(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) **1-0031458**

(51)[7] **C07K 16/28**; C07K 16/30; A61K 39/395; A61P 35/00

(13) **B**

(21) 1-2015-02870
(22) 24/02/2014
(86) PCT/EP2014/053490 24/02/2014
(87) WO/2014/131712 04/09/2014
(30) 13156686.1 26/02/2013 EP
(45) 25/04/2022 409
(43) 25/11/2015 332A
(73) ROCHE GLYCART AG (CH)
Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren, Switzerland
(72) BACAC, Marina (IT); HOFER, Thomas (CH); HOSSE, Ralf (DE); JAEGER, Christiane (DE); KLEIN, Christian (DE); MOESSNER, Ekkehard (DE); UMANA, Pablo (CR); WEINZIERL, Tina (DE).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHÂN TỬ GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN ĐẶC HIỆU KÉP HOẠT HÓA TẾ BÀO T VÀ POLYPEPTIT PHÂN LẬP ĐƯỢC MÃ HÓA PHÂN TỬ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T và định hướng lại đến các tế bào đích đặc hiệu. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các polynucleotit mã hoá các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này, các vectơ và các tế bào vật chủ bao gồm các polynucleotit này. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp sản xuất các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép của sáng chế, và các phương pháp sử dụng các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này trong điều trị bệnh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế nói chung đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép để hoạt hoá các tế bào T. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các polynucleotit mã hoá các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này, và các vectơ và các tế bào vật chủ bao gồm các polynucleotit này. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp sản xuất các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép của sáng chế, và các phương pháp sử dụng các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này để điều trị bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phá huỷ chọn lọc một tế bào riêng rẽ hoặc một loại tế bào cụ thể thường được mong muốn trong nhiều bối cảnh lâm sàng. Ví dụ, mục tiêu hàng đầu trong trị liệu ung thư là phá huỷ đặc hiệu các tế bào khối u, đồng thời để lại các tế bào và mô khoẻ mạnh còn nguyên vẹn và không bị hư hại.

Một cách hấp dẫn để đạt được mục tiêu này là gây đáp ứng miễn dịch kháng lại khối u, làm cho các tế bào hiệu ứng miễn dịch như là các tế bào giết tự nhiên (NK) hoặc các lympho bào T gây độc tế bào (CTL) tấn công và phá huỷ các tế bào khối u. Các CTL cấu thành các tế bào hiệu ứng mạnh nhất của hệ miễn dịch, tuy nhiên các tế bào này không thể hoạt hoá được bằng cơ chế gây hiệu ức qua trung gian miền Fc của các kháng thể trị liệu thông thường.

Về khía cạnh này, các kháng thể đặc hiệu kép được thiết kế để gắn kết một "nhánh" với kháng nguyên bề mặt trên các tế bào đích, và "nhánh" thứ hai với thành phần không thay đổi hoạt hoá của phức hợp thụ thể tế bào T (TCR), đã được chú ý đến trong những năm gần đây. Gắn kết đồng thời kháng thể này với cả hai phần của các tế bào đích của nó sẽ cưỡng bức một tương tác tạm thời giữa tế bào đích và tế bào T, gây hoạt hoá tế bào T gây độc tế bào bất kỳ và phân giải tế bào đích sau đó. Do đó, đáp ứng miễn dịch được định hướng đến các tế bào đích và không phụ thuộc vào việc trình diện kháng nguyên peptit của tế bào đích hoặc tính đặc hiệu của tế bào T mà các quá trình này liên quan đến quá trình hoạt hoá-hạn chế bởi MHC thông thường của các CTL. Trong trường hợp này quan trọng là các CTL chỉ được hoạt hoá khi một tế bào đích trình diện

kháng thể đặc hiệu kép cho chúng, có nghĩa là synap miễn dịch được mô phỏng bắt chước. Đặc biệt mong muốn là các kháng thể đặc hiệu kép mà không đòi hỏi tạo điều kiện trước hoặc đồng kích thích lympho bào để gây phân giải hiệu quả các tế bào đích.

