HFR gốc như được đo trong ELISA một điểm. Các dòng vô tính này còn được xếp hạng trong ELISA nhiều điểm và mười bảy dòng vô tính được chọn để chuyển hóa thành IgG4alaala/kapa của người để mô tả thêm (Bảng 25).

Bảng 25: Fab được thành thực ái lực được chọn để chuyển hóa thành IgG

Fab ID	Peptit HC ID	Peptit LC ID	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)
Gốc	H39	L40	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F116	H39	L59	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGNRLD (70)
F119	H39	L62	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGDRRQE (71)
F178	H145	L40	YISGGGGQTLYPDSVKG (54)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F18	H40	L40	AIDHGGGRYYPDSVKG	RASKSVSTSGYSFMH	LASNLES

			(51)	(59)	(67)
F19	H41	L40	AIDHGGGRTWYPDSVKG (52)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F243	H39	L124	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGSMAF (72)
F250	H39	L131	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGDRANW (73)
F256	H39	L137	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGSRLDY (74)
F279	H39	L160	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSYVRWSFMH (64)	LASNLES (67)
F291	H39	L172	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSHIRWSFMH (65)	LASNLES (67)
F292	H39	L173	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSHVRWSFMH (61)	LASNLES (67)
F295	H39	L176	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VADRVEV (173)
F297	H190	L40	TIDRGGGSTWYPDSVKG (55)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F298	H191	L40	AIDGGGGATYYPDSVKG (56)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F299	H192	L40	VIDHGGGSTHYYPDSVKG (57)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)
F302	H39	L179	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	RASKSVSLIRWSFMH (172)	LASNLES (67)
F57	H79	L40	AIDHGGGQTLYPDSVKG (53)	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)

Các mAb IgG1/k được tạo cấu trúc làm các bản sao của Fab và là ma trận của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (Bảng 26) và được thử nghiệm về ái lực và các tính chất hòa tan. Dạng mAb của Fab gốc là M131 được biểu hiện. M141 và M408 được chọn để mô tả thêm.

Bảng 26: mAb thu được từ việc thành thực ái lực Fab

Fab ID	mAb ID	Peptit H & L ID
Gốc	M131	H39, L40
F18	M132	H40, L40
F57	M133	H79, L40

F298	M134	H191, L40
F299	M135	H192, L40
F292	M136	H39, L173
F279	M137	H39, L160
F256	M138	H39, L137
Tổ hợp	M139	C27H40, L173
Tổ hợp	M140	C27H40, L160
Tổ hợp	M141	C27H79, L173
Tổ hợp	M142	C27H79, L160
Tổ hợp	M143	C27H191, L160
Tổ hợp	M144	C27H191, L173
Tổ hợp	M145	C27H192, L173
Tổ hợp	M146	H192, L160
Tổ hợp	M408	H192, L137

Ví dụ 12: Mô tả các mAb được thành thực ái lực

Các mAb được thành thực ái lực được chọn thu được từ các kháng thể của tế bào lai C2177 và C2191 gốc được tối ưu hóa codon, được đưa vào vectơ khác biệt để biểu hiện kép chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, được biểu hiện trong canh trường tế bào CHO-GS, và được tinh sạch để mô tả thêm. Các ID của các kháng thể này liên quan đến các biến thể được thành thực được mô tả trong các ví dụ trên được thể hiện trong Bảng 27.

Bảng 27.

Gốc	ADN ID	Gen đơn ADN ID	Peptit LC ID	Peptit HC ID
C2191	M429	M696	C27L245	C27H227
C2191	M492	M695	C27L249	C27H228
C2191	M488	M694	C27L249	C27H227
C2191	M141	M707	C27H79	C27L173
C2191	M408	M708	C27H192	C27L137
C2177	M703	M709	C27H270	C27L267
C2177	M706	M710	C27H272	C27L267

C2177	M671	M711	C27H258	C27L266
C2177	M668	M713	C27H255	C27L266

Dữ liệu tóm tắt đối với các mAb này được thể hiện dưới đây để phân tích K_D bằng Biacore và IC_{50} được đo trong thử nghiệm gen thông báo NF- κB (Bảng 28 và 29). Đối với thử nghiệm gen thông báo NF- κB này, các tế bào HEK-293F được chuyển nhiễm với tổng số 36ng ADN chứa cả CD27 của người và các cấu trúc luxiferaza, dưới sự kiểm soát của gen thúc đẩy NF- κB . Các thể chuyển nhiễm HEK-293F được đặt trong đĩa 5×10^4 tế bào cho mỗi lỗ trong 40 μ L môi trường Freestyle (Gibco) trong các đĩa 96 lỗ. Các phân pha loãng các mAb của tế bào lai kháng CD27 được bổ sung vào đĩa thử nghiệm trong môi trường Freestyle ở nồng độ cuối cùng là 50 μ g/mL với phân pha loãng theo tỷ lệ 1:3 và các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C (CO₂ 5%) trong một giờ. Để thử nghiệm về khả năng trung hòa tín hiệu CD70:CD27 của mAb, các tế bào episom CD70 HEK-293E đã được bức xạ (4000 rad) được bổ sung ở 20% số lượng các tế bào chuyển nhiễm CD27 vào đĩa thử nghiệm. Để thử nghiệm hoạt tính chủ vận của mAb của các tế bào lai, việc bổ sung các tế bào episom CD70 được bỏ qua. Các đĩa thử nghiệm được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C (CO₂ 5%) và được hiện màu bằng cách sử dụng hệ thử nghiệm Steady-Glo® Luciferase (Promega) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 28. Mô tả các biến thể được thành thực thu được từ C2191

mAb	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	Thử nghiệm IC_{50} NF- κB (pM)
Thể khảm gốc C2191 (M41)	4,35E+05	0,0103	23678	2300
M694	4,80E+05	7,60E-05	105	420
M695	5,10E+05	1,70E-04	202	250
M696	3,70E+05	2,1E-05	57	330

M707	5,85E+05	1,24E-04	213	260
M708	6,430E+05	2,25E-04	350	260

Bảng 29. Mô tả các biến thể được thành thực thu được từ C2177

mAb	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	Thử nghiệm IC_{50} NF- κB (pM)
Thế khảm gốc C2177 (M40)	1,06E+06	1,32E-03	1240	466
M709	2,30E+06	5,89E-05	26	272
M710	2,55E+06	4,88E-05	19	320
M711	1,97E+05	5,82E-05	30	258
M713	2,06E+05	1,16E-05	56	296

Các trình tự vùng CDR và V

Bảng 30. 2177 đường dẫn 1

VH		CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-H3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
H7	M40 gốc	SSWMN (1)	RIYPGDGDTNYNGKFK G (3)	SDYYGDYGFAY (23)
		CDR-H1 được kéo dài	Kabat-7 (+2 các gốc HFR để thể hiện các đột biến PMT)	Kabat
H28	HFR(M69)	GYAFSSSWM N (2)	RIYPGDGDTNYS (4)	SDYYGDYGFAY (23)
H236		GYAFSSSWM N(2)	RIYPGDGDTNYS	ADYYGDYGF GY (162)
H237		GYAFSSSWM N(2)	RIFVRDGTNYS (5)	SDYYGDYGFAY (23)
H238		GYAFSSSWM N(2)	RIYVGDTNYS (6)	SDYYGDYGFAY (23)
H239	M596, M600	GYAFSSSWM N(2)	RIYAGDTNYS (7)	SDYYGDYGFAY (23)

H240		GYAFSSSWM N(2)	RIYARDGDTNYS (8)	SDYYGDYGF A Y (23)
H241		GYAFSSSWM N(2)	RIYGRDGDTNYS (9)	SDYYGDYGF A Y (23)
H242		GYAFSSSWM N(2)	RIYANDGDTNYS (10)	SDYYGDYGF A Y (23)
H243		GYAFSSSWM N(2)	RIYGGDGDTNYS (11)	SDYYGDYGF A Y (23)
H244		GYAFSSSWM N(2)	RIYSGDGDTNYS (12)	SDYYGDYGF A Y (23)
H245		GYAFSSSWM N(2)	RIYSRDGDTNYS (13)	SDYYGDYGF A Y (23)
H259	M678	GYAFSSSWM N(2)	RIYAGDGDTAYS (14)	SDYYGDYGF A Y (23)
H260	M680	GYAFSSSWM N(2)	RIYAGDGDTNYA (15)	SDYYGDYGF A Y (23)
H270	M703=M709	GYAFSSSWM N(2)	RIYAGDADTAYS (16)	SDYYGDYGF A Y (23)
H272	M706=M710	GYAFSSSWM N(2)	RIYAGDADTNYA (17)	SDYYGDYGF A Y (23)
			RIX ₁ X ₂ X ₃ DX ₄ DTX ₅ YX ₆ (151)	