Một vài kiểu kháng thể đặc hiệu kép đã được phát triển và tính phù hợp của chúng để trị liệu miễn dịch qua trung gian tế bào T đã được khảo sát. Trong số các kiểu này, các phân tử còn được gọi là BiTE (thể tiếp hợp tế bào T đặc hiệu kép) đã được mô tả đặc điểm rất kỹ và đã chứng tỏ có hứa hẹn trên lâm sàng (được đánh giá trong tài liệu: Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011) của Nagorsen và Bäuerle). Các BiTE là các phân tử scFv kiểu 'xe đạp đôi', trong đó hai phân tử scFv được dung hợp bởi một liên kết linh hoạt. Các kiểu đặc hiệu kép khác đang được đánh giá để tiếp hợp tế bào T bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép (Holliger et al., Prot Eng 9, 299-305 (1996)) và các dẫn xuất của chúng, như là các kháng thể đặc hiệu kép kiểu 'xe đạp đôi' (Kipriyanov et al., J Mol Biol 293, 41-66 (1999)). Một phát triển mới gần đây hơn là các phân tử được gọi là DART (tái hướng đích ái lực kép), các phân tử này là dựa trên kiểu đặc hiệu kép nhưng đặc trưng có cầu nối đisulfua đầu tận C để ổn định hơn (Moore et al., Blood 117, 4542-51 (2011)). Các phân tử gọi là triomab này, là các phân tử IgG của chuột nhắt/chuột cống lai nguyên vẹn và hiện đang được đánh giá trong các thử nghiệm lâm sàng, đại diện cho kiểu kích cỡ lớn hơn (được đánh giá trong tài liệu: Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010), của Seimetz và các đồng tác giả).

Nhiều loại phân tử đang được nghiên cứu phát triển cho thấy tiềm năng lớn của việc định hướng lại và hoạt hoá tế bào T trong trị liệu miễn dịch. Tuy nhiên, việc tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép thích hợp cho mục đích này tất nhiên là không đơn giản, mà có nhiều thách thức cần phải đáp ứng liên quan đến hiệu lực, độc tính, khả năng ứng dụng và sản xuất của các kháng thể này.

Các cấu trúc nhỏ, ví dụ, các phân tử BiTE – có khả năng liên kết ngang có hiệu quả các tế bào hiệu ứng và các tế bào đích – nhưng đồng thời có thời gian bán thải trong huyết thanh rất ngắn, đòi hỏi chúng phải được dùng cho bệnh nhân bằng các tiêm truyền liên tục. Các kiểu phân tử tương tự-IgG mặt khác – có lợi ích rất lớn là thời gian bán thải kéo dài nhưng đồng thời lại có độc tính liên quan đến các chức năng hiệu ứng nguyên thuỷ vốn có của các phân tử IgG. Khả năng gây miễn dịch tiềm ẩn của chúng cấu thành một dấu hiệu bất lợi khác của các kháng thể đặc hiệu kép tương tự-IgG, đặc biệt là các

kiểu phân tử không phải của người, để nghiên cứu phát triển trị liệu thành công. Cuối cùng là, một thách thức chính trong việc nghiên cứu phát triển nói chung các kháng thể đặc hiệu kép là sản xuất các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép ở lượng đủ dùng và tinh khiết cho lâm sàng, do ghép cặp sai các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể có tính đặc hiệu khác nhau khi đồng biểu hiện, việc này làm giảm hiệu suất tạo ra cấu trúc lắp ghép đúng và dẫn đến một số các sản phẩm phụ không hoạt động, mà khó có thể tách riêng kháng thể đặc hiệu kép mong muốn từ các sản phẩm này.

Với những khó khăn và bất lợi liên quan đến các kháng thể đặc hiệu kép hiện có này để trị liệu miễn dịch qua trung gian tế bào T, có nhu cầu kiểu các phân tử này mới và cải tiến. Sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép được thiết kế để hoạt hoá và định hướng lại tế bào T mà kết hợp được hiệu lực và khả năng sản xuất với độc tính thấp và các tính chất dược động học thuận lợi.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm:

(i) phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10;

(ii) phần gắn kết kháng nguyên thứ hai là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên tế bào đích.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33 và một chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 31.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có một trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có một trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7.