Đối với SEQ ID NO:151, X₁ là F hoặc Y; X₂ là A, G, S, hoặc V; X₃ là G, N, hoặc R;
X₄ là A hoặc G; X₅ là A hoặc N; và X₆ là A hoặc S

Bảng 31. 2177 đường dẫn 2

VH		CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-H3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
H7	M40 gốc	SSWMN (1)	RIYPGDGDTNYNGKFK G (3)	SDYYGDYGF A Y (23)
		CDR-H1 được kéo dài	Kabat-7 (phần còn lại của CDR là giống như ở chuột và HFR)	Kabat
H24	HFR(M50)	GYAFSSSWMN (2)	RIYPGDGDTNYNGKFK G (18)	SDYYGDYGF A Y (23)
H221	M169, M170, M171	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDGDTNYNGKFK G (19)	SDYYGDYGF A Y (23)
H257	M670	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDADTNYA Q KFK G (20)	SDYYGDYGF A Y (23)
H258	M671=M711	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDADTNYN Q KFK G (21)	SDYYGDYGF A Y (23)
H25	HFR (M55);	GYAFSSSWMN	RIYPGDGDTNYNGKFK	SDYYGDYGF

	M149-156; M159	(2)	G (18)	Y (23)
H196	M158; M160- 167	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDGD TN YNGKFK G (19)	SDYYGDYGF A Y (23)
H255	M668=M713; M672;	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDAD TN Y A QKFK G (20)	SDYYGDYGF A Y (23)
H256	M669; M673	GYAFSSSWMN (2)	RIYSGDAD TN Y N QKFK G (21)	SDYYGDYGF A Y (23)
H197	M157	GYAFSSSWMN (2)	RIY QGDGD TN YNGKFK G (22)	SDYYGDYGF A Y (23)
			RIYX ₁ GDX ₂ DTNYX ₃ X ₄ K FKG (152)	

Đối với SEQ ID NO:152, X₁ là P, Q, hoặc S; X₂ là A hoặc G; X₃ là A hoặc N; X₄ là G hoặc Q.

Bảng 32. 2177 đường dẫn 1

VL		CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	CDR-L3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
L18	M40 gốc chuột	KASQSVDYAGD SYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L35	HFR (M69)	KASQSVDYAGD SYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L255	M600; M678; M680	KASQSVDYAGD SFMN (25)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L256		KASQSVDYAGD SWMN (26)	VASNLES (38)	QQSNEDPYT (41)
L257	M596	KASQSVDYAGD SWMN (26)	TASNLES (39)	QQSNEDPYT (41)
L258		KASQSVDYAGS SFMN (27)	TASNLES (39)	QQSNEDPYT (41)
L260		KASQSVDWAG HSWMN (28)	TASNLES (39)	QQSNEDPYT (41)
L261		KASQSVDYAGS SFMN (27)	EASNLES (40)	QQSNEDPYT (41)

L267	M703=M70; M706=M710	KASQSVDYAGE SFMN (29)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
		KASQSVDX ₁ AG X ₂ SX ₃ MN (153)	X ₁ ASNLES (154)	

Đối với SEQ ID NO:153, X₁ là W hoặc Y; X₂ là D, E, S hoặc H; X₃ là F, W, hoặc Y.

Đối với SEQ ID NO:154, X₁ là A, E, T, hoặc V;

Bảng 33. 2177 đường dẫn 2

VL		CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	CDR-L3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
L18	M40 gốc chuột	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L36	HFR (M55; M50)	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L216	M156; M167	KASQSVDYFSES YMN (30)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L217	M155; M166; M170; M672; M673	KASQSVDYAHESFMN (31)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L218	M150; M161	KASQSVDYFGDSL MN (32)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L219	M149; M160; M169	KASQSVDYAGDSFMN (25)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L266	M668=M713; M669; M670; M671=M711;	KASQSVDYAGESFMN (31)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L220	M157; M171; M158; M159	KASQSVDYAGDSYMN (24)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L221	M154	KASQSVDYFRTSFMN (33)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L222	M153	KASQSVDYVGTSFMN (34)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L223	M152; M163	KASQSVDYWSDSFMN (35)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)
L224	M151; M162	KASQSVDYYNSSFMN (36)	AASNLES (37)	QQSNEDPYT (41)

		KASQSVDYX ₁ X ₂ X ₃ MSX ₄ MN (155)		
--	--	---	--	--

Đối với SEQ ID NO:155, X₁ là A, F, V, W hoặc Y; X₂ là G, H, N, R, hoặc S; X₃ là D, E, S, hoặc T; X₄ là F, L, hoặc Y.

Bảng 34. 2191 đường dẫn 1

VH		CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-H3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
H10	M41 mẹ	SYTMS (42)	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	HRGNPFDY (58)
		CDR-H1 được kéo dài	Kabat	Kabat
H31	HFR (M91)	GFTFSSYTMS (43)	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	HRGNPFDY (58)
H227	M427, M429=M696; M488=M694; M489	GFTFSSYGMS (44)	YIDEGGGQTIYPDSVKG (47)	HRGNPFDY (58)
H228	M492=M695; M493	GFTFSSYSMS (45)	YIDAGGGFTIYPDSVKG (48)	HRGNPFDY (58)
H231	M501	GFTFSSYSMS (45)	HIDAGGGRTWYPDSVKG (49)	HRGNPFDY (58)
H222	M526	GFTFSSYGMS (44)	YIDRGGGVTIYPDSVKG (50)	HRGNPFDY (58)
H227	CDR-H1 được xác định bằng Kabat	SYGMS (161)		
			X ₁ IX ₂ X ₃ GGGX ₄ TX ₅ YPDSVKG (156)	

Đối với SEQ ID NO: 156, X₁ là H hoặc Y; X₂ là D hoặc S; X₃ là A, E, R, hoặc S; và

X₄ là I, W, hoặc Y.

Bảng 35. 2191 đường dẫn 2

VH		CDR-H1 (SEQ ID NO:)	CDR-H2 (SEQ ID NO:)	CDR-H3 (SEQ ID NO:s)
		Kabat	Kabat	Kabat
H10	M41 mẹ	SYTMS (42)	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	HRGNPFDY (58)
		CDR-H1 được kéo dài	Kabat	Kabat
H39	HFR ; M131; M136-138	GFTFSSYTMS (43)	YISSGGGNTYYPDSVKG (46)	HRGNPFDY (58)
H40	M132; M139; M140	GFTFSSYTMS (43)	AIDHGGGRTYYPDSVKG (51)	HRGNPFDY (58)
H41		GFTFSSYTMS (43)	AIDHGGGRTWYPDSVKG (52)	HRGNPFDY (58)
H79	M133; M141=M707; M142	GFTFSSYTMS (43)	AIDHGGGQTLYPDSVKG (53)	HRGNPFDY (58)
H145		GFTFSSYTMS (43)	YISGGGGQTLYPDSVKG (54)	HRGNPFDY (58)
H190		GFTFSSYTMS (43)	TIDRGGGSTWYPDSVKG (55)	HRGNPFDY (58)
H191	M134; M143; M144;	GFTFSSYTMS (43)	AIDGGGGATYYPDSVKG (56)	HRGNPFDY (58)
H192	M135; M145; M146; M408=M708	GFTFSSYTMS (43)	VIDHGGGSTHYPDSVKG (57)	HRGNPFDY (58)
			X₁IX₂X₃GGGX₄TX₅YPDSVKG (157)	

Đối với SEQ ID NO:157, X₁ là A, T, V, hoặc Y; X₂ là D hoặc S; X₃ là G, H, R, hoặc

S; X₄ là A, N, Q, R, hoặc S; và X₅ là H, L, W, hoặc Y.