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên phôi gây ung thư (CEA, CEACAM5) và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30.

Theo một phương án cụ thể khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án cụ thể khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP (CSPG4) và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 40 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 và SEQ ID NO: 50.

Theo một phương án cụ thể khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với Proteoglycan Chondroitin Sulfat có liên quan đến u melanin (MCSP, CSPG4) và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án cụ thể khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit

amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 41 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 51.

Theo một phương án cụ thể khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17.

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi hoặc vùng ổn định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị. Theo một phương án cụ thể hơn, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo trong đó các vùng ổn định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab thông thường.

Theo một phương án cụ thể hơn nữa, không nhiều hơn một phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 có mặt trong phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (có nghĩa là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T tạo ra gắn kết hoá trị một với CD3).

Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T này còn bao gồm một phần gắn kết kháng nguyên thứ ba là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên tế bào đích. Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ ba này là phân tử Fab thông thường. Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ ba này là giống với phần gắn kết kháng nguyên thứ hai.

Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T này còn bao gồm một phần gắn kết kháng nguyên thứ ba là một phân tử Fab có

khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA, và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30.

Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T này còn bao gồm một phần gắn kết kháng nguyên thứ ba là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA, và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T này còn bao gồm một phần gắn kết kháng nguyên thứ ba là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP, và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 40 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 và SEQ ID NO: 50.

Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T này còn bao gồm một phần gắn kết kháng nguyên thứ ba là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP, và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T này còn bao gồm một phần gắn kết kháng nguyên thứ ba là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP, và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 41 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự

axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 51.

Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T này còn bao gồm một phần gắn kết kháng nguyên thứ ba là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP, và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17.

Theo một vài phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dung hợp với nhau, tuỳ ý bằng một liên kết peptit. Theo một phương án trong số này, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Theo một phương án khác này, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo các phương án, trong đó (i) phần gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất hoặc (ii) phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai, ngoài ra chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có thể dung hợp với nhau, tuỳ ý bằng một liên kết peptit.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T này còn bao gồm (iii) một miền Fc bao gồm cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng kết hợp ổn định.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Theo một phương án khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận

cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T lần lượt được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong số các cấu trúc dưới phân tử của miền Fc.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba của phân tử gắn kết kháng nguyên hoạt hoá tế bào T lần lượt được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong số các cấu trúc dưới phân tử của miền Fc, và phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo một phương án cụ thể khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ ba của phân tử gắn kết kháng nguyên hoạt hoá tế bào T lần lượt được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong số các cấu trúc dưới phân tử của miền Fc, và phần gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Các cấu phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được dung hợp trực tiếp hoặc thông qua các liên kết peptit thích hợp. Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ ba và miền Fc là một phần của phân tử globulin miễn dịch.

Theo một phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch là globulin miễn dịch nhóm IgG. Theo một phương án cụ thể hơn, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch phân nhóm IgG_1. Theo một phương án khác, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch phân nhóm IgG_4.

Theo một phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc của IgG. Theo một phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc của IgG_1. Theo một phương án cụ thể khác, miền Fc là miền Fc của IgG_4. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, miền Fc là miền Fc của IgG_4 bao gồm thay thế axit amin S228P (cách đánh số Kabat). Theo các phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc của người.

Theo các phương án cụ thể, miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp giữa cấu trúc dưới phân tử miền Fc thứ nhất và thứ hai. Theo một phương án cụ thể, gốc axit amin trong miền CH3 thuộc cấu trúc dưới phân tử của miền Fc được thay thế bằng gốc axit amin có kích cỡ mạch bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra một nốt phồng trong miền CH3 thuộc cấu trúc dưới phân tử mà có thể ăn khớp vào vị trí trong khoang trống thuộc miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ hai, và gốc axit amin trong miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc được thay thế bằng gốc axit amin có kích cỡ mạch bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra khoang trống trong miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ hai trong đó nốt phồng trong miền CH3 thuộc cấu trúc dưới phân tử là có thể khớp vào vị trí lồi lên đó.

Theo một phương án cụ thể, miền Fc thể hiện ái lực gắn kết giảm đối với một thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng giảm, so với miền Fc của IgG_1 nguyên thuỷ. Theo một vài phương án, miền Fc được xử lý có ái lực gắn kết giảm đối với một thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng giảm, so với miền Fc không được xử lý. Theo một phương án, miền Fc bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin làm giảm gắn kết đối với một thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng. Theo một phương án, một hoặc nhiều thay thế axit amin trong miền Fc mà làm giảm mức gắn kết đối với một thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng là ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm L234, L235, và P329 (cách đánh số Kabat). Theo các phương án cụ thể, mỗi cấu trúc dưới phân tử của miền Fc bao gồm ba thay thế axit amin làm giảm mức gắn kết đối với một thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng trong đó các thay thế axit amin này là L234A, L235A và P329G. Theo một phương án này, miền Fc là miền Fc của IgG_1 Fc, cụ thể là miền Fc của IgG_1 của người. Theo các phương án khác, mỗi cấu trúc dưới phân tử của miền Fc bao gồm hai thay thế axit amin làm giảm mức gắn kết đối với một thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng trong đó các thay thế axit amin này là L235E và P329G. Theo một phương án này, miền Fc là miền Fc của IgG_4, cụ thể là miền Fc của IgG_4 của người. Theo một phương án, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là miền Fc của IgG_4 và bao gồm các thay thế axit amin L235E và S228P (SPLE).

Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc của người. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hoá. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là FcγRIIa, FcγRI, và/hoặc FcγRIIIa của người. Theo một

phương án, chức năng hiệu ứng là độc tính gây độc tế bào qua trung gian-tế bào phụ thuộc-kháng thể (ADCC).

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập được mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế hoặc mảnh của nó. Sáng chế cũng bao gồm các polypeptit được mã hoá bởi các polynucleotit của sáng chế. Sáng chế còn đề cập đến vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit phân lập được của sáng chế, và tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit phân lập được hoặc vectơ biểu hiện của sáng chế. Theo một vài phương án, tế bào vật chủ là tế bào có nhân điển hình, cụ thể là tế bào động vật có vú.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế, bao gồm các bước a) nuôi cấy tế bào vật chủ của sáng chế trong điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và b) thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T. Sáng chế cũng bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được sản xuất bằng phương pháp của sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế và chất mang dược dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và dược phẩm của sáng chế. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T hoặc dược phẩm của sáng chế để sử dụng làm thuốc. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T hoặc dược phẩm theo sáng chế để sử dụng điều trị bệnh ở đối tượng cần điều trị này. Theo một phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư.

Sáng chế cũng đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế để sản xuất thuốc nhằm điều trị bệnh ở đối tượng cần điều trị này; cũng như phương pháp điều trị bệnh ở đối tượng, bao gồm cho đối tượng này dùng một lượng có hiệu quả điều trị của chế phẩm bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế ở dạng dược dụng. Theo một phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, đối tượng này tốt hơn là động vật có vú, cụ thể là người.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp gây cảm ứng phân giải tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u, bao gồm cho tế bào đích tiếp xúc với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế với sự có mặt của tế bào T, cụ thể là tế bào T gây độc tế bào.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 mô tả các cấu hình minh hoạ của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép (TCB) hoạt hoá tế bào T của sáng chế. (A) Minh hoạ phân tử "1+1 IgG Crossfab". (B) Minh hoạ phân tử "2+1 IgG Crossfab". (C) Minh hoạ phân tử "2+1 IgG Crossfab" với thứ tự khác của các thành phần Crossfab và Fab ("nghịch đảo"). (D) Minh hoạ phân tử "1+1 CrossMab". (E) Minh hoạ phân tử "2+1 IgG Crossfab, chuỗi nhẹ được liên kết". (F) Minh hoạ phân tử "1+1 IgG Crossfab, chuỗi nhẹ được liên kết". (G) Minh hoạ phân tử "2+1 IgG Crossfab, nghịch đảo, chuỗi nhẹ được liên kết". (H) Minh hoạ phân tử "1+1 IgG Crossfab, nghịch đảo, chuỗi nhẹ được liên kết". Chấm tròn đen: cải biến tuỳ ý ở miền Fc thúc đẩy dị đime hoá.