Bảng 36. 2191 đường dẫn 1

VL		CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	CDR-L3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
L20	Chuột mẹ M41	RASKSVSTSGYSF MH (59)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
L42	HFR (M91)	RASKSVSTSGYSF MH (59)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
L244	M427	RASKSVSAWGYSF MH (60)	VASRLS (68)	QHSRELPWT (75)
L245	M429=M696	RASKSVSHVRWSF MH (61)	LASKLES (69)	QHSRELPWT (75)
L249	M488=M694; M492=M695; M526	RASKSVSEGRWSF MH (62)	VASRLS (68)	QHSRELPWT (75)
L250	M489; M493; M501	RASKSVSLDRWSF MH (63)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
		RASKSVSX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ SFMH (158)		

Đối với SEQ ID NO:158, X₁ là A, E, H, L, T, hoặc Y; X₂ là D, G, I, S, V, hoặc W; X₃ là G hoặc R; và X₄ là W hoặc Y.

Bảng 37. 2191 đường dẫn 2

VL		CDR-L1 (SEQ ID NO:)	CDR-L2 (SEQ ID NO:)	CDR-L3 (SEQ ID NO:)
		Kabat	Kabat	Kabat
L20	M41 gốc chuột	RASKSVSTSGYSFMH (59)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
L59		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGNRLD (70)	QHSRELPWT (75)

L62		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGDRRQE (71)	QHSRELPWT (75)
L124		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGSRMAF (72)	QHSRELPWT (75)
L131		RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGDRANW (73)	QHSRELPWT (75)
L137	M138; M408=M708	RASKSVSTSGYSFMH (59)	VGSRLDY (74)	QHSRELPWT (75)
L160	M137; M160; M142; M143; M146	RASKSVSYVRWSFMH (64)	LASNLES (67)	QHSRELPWT (75)
L172		RASKSVSHIRWSFMH (65)	LASNLES	QHSRELPWT (75)
L173	M136; M139; M141=M707; M144; M145	RASKSVSHVRWSFMH (66)	LASNLES	QHSRELPWT (75)

Các trình tự vùng biến đổi Protein và kháng thể

Bảng 38.

SEQ ID NO:	Dòng vô tính	Trình tự (các trình tự CDR được gạch chân)	Các dấu hiệu hoặc nguồn gốc	Chú thích
174	ECD CD27 của người	TPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGT FLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDH HTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAE CACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTA RSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAG HMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRS LCS SDFIRILHHHHHH	ECD: 1-173, His6	
175	ECD được cắt CD27 của	TPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGT FLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDH HTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAE	ECD: 1-121, điểm phân chia, His6	

	người	CACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTA RSSQALSPHPQLEVLFGGPHHHHHH		
176	ECD được cắt cụt CD27 của người	TPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGT FLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDH HTRPHCESCRHCNSGLLVNCTITANAE CACRNGWQCRDKECTECDGGHHHH	ECD:1-101	Proteo
150	ECD CD70 của người	MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRALVPLVA GLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWD VAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGR SFLHGPELDKGGQLRIHRDGIYMVHIQVT LAICSSTASRHHPTTLAVGICSPASRSIS LLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTN LTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP	ECD	
76	Vùng biển đổi chuỗi nặng (HC) C2186	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGY <u>TFTNYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIHPS</u> <u>DSETHYNQNFKSKATLTVDKSSSTAYIQ</u> <u>LSSLTSEDSAVYYCARPVLYGDYGFPCW</u> GQGTLVTVSA		Chuột
77	Vùng biển đổi chuỗi nhẹ (LC) C2186	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSV <u>DYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAAS</u> <u>NLESGIPARFSGSGGTDFTLNIHPVEEE</u> DAATYYCQQSNEPDYTFGGGTKLEIK		Chuột
78	Vùng biển đổi chuỗi nặng (HC) C2192	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYA <u>FSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGD</u> <u>GDTNYNGKFKGKATLTADK</u> SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRWDG <u>GNYYFDYWGQGTTTLTVSS</u>		Chuột
79	Vùng biển đổi chuỗi nhẹ (LC)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCMASQD <u>VGTAVAWYQRRPGQSPKLLIYWTSTRH</u> <u>TGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLA</u>		Chuột

	C2192	DYFC <u>QQYSSYPLTF</u> SGGTKLEIK		
80	Vùng biển đổi chuỗi nặng (HC) C2177	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYA FSSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGD <u>GDTNYNGKFKG</u> KATLTADKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYFCARSDYYGDYGFAY WGQGTLLTVSA	H7	Chuột
81	Vùng biển đổi chuỗi nhẹ (LC) C2177	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSV <u>DYAGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAAS</u> <u>NLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEE</u> DAATYYC <u>QQSNEDPYTF</u> GGGTKLEIK	L18	Chuột
82	L35	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQS <u>VDYAGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYA</u> <u>ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ</u> AEDVAVYYC <u>QQSNEDPYTF</u> GQGTKLEI K	4-1/2	HFR được chọn cho C2177 AM, đường dẫn 1
83	L255	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQS <u>VDYAGDSFMNWYQQKPGQPPKLLIYAA</u> <u>SNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA</u> EDVAVYYC <u>QQSNEDPYTF</u> GQGTKLEIK		VL trong các dòng vô tính M584, M600 AM; trong các biến thể M678, M680 PTM
84	L256	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQS <u>VDYAGDSWMNWYQQKPGQPPKLLIYV</u> <u>ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ</u> AEDVAVYYC <u>QQSNEDPYTF</u> GQGTKLEI K		sự thành thực ái lực C2177 đường dẫn 1

85	L257	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQS</u> <u>VDYAGDSWMN</u> WYQQKPGQPPKLLIYT <u>ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLL AEDVAVYYC <u>QQSNEDPYTFGQGTKLEI</u> K		VL trong các dòng vô tính M558, M596 AM
86	L258	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQS</u> <u>VDYAGSSFMN</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>TA</u> <u>SNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQA EDVAVYYC <u>QQSNEDPYTFGQGTKLEIK</u>		sự thành thực ái lực C2177 đường dẫn 1
87	L260	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQS</u> <u>VDWAGHSWMN</u> WYQQKPGQPPKLLIYT <u>ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQ AEDVAVYYC <u>QQSNEDPYTFGQGTKLEI</u> K		sự thành thực ái lực C2177 đường dẫn 1
88	L261	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQS</u> <u>VDYAGSSFMN</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>EA</u> <u>SNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQA EDVAVYYC <u>QQSNEDPYTFGQGTKLEIK</u>		sự thành thực ái lực C2177 đường dẫn 1
89	L267	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQS</u> <u>VDYAGESFMN</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>AA</u> <u>SNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQA EDVAVYYC <u>QQSNEDPYTFGQGTKLEIK</u>		VL trong các biến thể M703, M706 PTM
90	L36	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV</u> <u>DYAGDSYMN</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>AA</u> <u>SNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQPE DFATYYC <u>QQSNEDPYTFGQGTKLEIK</u>	O12/2	HFR được chọn cho C2177 AM, đường dẫn 2

91	L216	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV <u>DYFSESYM</u> NWYQQKPGKAPKLLIYAAS <u>NLESGVPSR</u> FSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYC <u>QQSNEDPY</u> TFGQGTKVEIK		C2177 AM, đường dẫn 2
92	L217	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV <u>DYAHESFM</u> NWYQQKPGKAPKLLIYAAS <u>NLESGVPSR</u> FSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYC <u>QQSNEDPY</u> TFGQGTKVEIK		VL trong dòng vô tính M166 AM
93	L218	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV <u>DYFGDSL</u> MNWYQQKPGKAPKLLIYAAS <u>NLESGVPSR</u> FSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYC <u>QQSNEDPY</u> TFGQGTKVEIK		C2177 AM, đường dẫn 2
94	L219	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV <u>DYAGDSFM</u> NWYQQKPGKAPKLLIYAAS <u>NLESGVPSR</u> FSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYC <u>QQSNEDPY</u> TFGQGTKVEIK		VL trong các dòng vô tính M160, M169 AM
95	L219 PTM	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV <u>DYAGESFM</u> NWYQQKPGKAPKLLIYAAS <u>NLESGVPSR</u> FSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYC <u>QQSNEDPY</u> TFGQGTKVEIK		VL trong các biến thể M668, M669, M670, M671 PTM
96	L266	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV <u>DYAGeSFM</u> NWYQQKPGKAPKLLIYAAS <u>NLESGVPSR</u> FSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYC <u>QQSNEDPY</u> TFGQGTKVEIK		VL trong các biến thể M668, M669, M670, M671 PTM