FIG. 2 mô tả việc sắp thẳng mạch các dòng kháng-MCSP được làm trưởng thành ái lực so với dòng gốc chưa trưởng thành (M4-3 ML2).

FIG. 3 mô tả hình vẽ giản lược của phân tử MCSP TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo).

FIG. 4 mô tả kết quả phân tích CE-SDS của MCSP TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo, các SEQ ID NO: 12, 53, 54 và 55). Điện di đồ được thể hiện là SDS-Page của MCSP TCB: A) không khử, B) có khử.

FIG. 5 mô tả hình vẽ giản lược của phân tử CEA TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo).

FIG. 6 mô tả kết quả phân tích CE-SDS của phân tử CEA TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo, các SEQ ID NO: 22, 56, 57 và 58). Điện di đồ được thể hiện là SDS-Page của CEA TCB: A) không khử, B) có khử.

FIG. 7 mô tả sự gắn kết của MCSP TCB (SEQ ID NO: 12, 53, 54 và 55) với tế bào A375 ($MCSP^+$) (A) và Jurkat (các tế bào $CD3^+$) (B). "TCB không được nhắm đích": kháng thể đặc hiệu kép tiếp hợp CD3 nhưng không tiếp hợp kháng nguyên thứ hai (các SEQ ID NO: 59, 60, 61 và 62).

FIG. 8 mô tả việc giết tế bào T gây cảm ứng bởi kháng thể MCSP TCB (các SEQ ID NO: 12, 53, 54 và 55) của A375 (MCSP cao) (A), MV-3 (MCSP trung bình) (B), HCT-116 (MCSP thấp) (C) và LS180 (MCSP âm tính) (D) các tế bào đích (E:T = 10:1, các tế bào hiệu ứng các PBMC của người, thời gian ủ 24 giờ). "TCB không được nhắm đích": kháng thể đặc hiệu kép tiếp hợp CD3 nhưng không tiếp hợp kháng nguyên thứ hai (các SEQ ID NO: 59, 60, 61 và 62).

FIG. 9 mô tả sự điều hoà tăng CD25 và CD69 trên các tế bào T $CD8^+$ (A, B) và $CD4^+$ (C, D) của người sau khi giết các tế bào khối u melanin MV3 qua trung gian tế bào T (E:T = 10:1, ủ 24 giờ) được gây cảm ứng bởi kháng thể MCSP TCB (các SEQ ID NO: 12, 53, 54 và 55). "TCB không được nhắm đích": kháng thể đặc hiệu kép tiếp hợp CD3 nhưng không tiếp hợp kháng nguyên thứ hai (các SEQ ID NO: 59, 60, 61 và 62).

FIG. 10 mô tả việc tiết IL-2 (A), IFN-γ (B), TNFα (C), IL-4 (D), IL-10 (E) và Granzyme B (F) bởi các PBMC của người sau khi sau khi giết các tế bào u melain MV3 qua trung gian tế bào T (E:T = 10:1, ủ 24 giờ) được gây cảm ứng bởi kháng thể MCSP TCB (các SEQ ID NO: 12, 53, 54 và 55). "TCB không được nhắm đích": kháng thể đặc hiệu kép tiếp hợp CD3 nhưng không tiếp hợp kháng nguyên thứ hai (các SEQ ID NO: 59, 60, 61 và 62).

FIG. 11 mô tả sự gắn kết CEA TCB (các SEQ ID NO: 22, 56, 57 và 58) với tế bào ung thư tuyến phổi A549 biểu hiện-CEA (A) và các dòng tế bào lympho T của khỉ đuôi dài và của người được làm bất tử biểu hiện-CD3 (Jurkat (B) và HSC-F (C)).

FIG. 12 mô tả việc giết tế bào T gây cảm ứng bởi CEA TCB (các SEQ ID NO: 22, 56, 57 và 58) của các tế bào HPAFII (CEA cao) (A, E), BxPC-3 (CEA trung bình) (B, F), ASPC-1 (CEA thấp) (C, G) và các tế bào HCT-116 (CEA âm tính) (D, H). E:T = 10:1, các tế bào hiệu ứng các PBMC của người, thời gian ủ 24 giờ (A-D) hoặc 48 giờ (E-H). "TCB không được nhắm đích": kháng thể đặc hiệu kép tiếp hợp CD3 nhưng không tiếp hợp kháng nguyên thứ hai (các SEQ ID NO: 59, 60, 61 và 62).

FIG. 13 mô tả sự tăng sinh tế bào T $CD8^+$ và $CD4^+$ (A-D) và điều hoà tăng CD25 trên các tế bào T $CD8^+$ và CD4 của người (E-H) 5 ngày sau khi giết các tế bào HPAFII (CEA cao) (A, E), BxPC-3 (CEA trung bình) (B, F), ASPC-1 (CEA thấp) (C, G) và HCT-116 (CEA âm tính) (D, H) qua trung gian-tế bào T gây cảm ứng bởi CEA TCB (các

SEQ ID NO: 22, 56, 57 và 58). "DP47 TCB": kháng thể đặc hiệu kép tiếp hợp CD3 nhưng không tiếp hợp kháng nguyên thứ hai (các SEQ ID NO: 59, 60, 61 và 62).

FIG. 14 mô tả việc tiết IFN-γ (A), TNFα (B), Granzyme B (C), IL-2 (D), IL-6 (E) và IL-10 (F) sau khi giết các tế bào khối u MKN45 qua trung gian tế bào (E:T = 10:1, ủ 48 giờ) gây cảm ứng bởi CEA TCB (các SEQ ID NO: 22, 56, 57 và 58). "TCB không được nhắm đích": kháng thể đặc hiệu kép tiếp hợp CD3 nhưng không tiếp hợp kháng nguyên thứ hai (các SEQ ID NO: 59, 60, 61 và 62).

FIG. 15 mô tả việc giết các tế bào đích khối u LS180 biểu hiện-CEA qua trung gian-tế bào T được gây cảm ứng bởi CEA TCB (các SEQ ID NO: 22, 56, 57 và 58) với sự có mặt của shed CEA (sCEA) với nồng độ tăng dần, được phát hiện 24 giờ (A) hoặc 48 giờ (B) sau khi ủ với CEA TCB và sCEA.

FIG. 16 mô tả việc giết các tế bào (ung thư tuyến phổi) A549 qua trung gian-tế bào T có biểu hiện quá mức CEA của người (A549-hCEA), được đánh giá 21 giờ (A, B) và 40 giờ (C, D) sau khi ủ với CEA TCB (các SEQ ID NO: 22, 56, 57 và 58) và các PBMC của người (A, C) hoặc các PBMC của khỉ đuôi dài (B, D) làm các tế bào hiệu ứng.

FIG. 17 mô tả việc giết các dòng tế bào ung thư đại tràng của người biểu hiện-CEA qua trung gian-tế bào T được gây cảm ứng bởi CEA TCB (các SEQ ID NO: 22, 56, 57 và 58) ở 0,8 nM (A), 4 nM (B) và 20 nM (C). (D) tương quan giữa mức biểu hiện CEA và % phân giải đặc hiệu ở 20 nM của CEA TCB, (E) tương quan giữa mức biểu hiện CEA và EC_{50} của CEA TCB.

FIG. 18 mô tả hiệu lực kháng-khối u in vivo của CEA TCB (các SEQ ID NO: 22, 56, 57 và 58) ở caxinoma ruột kết của người LS174T-fluc2 được đồng ghép với PBMC của người (tỷ lệ E:T là 5:1). Kết quả thể hiện giá trị trung bình và sai số chuẩn (SEM) của 12 chuột có kích cỡ khối u được đo bằng thước cặp (A và C) và bằng độ sinh phát quang (Total Flux, B và D) ở các nhóm nghiên cứu khác nhau. (A, B) điều trị sớm bắt đầu vào ngày 1, (C, D) điều trị muộn vào ngày 7. MCSP TCB (các SEQ ID NO: 12, 53, 54 và 55) được sử dụng làm đối chứng âm tính.