97	L220	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV</u> <u>DYAGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAA</u> <u>SNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE</u> <u>DFATYYCQQSNEDPYTFGQGTKVEIK</u>		VL trong dòng vô tính M158 AM
98	L221	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV</u> <u>DYFRTSFMNWYQQKPGKAPKLLIYAAS</u> <u>NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED</u> <u>FATYYCQQSNEDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM, đường dẫn 2
99	L222	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV</u> <u>DYVGTSFMNWYQQKPGKAPKLLIYAAS</u> <u>NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED</u> <u>FATYYCQQSNEDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM, đường dẫn 2
100	L223	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSV</u> <u>DYWSDSFMNWYQQKPGKAPKLLIYAAS</u> <u>NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED</u> <u>FATYYCQQSNEDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM, đường dẫn 2
101	L224	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVAITCKASQSV</u> <u>DYYNSSFMNWYQQKPGKAPKLLIYAAS</u> <u>NLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED</u> <u>FATYYCQQSNEDPYTFGQGTKVEIK</u>		C2177 AM, đường dẫn 2
102	H24	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA</u> <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYPG</u> <u>DGDTNYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQ</u> <u>WSSLKASDTAMYICARSDYYGDYGFA</u> <u>YWGQGTLLTVSS</u>	IGHV5-51/4	HFR được chọn cho C2177 AM, đường dẫn 2
103	H221	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA</u> <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSG</u> <u>DGDTNYNGKFKGQVTISADKSISTAYLQ</u> <u>WSSLKASDTAMYICARSDYYGDYGFA</u> <u>YWGQGTLLTVSS</u>		VH trong các dòng vô tính M169 AM

104	H257	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSG</u> DaDTNYaqKFKGQVTISADKSISTAYLQW SSLKASDTAMYCARSDYYGDYGFAY WGQGTLVTVSS		VH trong biển thể M670 PTM
105	H258	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSG</u> DADTNYNQKFKGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYCARSDYYGDYGFA YWGQGTLVTVSS		VH trong biển thể M671 PTM
106	H25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>AFSSSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYP</u> GDGDTNYNGKFKGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDТАVYYCARSDYYGDYGF AYWGQGTLVTVSS	IGHV1-46/4	HFR được chọn cho C2177 AM, đường dẫn 2
107	H196	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>AFSSSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYS</u> GDGDTNYNGKFKGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDТАVYYCARSDYYGDYGF AYWGQGTLVTVSS		VH trong các dòng vô tính M158, M160 AM
108	H255	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>AFSSSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYS</u> GDADTNYAQKFKGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDТАVYYCARSDYYGDYGF AYWGQGTLVTVSS		VH trong các biển thể M668, M672 PTM
109	H256	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY <u>AFSSSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYS</u> GDADTNYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDТАVYYCARSDYYGDYGF AYWGQGTLVTVSS		VH trong các biển thể M669, M673 PTM

110	H197	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY AFSSSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIYQ GDGDTNYNGKFKGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDNAVYYCARSDYYGDYGF AYWGQGTLVTVSS		dòng vô tính C2177 AM
111	H28	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYPG</u> <u>DGDTNYS</u> PSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA <u>YWGQGTLVTVSS</u>	IGHV5- 51c/4	HFR được chọn cho sự thành thực ái lực C2177 (AM) đường dẫn 1
112	H236	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYPG</u> <u>DGDTNYS</u> PSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARADYYGDYGF <u>YWGQGTLVTVSS</u>		VH trong dòng vô tính M584 AM, đường dẫn 1
113	H237	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIFVR</u> <u>DGDTNYS</u> PSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA <u>YWGQGTLVTVSS</u>		dòng vô tính C2177 AM, đường dẫn 1
114	H238	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYVG</u> <u>DGDTNYS</u> PSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA <u>YWGQGTLVTVSS</u>		dòng vô tính C2177 AM, đường dẫn 1

115	H239	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAG</u> <u>DGDTNYS</u> SPSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA <u>YWGQGTLVTVSS</u>		VH trong dòng vô tính M596 AM, đườn g dẫn 1
116	H240	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAR</u> <u>DGDTNYS</u> SPSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA <u>YWGQGTLVTVSS</u>		VH trong M558, M600 AM, đường dẫn 1
117	H241	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYGR</u> <u>DGDTNYS</u> SPSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA <u>YWGQGTLVTVSS</u>		Dòng vô tính C2177 AM, đườn g dẫn 1
118	H242	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAN</u> <u>DGDTNYS</u> SPSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA <u>YWGQGTLVTVSS</u>		Dòng vô tính C2177 AM, đường dẫn 1
119	H243	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYGG</u> <u>DGDTNYS</u> SPSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA <u>YWGQGTLVTVSS</u>		Dòng vô tính C2177 AM, đường dẫn 1
120	H244	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSG</u> <u>DGDTNYS</u> SPSFQGQVTISADKSISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA		Dòng vô tính V2177 AM,

		<u>YWGQGLTVTVSS</u>		đường dẫn 1
121	H245	<u>EVQLVQSVAEVKKPGESLKISCKGSGYA</u> <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYSR</u> <u>DGDTNYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQ</u> <u>WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA</u> <u>YWGQGLTVTVSS</u>		Dòng vô tính C2177 AM, đường dẫn 1
122	H259	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA</u> <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAG</u> <u>DGDTAYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQ</u> <u>WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA</u> <u>YWGQGLTVTVSS</u>		VH trong đột biến M678 PTM
123	H260	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA</u> <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAG</u> <u>DGDTNYAPSFQGQVTISADKSISTAYLQ</u> <u>WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA</u> <u>YWGQGLTVTVSS</u>		VH trong đột biến M680 PTM
124	H270	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA</u> <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAG</u> <u>DADTAYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQ</u> <u>WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA</u> <u>YWGQGLTVTVSS</u>		VH trong đột biến M703 PTM
125	H272	<u>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYA</u> <u>FSSSWMNWVRQMPGKGLEWMGRIYAG</u> <u>DADTNYAPSFQGQVTISADKSISTAYLQ</u> <u>WSSLKASDTAMYYCARSDYYGDYGFA</u> <u>YWGQGLTVTVSS</u>		VH trong đột biến M706 PTM

Bảng 39.

SEQ ID	Dòng vô tính	Trình tự	Các dấu hiệu hoặc nguồn gốc	Chú thích
126	Vùng biến đổi chuỗi nặng (HC) C2191	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFS <u>SYTMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGNTY</u> <u>YPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSE</u> DTAMYYCSR <u>HRGNPFDY</u> WGQGTTLTVSS	H10	Chuột
127	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LC) C2191	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASKSVST <u>SGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES</u> GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATY YCQHSREL <u>PWTFGGG</u> TKLEIK	L20	Chuột
128	H30	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFS</u> <u>SYTMSWVRQAPGKGLEWVS</u> <u>YISSGGGNTY</u> <u>YPDSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAK <u>HRGNPFDY</u> WGQGTTLTVSS	IGHV3-23/4	HFR được chọn cho C2191 AM, đường dẫn 2
129	H79	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYTMSWVRQAPGKGLEWVSAIDHGGGQT LYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARHRGNPFDYWGQGTTLTVS S		VH trong biến thể M141 AM, đường dẫn 2. Bảng 29