FIG. 19 mô tả hiệu lực kháng khối u in vivo của CEA TCB (các SEQ ID NO: 22, 56, 57 và 58) ở caxinoma ruột kết của người LS174T-fluc2 được đồng ghép với PBMC của người (tỷ lệ E:T là 1:1). Kết quả thể hiện giá trị trung bình và SEM từ 10 chuột có

kích cỡ khối u được đo bằng thước cặp (A) và độ sinh phát quang (Total Flux, B) ở các nhóm nghiên cứu khác nhau. MCSP TCB (các SEQ ID NO: 12, 53, 54 và 55) được sử dụng làm đối chứng âm tính.

FIG. 20 mô tả hiệu lực in vivo của CEA TCB được làm giống chuột ở mô hình khối u Panco2-huCEA đúng vị trí ở chuột chuyển gen huCD3ε/huCEA có khả năng miễn dịch.

FIG. 21 mô tả độ ổn định nhiệt của CEA TCB. Chỉ số tán xạ ánh sáng động lực học được đo trong khoảng nhiệt độ 25-75°C ở mức 0,05°C/phút. Kết quả đo lặp lại được thể hiện bằng màu ghi.

FIG. 22 mô tả độ ổn định nhiệt của MCSP TCB. Chỉ số tán xạ ánh sáng động lực học được đo trong khoảng nhiệt độ 25-75°C ở mức 0,05°C/phút. Kết quả đo lặp lại được thể hiện là đường màu ghi xám.

FIG. 23 mô tả việc giết qua trung gian-tế bào T được gây cảm ứng bởi các kháng thể MCSP TCB (các SEQ ID NO: 12, 53, 54 và 55) và MCSP 1+1 CrossMab TCB của các tế bào đích khối u (A) A375 (MCSP cao), (B) MV-3 (MCSP trung bình) và (C) HCT-116 (MCSP thấp). (D) LS180 (dòng tế bào khối u âm tính MCSP) được sử dụng làm đối chứng âm tính. Đánh giá giết tế bào khối u 24 giờ (A-D) và 48 giờ (E-H) sau khi ủ các tế bào đích với các kháng thể và các tế bào hiệu ứng (các PBMC của người).

FIG. 24 mô tả sự điều hoà tăng CD25 và CD69 trên các tế bào T $CD8^+$ và $CD4^+$ sau khi giết các tế bào khối u biểu hiện-MCSP (A375, A-D và MV-3, E-H) qua tế bào T qua trung gian các kháng thể MCSP TCB (các SEQ ID NO: 12, 53, 54 và 55) và MCSP 1+1 CrossMab TCB.

FIG. 25 mô tả kết quả phân tích CE-SDS của DP47 GS TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo = "TCB không được nhắm đích" các SEQ ID NO: 59, 60, 61 và 62) có chứa DP47 GS làm kháng thể không gắn kết và CH2527 được làm giống của người làm kháng thể kháng CD3. Điện di đồ được thể hiện là SDS-PAGE của DP47 GS TCB: A) không khử, B) có khử.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này nói chung được dùng trong lĩnh vực, trừ khi được định nghĩa khác như dưới đây.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phân tử gắn kết kháng nguyên" theo nghĩa rộng nhất của nó, để chỉ phân tử gắn kết đặc hiệu phần quyết định tính kháng nguyên. Ví dụ về các phân tử gắn kết kháng nguyên là các globulin miễn dịch và các dẫn xuất, ví dụ các mảnh của nó.

Thuật ngữ "đặc hiệu kép" có nghĩa là phân tử gắn kết kháng nguyên có thể gắn kết đặc hiệu với ít nhất hai phần quyết định tính kháng nguyên khác biệt. Thông thường, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm hai vị trí gắn kết kháng nguyên, mỗi vị trí này đặc hiệu với một phần quyết định tính kháng nguyên khác biệt. Theo một vài phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép có khả năng gắn kết đồng thời hai phần quyết định tính kháng nguyên, cụ thể là hai phần quyết định tính kháng nguyên được biểu hiện trên hai tế bào khác biệt.