130	H192	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYTMSWVRQAPGKGLEWVSVIDHGGGST HYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARHRGNPFDYWGQGTLVTVS S		VH trong biển thể M408 AM, đường dẫn 2. Bảng 29
131	H31	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>GFTFS</u> <u>SYTMSWIRQAPGKGLEWVS</u> <u>YISSGGGNTY</u> <u>YPDSVKGRFTISRDN</u> <u>AKNSLYLQMNSLRAE</u> DTAVYYCAR <u>HRGNPFDY</u> WGQGTLVTVSS	IGHV3-11/4	HFR được chọn cho C2191 AM đường dẫn 1
132	H222	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMSWIRQAPGKGLEWVSIDRGGGVTI YPDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARHRGNPFDYWGQGTLVTVSS		VH trong biển thể M526 AM, đường dẫn 1
133	H227	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMSWIRQAPGKGLEWVSIDEGGGQTI YPDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARHRGNPFDYWGQGTLVTVSS		VH trong các biển thể M427, M429, M488, M489 AM, đường dẫn 1

134	H228	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYSMSWIRQAPGKGLEWVSYIDAGGGFTIY PDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARHRGNPFDYWGQGTLLTVSS		VH trong các biến thể M492, M493 AM, đường dẫn 1
135	H231	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYSMSWIRQAPGKGLEWVSHIDAGGGRTW YPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARHRGNPFDYWGQGTLLTVSS		VH trong biến thể M501 AM, đường dẫn 1
136	H232	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYPMSWIRQAPGKGLEWVSHIATGGGNTY YPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE DTAVYYCARHRGNPFDYWGQGTLLTVSS		Dòng vô tính C2191 AM, đường dẫn 1
137	L40	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVST <u>SGYSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLES</u> GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY <u>CQHSRELPWTFGQGTKVEIK</u>	IGKVO12/1	HFR được chọn cho C2191 AM, đường dẫn 2
138	L137	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVST SGYSFMHWYQQKPGKAPKLLIYVGSRLDY GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQHSRELPWTFGQGTKVEIK		VL trong biến thể M408 AM, đường

				dẫn 2. Bảng 29
139	L173	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSH VRWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQHSRELPWTFGQGTKVEIK		VL trong biển thềm M141 AM, đường dẫn 2. Bảng 29
140	L42	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVST SGYSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLES GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYY CQHSRELPWTFGQGTKVEIK	IGKVO8/1	HFR được chọn cho C2191 AM, đường dẫn 1
141	L244	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSA WGYSFMHWYQQKPGKAPKLLIYVASRLES GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYY CQHSRELPWTFGQGTKVEIK		VL trong biển thềm M427 AM, đường dẫn 1
142	L245	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSH VRWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASKLES GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYY CQHSRELPWTFGQGTKVEIK		VL trong biển thềm M429 AM, đường dẫn 1
143	L249	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSE GRWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYVASRLES GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYY CQHSRELPWTFGQGTKVEIK		VL trong các biển thềm M488,

				M492, M526 AM, đường dẫn 1
144	L250	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSL DRWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLES GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYY CQHSRELPWTFGQGTKVEIK		VL trong các biến thể M489, M493, M501 AM, đường dẫn 1
145	H39	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYTMSWVRQAPGKGLEWVSYISSGGGNTY YPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARHRGNPFDYWGQGT LVTVSS		HFR; VH trong các dòng vô tính M131; M136- 138 AM, đường dẫn 2
146	H40	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYTMSWVRQAPGKGLEWVSAIDHGGGRT YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARHRGNPFDYWGQGT LVTVS S		VH trong các dòng vô tính M132; M139; M140 AM, đường dẫn 2

147	H191	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYTMSWVRQAPGKGLEWVSAIDGGGGAT YYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARHRGNPFDYWGQGTLVTVS S	VH trong các dòng vô tính M134; M143; M144; AM, đường dẫn 2
148	L160	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSVSY VRWSFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLES GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYY CQHSRELPWTFGGGTKVEIK	VL trong các dòng vô tính M137; M160; M142; M143; M146, đường dẫn 2

Bảng 40. Protein CD27 và CD70

SEQ NO:	ID	Mô tả	Các dấu hiệu, chữ viết tắt
149		propolypeptit CD27 của người	1-20 tín hiệu, 21-191 miễn ngoại bào, 192-212 xuyên màng, 213-260 Nội bào TPAPKSCPER HYWAQGKLCC QMCEPGTFLV KDCDQHRKAA QCDPCIPGV FSPDHHTRPH CESC RHCNSG LLVRNCTITA NAECACRNGW QCRDKECTEC DPLPNPSLTA RSSQALSPHP QPHTLPYVSE MLEARTAGHM QTLADFRQLP ARTLSTHWPP QRSLCSDFI RILVIFSGMF LVFTLAGALF LHQRRKYRSN KGESPVEPAE PCRYSCPREE EGSTIPIQED YRKPEPACSP
150		propolypeptit CD70 của người	1-17 nội bào, 18-38 xuyên màng, và 39-193 ngoại bào MPEEGSGCSV RRRPYGCVLR AALVPLVAGL VICLVVCIQR FAQAQQQLPL ESLGWDVAEL QLNHTGPQQD PRLYWQGGPA LGRSFLHGPE LDKGQLRIHR DGIYMVHIQV TLAICSSTTA SRHHPTTLAV GICSPASRSI SLLRLSFHQG CTIASQRLTP LARGDTLCTN LTGTLLPSRN TDETFFGVQW VRP

Bảng 41. Các trình tự vùng hằng định của kháng thể

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO:
Chuỗi nặng của người IgG4 Ala/Ala Ser đối với vùng hằng định Pro	astkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvh tfpavlqssglyslssvvtvpssslgktytcnvdhkpstkvdkrvesky gppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqed pevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstyrvsvltvlhqdwlngk eykckvsnkglpssiektiskakgqprepvytlppsqeemtknqvslt clvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflysrltvdksr wqegnvfscsvmhealhnhytqkslsislglk	159
Vùng hằng định chuỗi nhẹ của người kapa	rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcclnnfypreakvqwkvdnalqs gnsqesvteqdsdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvt ksfnrgec	160

Bảng 42. Trình tự kháng thể nucleotit

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO:
Trình tự mã hóa chuỗi nhẹ (mã hóa trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 160)	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCC AGCGTGGGCGACCGGGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGC AAGAGCGTGAGCGAGGGGCGATGGAGCTTCATGCACTGG TACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCT ACGTGGCCAGCAGACTGGAGAGCGGCGTGCCCAGCCGGT TCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTTCACCAT CAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGC CAGCACAGCCGGGAGCTGCCCTGGACCTTCGGCCAGGGC ACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTG TCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT	163

Trình tự mã hóa chuỗi nặng (mã hóa trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 159)	CAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGAAGCCC GGCGGCAGCCTGCGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCAGCTACGGGATGAGCTGGATCCGGCAGGCCCCCGGCAA GGGCCTGGAGTGGGTGAGCTACATCGATGAGGGCGGCGGCCA GACCATCTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGC CGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC TGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGCACCG GGGCAACCCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACC GTGAGCAGCGCTTCCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGC GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT GGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC TGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAACCTACACCTGCAA CGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT TGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCT GAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCCAAAC CCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTC AACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCG AGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGTCTCT TCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTA AA	164
--	--	-----

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng CD27 của người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ này bao gồm:

trình tự axit amin của vùng xác định bổ trợ của chuỗi nhẹ 1 (complementarity determining region light chain 1 - CDRL1) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 59-66 và 158;

trình tự axit amin của CDRL2 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 67-74; và

trình tự axit amin của CDRL3 là SEQ ID NO: 75.

2. Kháng thể kháng CD27 của người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này còn bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm:

trình tự axit amin của CDRH1 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 42-45 và 161;

trình tự axit amin của CDRH2 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 46-57, 156, và 157; và

trình tự axit amin của CDRH3 là SEQ ID NO: 58.

3. Kháng thể kháng CD27 của người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng, vùng biến đổi chuỗi nặng này bao gồm:

trình tự axit amin của vùng xác định bổ trợ chuỗi nặng 1 (complementarity determining region heavy chain 1 - CDRH1) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 42-45 và 161;

trình tự axit amin của CDRH2 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 46-57, 156, và 157; và

trình tự axit amin của CDRH3 là SEQ ID NO: 58.

4. Kháng thể kháng CD27 của người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng, vùng biến đổi chuỗi nhẹ này bao gồm:

trình tự axit amin của CDRL1 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 59-66 và 158;

trình tự axit amin của CDRL2 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 67-74; và

trình tự axit amin của CDRL3 là SEQ ID NO: 75, và vùng biến đổi chuỗi nặng này bao gồm:

trình tự axit amin của CDRH1 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 42-45;

trình tự axit amin của CDRH2 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 46-57, 156, và 157; và

trình tự axit amin của CDRH3 là SEQ ID NO: 58.

5. Kháng thể kháng CD27 của người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng, vùng biến đổi chuỗi nhẹ này bao gồm:

trình tự axit amin của CDRL1 là SEQ ID NO: 62;

trình tự axit amin của CDRL2 là SEQ ID NO: 68; và

trình tự axit amin của CDRL3 là SEQ ID NO: 75, và vùng biến đổi chuỗi nặng này bao gồm:

trình tự axit amin của CDRH1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 44 và 161;

trình tự axit amin của CDRH2 là SEQ ID NO: 47; và

trình tự axit amin của CDRH3 là SEQ ID NO: 58.

6. Kháng thể kháng CD27 của người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ và trình tự axit amin

biến đổi chuỗi nặng, trong đó trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 143 và trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng là SEQ ID NO: 133.

7. Kháng thể được phân lập theo điểm 6, trong đó kháng thể này còn bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng IgG4 và vùng hằng định chuỗi nhẹ IgG4.

8. Kháng thể được phân lập theo điểm 7, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 159 và vùng hằng định chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 160.

9. Kháng thể trung hòa CD27 được phân lập của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này liên kết với epitop mà được liên kết bởi kháng thể theo điểm 6 như được xác định bằng cách liên kết với miền ngoại bào CD27 cố định.

10. Kháng thể được phân lập theo điểm 6, trong đó kháng thể này liên kết với CD27 của người với K_D là $1 \times 10^{-7} M$ hoặc nhỏ hơn như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt.

11. Vật dụng sản xuất bao gồm chế phẩm được dụng bao gồm kháng thể theo điểm 6.

12. Kháng thể của người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi kháng thể liên kết với epitop trên protein CD27 của người mà được liên kết bởi kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng, vùng biến đổi chuỗi nhẹ này bao gồm:

trình tự axit amin của CDRL1 là SEQ ID NO: 59;

trình tự axit amin của CDRL2 là SEQ ID NO: 67; và

trình tự axit amin của CDRL3 là SEQ ID NO: 75, và vùng biến đổi chuỗi nặng này bao gồm:

trình tự axit amin của CDRH1 là SEQ ID NO: 42;

trình tự axit amin của CDRH2 là SEQ ID NO: 46; và

trình tự axit amin của CDRH3 là SEQ ID NO: 58 hoặc kháng thể bao gồm

trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 127 và trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng là SEQ ID NO:126.

13. Kháng thể được phân lập của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi kháng thể cạnh tranh để liên kết với protein CD27 của người với kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng, vùng biến đổi chuỗi nhẹ này bao gồm:

trình tự axit amin của CDRL1 là SEQ ID NO: 59;

trình tự axit amin của CDRL2 là SEQ ID NO: 67; và

trình tự axit amin của CDRL3 là SEQ ID NO: 75, và vùng biến đổi chuỗi nặng này bao gồm:

trình tự axit amin của CDRH1 là SEQ ID NO: 42;

trình tự axit amin của CDRH2 là SEQ ID NO: 46; và

trình tự axit amin của CDRH3 là SEQ ID NO: 58 hoặc kháng thể bao gồm trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 127 và trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng là SEQ ID NO:126.

14. Kháng thể kháng CD27 của người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 137-144 và 148.

15. Kháng thể được phân lập của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 14, trong đó kháng thể này còn bao gồm trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 128-136 và 145-147.

16. Kháng thể kháng CD27 của người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 128-136 và 145-147.

Fig. 1

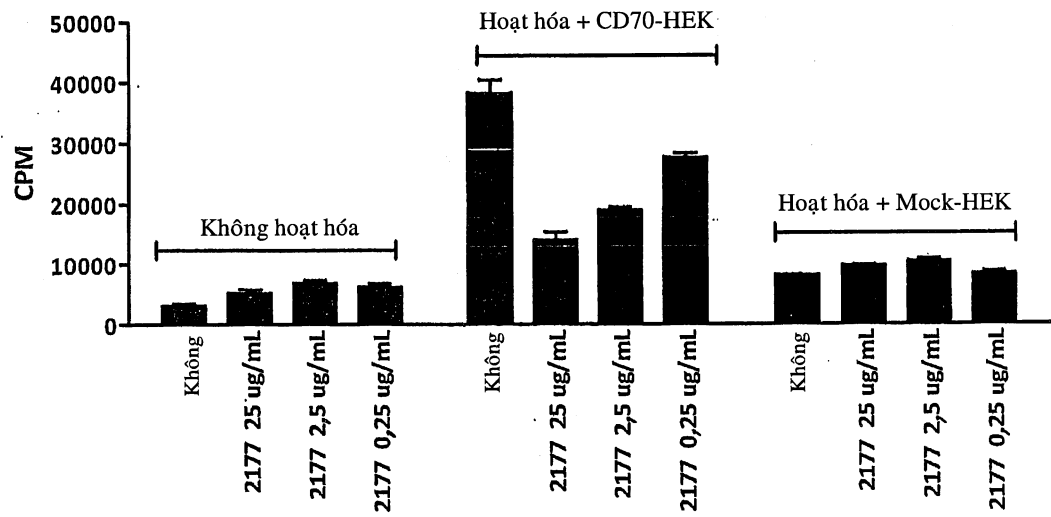


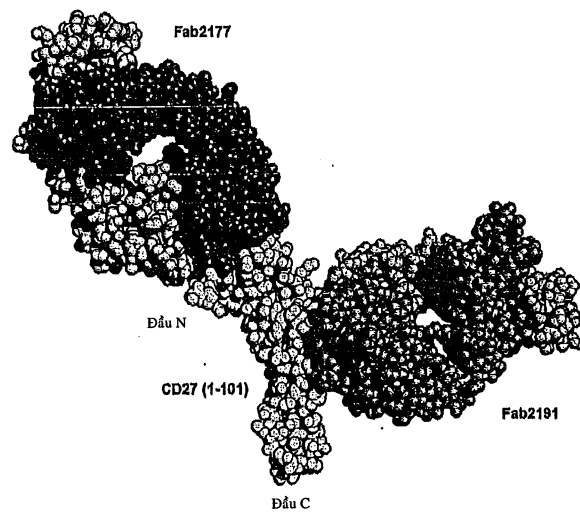
Fig. 2

Fig. 3

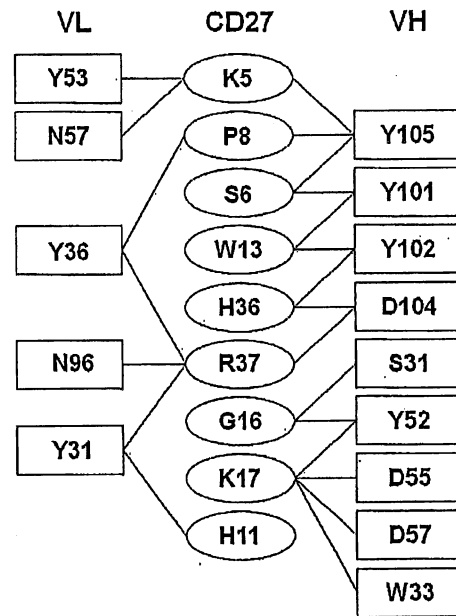
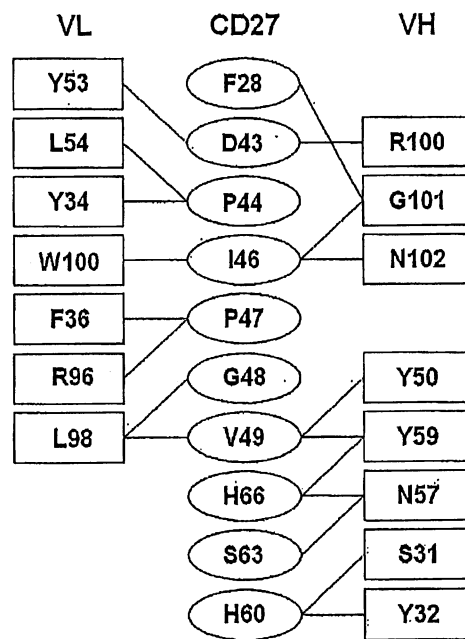


Fig. 4



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Janssen Biotech, Inc.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG CD27 CỦA NGƯỜI VÀ VẬT DỤNG SẢN XUẤT BAO GỒM KHÁNG THỂ NÀY

<130> JBI5001USNP

<140> Được chuyển nhượng

<141> 2013-03-14

<150> 61611332

<151> 2012-03-15

<160> 176

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 1

Ser Ser Trp Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 2

Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn

1 5 10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 3

Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi nặng CDR

<400> 4

Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ser
1				5					10		

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 5

Arg	Ile	Phe	Val	Arg	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ser
1				5					10		

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 6

Arg	Ile	Tyr	Val	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ser
1				5					10		

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 7

Arg	Ile	Tyr	Ala	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ser
1				5					10		

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 8

Arg	Ile	Tyr	Ala	Arg	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ser
1				5					10		

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 9

Arg	Ile	Tyr	Gly	Arg	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ser
1				5					10		

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 10

Arg Ile Tyr Ala Asn Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 11

Arg Ile Tyr Gly Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

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

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 12

Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 13

Arg Ile Tyr Ser Arg Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 14

Arg	Ile	Tyr	Ala	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Ala	Tyr	Ser
1				5					10		

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 15

Arg	Ile	Tyr	Ala	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ala
1				5					10		

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 16

Arg	Ile	Tyr	Ala	Gly	Asp	Ala	Asp	Thr	Ala	Tyr	Ser
1				5					10		

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 17

Arg	Ile	Tyr	Ala	Gly	Asp	Ala	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ala
1				5					10		

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 18

Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 19

Arg	Ile	Tyr	Ser	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 20

Arg	Ile	Tyr	Ser	Gly	Asp	Ala	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 21

Arg	Ile	Tyr	Ser	Gly	Asp	Ala	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 22

Arg	Ile	Tyr	Gln	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 23

Ser	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Gly	Phe	Ala	Tyr
1				5					10	

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 24

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Ala	Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 25

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Ala	Gly	Asp	Ser	Phe	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 26

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Ala	Gly	Asp	Ser	Trp	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 27

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 28

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Trp	Ala	Gly	His	Ser	Trp	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 29

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Ala	Gly	Glu	Ser	Phe	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 30

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Phe	Ser	Glu	Ser	Tyr	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 31

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Ala	His	Glu	Ser	Phe	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 32

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

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 33

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Phe	Arg	Thr	Ser	Phe	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 34

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Val	Gly	Thr	Ser	Phe	Met	Asn
1				5					10					15

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 35

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Trp	Ser	Asp	Ser	Phe	Met	Asn
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1 5 10 15

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 36

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Tyr Asn Ser Ser Phe Met Asn
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 37

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự CD27

<400> 38

Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 39

Thr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 40

Glu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 41

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 42

Ser Tyr Thr Met Ser
1 5

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 43

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
 1 5 10

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10

<210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 45

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Ser
 1 5 10

<210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 46

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 47

Tyr	Ile	Asp	Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Thr	Ile	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 48

Tyr	Ile	Asp	Ala	Gly	Gly	Gly	Phe	Thr	Ile	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 49

His	Ile	Asp	Ala	Gly	Gly	Gly	Arg	Thr	Trp	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 50

Tyr	Ile	Asp	Arg	Gly	Gly	Gly	Val	Thr	Ile	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 51

Ala	Ile	Asp	His	Gly	Gly	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 52

Ala	Ile	Asp	His	Gly	Gly	Gly	Arg	Thr	Trp	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 53

Ala	Ile	Asp	His	Gly	Gly	Gly	Gln	Thr	Leu	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 54

Tyr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Thr	Leu	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1			5						10					15	

Gly

<210> 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 55

Thr	Ile	Asp	Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Trp	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 56

Ala	Ile	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1			5						10					15	

Gly

<210> 57
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 57

His	Arg	Gly	Asn	Pro	Phe	Asp	Tyr
1			5				

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 58

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Met	His
1			5						10					15

<210> 59
 <211> 15

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 59

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Trp	Gly	Tyr	Ser	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 60

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Trp	Gly	Tyr	Ser	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 61

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Glu	Gly	Arg	Trp	Ser	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 62

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Leu	Asp	Arg	Trp	Ser	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 63

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Leu	Asp	Arg	Trp	Ser	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 64

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Tyr	Val	Arg	Trp	Ser	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 65

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	His	Ile	Arg	Trp	Ser	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 66

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser His Val Arg Trp Ser Phe Met His
 1 5 10 15

<210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 67

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 68

Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ser
 1 5

<210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 69

Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ser
 1 5

<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 70

Val Gly Asn Arg Leu Glu Asp
1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 71

Val Gly Asp Arg Arg Gln Glu
1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 72

Val Gly Ser Arg Met Ala Phe
1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 73

Val Gly Asp Arg Ala Asn Trp
1 5

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 74

Val Gly Ser Arg Leu Asp Tyr

1

5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 75

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Trp Thr

1

5

<210> 76

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 76

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Arg Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Asn Phe

50

55

60

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

65

70

75

80

Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 77

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 77

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 78

<211> 120

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 78

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 79
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 79

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Met Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 80

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 80

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 81

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 81

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 82

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 82

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

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

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 83
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 83

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

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

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 84
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 84

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

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

Gly Asp Ser Trp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85

90

95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 85

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 85

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

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

Gly Asp Ser Trp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Leu Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 86

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 86

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Trp Ala
 20 25 30

Gly His Ser Trp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 87

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 87

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Trp Ala
 20 25 30

Gly His Ser Trp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser 65 70 75 80	Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn 85 90 95	Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110
---	---	--

<210> 88
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 88

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly 1 5 10 15	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala 20 25 30	Gly Ser Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro 35 40 45
---	---	---

Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp 50 55 60	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser 65 70 75 80	Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn 85 90 95
---	---	---

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110		
--	--	--

<210> 89
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 89

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

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

Gly Glu Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 90
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 90

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala

20

25

30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 91

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 91

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Phe
 20 25 30

Ser Glu Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 92
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 92

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

His Glu Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 93
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 93

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Phe
 20 25 30

Gly Asp Ser Leu Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 94

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 94

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
 20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 95

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 95

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Glu Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 96
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 96

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
 20 25 30

Gly Glu Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 97
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 97

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 98

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 98

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Phe
20 25 30

Arg Thr Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 99

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 99

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Val
20 25 30

Gly Thr Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 100

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 100

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Trp
20 25 30

Ser Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 101

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 101

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

Asp Arg Val Ala Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Tyr
20 25 30

Asn Ser Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 102

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 102

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 103
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 103

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 104

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 105

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 105

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 106
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 106

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

27181

```

65              70              75              80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100              105              110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115              120

<210> 107
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 107

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110

```

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 108
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 108

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

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

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

Gly Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 109
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 109

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

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

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

Gly Arg Ile Tyr Ser Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 110

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 110

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 111

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 111

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 112
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 112

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Gly Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 113
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 113

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 114
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 114

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 115

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 115

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 116

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 116

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 117
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 117

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 118
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 118

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 119
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 119

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

27181

1	5	10	15												
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Tyr	Gly	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								
<210> 120															
<211> 120															
<212> PRT															
<213> Trình tự nhân tạo															
<220>															
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng															
<400> 120															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 121

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 121

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 122

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 122

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 123

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 123

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 124

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 124

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Ala Asp Thr Ala Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 125

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 125

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 126

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 126

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

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100

105

110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 127
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 127

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 128
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 128

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 129

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 129

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

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

27181

35 40 45

Ser Ala Ile Asp His Gly Gly Gly Gln Thr Leu Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 130
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 130

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

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

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

Ser Val Ile Asp His Gly Gly Gly Ser Thr His Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 131
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 131

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

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

Thr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 132
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 132

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

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

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

Ser Tyr Ile Asp Arg Gly Gly Gly Val Thr Ile Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 133
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 133

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

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

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

Ser Tyr Ile Asp Glu Gly Gly Gly Gln Thr Ile Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 134

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 134

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

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

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

Ser Tyr Ile Asp Ala Gly Gly Gly Phe Thr Ile Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 135
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 135

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

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

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

Ser His Ile Asp Ala Gly Gly Gly Arg Thr Trp Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 136
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 136

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

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

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

Ser His Ile Ala Thr Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 137

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 137

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 138
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 138

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Val Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 139
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 139

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser His Val
20 25 30

Arg Trp Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85

90

95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 140

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 140

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 141

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 141

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Trp
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 142

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 142

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser His Val
20 25 30

Arg Trp Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 143

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 143

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Glu Gly
20 25 30

Arg Trp Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 144
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 144

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Leu Asp
 20 25 30

Arg Trp Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 145
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 145

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

27181

20

25

30

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 146

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 146

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

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

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

Ser Ala Ile Asp His Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 147

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng

<400> 147

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

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

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

Ser Ala Ile Asp Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Arg Gly Asn Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 148
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 148

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Tyr Val
20 25 30

Arg Trp Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 149
<211> 240
<212> PRT
<213> Người thông tuệ

<400> 149

Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly
1 5 10 15

Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe Leu Val Lys Asp
 20 25 30

Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly
 35 40 45

Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys
 50 55 60

Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala
 65 70 75 80

Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys Arg Asp Lys Glu
 85 90 95

Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu Thr Ala Arg Ser
 100 105 110

Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His Leu Pro Tyr Val
 115 120 125

Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met Gln Thr Leu Ala
 130 135 140

Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr His Trp Pro Pro
 145 150 155 160

Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile Leu Val Ile Phe
 165 170 175

Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala Leu Phe Leu His
 180 185 190

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro
 195 200 205

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr
 210 215 220

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro
 225 230 235 240

<210> 150

<211> 193

<212> PRT

<213> Người thông tuệ

<400> 150

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
 1 5 10 15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile
 20 25 30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
 35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
 50 55 60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
 65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
 85 90 95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
 100 105 110

Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
 115 120 125

Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
 130 135 140

Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
 145 150 155 160

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
 165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
 180 185 190

Pro

<210> 151
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (3)..(3)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (4)..(4)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (5)..(5)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (7)..(7)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (10)..(10)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (12)..(12)

<400> 151

Arg Ile Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Asp Thr Xaa Tyr Xaa
 1 5 10

<210> 152
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (4)..(4)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (7)..(7)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (12)..(12)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (13)..(13)

<400> 152

Arg	Ile	Tyr	Xaa	Gly	Asp	Xaa	Asp	Thr	Asn	Tyr	Xaa	Xaa	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 153
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (8)..(8)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (11)..(11)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (13)..(13)

<400> 153

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Xaa Ala Gly Xaa Ser Xaa
 1 5 10

<210> 154
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (1)..(1)

<400> 154

Xaa Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 155
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (9)..(9)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (10)..(10)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (11)..(11)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (14)..(14)

<400> 155

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Xaa Xaa Xaa Met Ser Xaa Met Asn
 1 5 10 15

<210> 156
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (3)..(3)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (4)..(4)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (8)..(8)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (10)..(10)

<400> 156

Xaa	Ile	Xaa	Xaa	Gly	Gly	Gly	Xaa	Thr	Xaa	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5				10						15	

Gly

<210> 157
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (1)..(1)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (3)..(3)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (4)..(4)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (8)..(8)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (10)..(10)

<400> 157

Xaa	Ile	Xaa	Xaa	Gly	Gly	Gly	Xaa	Thr	Xaa	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5				10						15	

Gly

<210> 158
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (8)..(8)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (9)..(9)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (10)..(10)

<220>
 <221> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên
 <222> (11)..(11)

<400> 158

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Phe Met His
 1 5 10 15

<210> 159

<211> 327

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng ổn định chuỗi nặng

<400> 159

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 160

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng ổn định chuỗi nhẹ

<400> 160

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 161

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 161

Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5

<210> 162

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi chuỗi nặng CDR

<400> 162

Ala Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Gly Phe Gly Tyr
1 5 10

<210> 163

<211> 654

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nhẹ kháng thể

<400> 163

gacatccaga tgacccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga ccgggtgacc	60
atcacctgcc gggccagcaa gagcgtgagc gaggggcgat ggagcttcat gcactggtac	120
cagcagaagc ccggcaaggc ccccaagctg ctgatctacg tggccagcag actggagagc	180
ggcgtgcccc gccggttcag cggcagcggc agcggcaccg acttcacctt caccatcagc	240
agcctgcagc ccgaggacat cgccacctac tactgccagc acagccggga gctgccctgg	300
accttcggcc agggcaccaa ggtggagatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc	360
atcttccccg catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg	420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg	480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	540
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	600
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt	654

<210> 164

<211> 1332

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự chuỗi nặng kháng thể

<400> 164

caggtgcagc tgggtgagag cggcggcggc ctggtgaagc ccggcggcag cctgcggctg	60
agctgcgccg ccagcggcctt caccttcagc agctacggga tgagctggat ccggcaggcc	120
cccggaagg gcctggagtg ggtgagctac atcgatgagg gcggcggcca gaccatctac	180

```

cccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccggcaccgg      300
ggcaaccctt tcgactactg gggccagggc accctggtga ccgtgagcag cgcttccacc      360
aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc      420
gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca      480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac      540
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaaaac ctacacctgc      600
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt      660
cccccatgcc caccatgcc agcacctgag gccgccgggg gaccatcagt cttcctgttc      720
cccccaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg      780
gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag      840
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc      900
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc      960
tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc     1020
cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc     1080
agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc     1140
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc     1200
ttcttctctt acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc     1260
tcatgtcccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg     1320
tctctgggta aa                                                                1332

```

<210> 165

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự biến đổi nặng CDR

<400> 165

```

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1           5           10           15

```

Gly

<210> 166
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi nặng CDR

<400> 166

Arg	Ile	Tyr	Ala	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Ala	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 167
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi nặng CDR

<400> 167

Arg	Ile	Tyr	Ala	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ala	Pro	Ser	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 168
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi nặng CDR

<400> 168

Arg	Ile	Tyr	Ala	Gly	Asp	Ala	Asp	Thr	Ala	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1 5 10 15

Gly

<210> 169
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi nặng CDR

<400> 169

Arg Ile Tyr Ala Gly Asp Ala Asp Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 170
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 170

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Phe Ser Glu Ser Phe Met Asn
 1 5 10 15

<210> 171
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ xảy ra một cách tự nhiên

<400> 171

Xaa Ala Ser Xaa Leu Glu Ser
 1 5

<210> 172
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 172

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Leu Ile Arg Trp Ser Phe Met His
 1 5 10 15

<210> 173
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự biến đổi chuỗi nhẹ CDR

<400> 173

Val Ala Asp Arg Val Glu Val
 1 5

<210> 174
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Người thông tuệ

<400> 174

Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly
 1 5 10 15

Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe Leu Val Lys Asp
 20 25 30

Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly
 35 40 45

Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys
 50 55 60

Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala
 65 70 75 80

Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys Arg Asp Lys Glu
 85 90 95

Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu Thr Ala Arg Ser
 100 105 110

Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His Leu Pro Tyr Val
 115 120 125

Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met Gln Thr Leu Ala
 130 135 140

Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr His Trp Pro Pro
 145 150 155 160

Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile Leu His His His
 165 170 175

His His His

<210> 175

<211> 135

<212> PRT

<213> Người thông tuệ

<400> 175

Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly
 1 5 10 15

Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe Leu Val Lys Asp

20

25

30

Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly
 35 40 45

Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys
 50 55 60

Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala
 65 70 75 80

Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys Arg Asp Lys Glu
 85 90 95

Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu Thr Ala Arg Ser
 100 105 110

Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly
 115 120 125

Pro His His His His His His
 130 135

<210> 176

<211> 107

<212> PRT

<213> Người thông tuệ

<400> 176

Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly
 1 5 10 15

Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe Leu Val Lys Asp
 20 25 30

Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro Cys Ile Pro Gly
 35 40 45

Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His Cys Glu Ser Cys
 50 55 60

27181

Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys Thr Ile Thr Ala
65 70 75 80

Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys Arg Asp Lys Glu
85 90 95

Cys Thr Glu Cys Asp Gly Gly His His His His
100 105