Thuật ngữ "hoá trị" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ sự có mặt của số lượng vị trí gắn kết kháng nguyên quy định trong một phân tử gắn kết kháng nguyên. Do đó, thuật ngữ "gắn kết hoá trị một với kháng nguyên" chỉ sự có mặt của một (và không nhiều hơn một) vị trí gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với kháng nguyên trong phân tử gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "vị trí gắn kết kháng nguyên" chỉ vị trí, có nghĩa là một hoặc nhiều gốc axit amin, của một phân tử gắn kết kháng nguyên tạo ra tương tác với kháng nguyên. Ví dụ, vị trí gắn kết kháng nguyên của một kháng thể bao gồm các gốc axit amin từ các vùng xác định tính bổ trợ (các CDR). Một phân tử globulin miễn dịch nguyên thuỷ thông thường có hai vị trí gắn kết kháng nguyên, phân tử Fab thông thường có một vị trí gắn kết kháng nguyên duy nhất.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" chỉ phân tử polypeptit mà gắn kết đặc hiệu với phần quyết định tính kháng nguyên. Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên có thể định hướng phần tử mà nó gắn với (ví dụ phần gắn kết kháng nguyên thứ hai) đến vị trí đích, ví dụ loại tế bào khối u hoặc mô đệm khối u cụ thể có mang phần quyết định tính kháng nguyên. Theo một phương án khác, phần gắn kết kháng nguyên có thể hoạt hoá việc phát tín hiệu thông qua kháng nguyên đích của nó, ví dụ kháng nguyên phức hợp thụ thể tế bào T. Các phần gắn kết

kháng nguyên bao gồm các kháng thể và các mảnh của chúng như được xác định trong bản mô tả này. Các phần gắn kết kháng nguyên cụ thể bao gồm miền gắn kết kháng nguyên của một kháng thể, bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo một vài phương án, các phần gắn kết kháng nguyên có thể bao gồm các vùng ổn định của kháng thể như được xác định trong bản mô tả này và đã biết trong lĩnh vực này. Các vùng ổn định chuỗi nặng hữu ích bao gồm vùng bất kỳ trong số năm isotyp: α, δ, ε, γ, hoặc μ. Các vùng ổn định chuỗi nhẹ hữu ích bao gồm vùng bất kỳ trong số hai isotyp: κ và λ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phần quyết định tính kháng nguyên" đồng nghĩa với "kháng nguyên" và "epitop," và chỉ vị trí (ví dụ đoạn tiếp giáp các axit amin hoặc cấu hình đồng dạng được tạo thành bởi các vùng khác nhau của các axit amin không tiếp giáp) trên một đại phân tử polypeptit mà phần gắn kết kháng nguyên gắn kết vào, tạo thành phức hợp phần gắn kết kháng nguyên-kháng nguyên. Phần quyết định tính kháng nguyên hữu ích có thể tìm thấy, ví dụ, trên các bề mặt của các tế bào khối u, trên các bề mặt của các tế bào nhiễm virut, trên các bề mặt của các tế bào bị bệnh khác, trên bề mặt của các tế bào miễn dịch, có mặt ở dạng tự do trong huyết thanh, và/hoặc trong lưới ngoại bào (ECM). Các protein được đề cập như các kháng nguyên trong bản mô tả này (ví dụ MCSP, CEA, CD3) có thể là dạng nguyên thuỷ bất kỳ của các protein từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như các động vật linh trưởng (ví dụ người) và các động vật gặm nhấm (ví dụ chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có chỉ dẫn khác. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên là protein của người. Trong trường hợp đề cập đến một protein cụ thể trong bản mô tả này, thuật ngữ bao hàm protein chưa được xử lý có "độ dài đầy đủ", cũng như dạng bất kỳ của protein đó thu được từ quá trình xử lý trong tế bào. Thuật ngữ cũng bao hàm các biến thể có trong tự nhiên của protein này, ví dụ các biến thể ghép hoặc các biến thể alen. Các protein của người ví dụ hữu ích làm các kháng nguyên bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Chondroitin Sulfat Proteoglycan có liên quan đến u melanin (MCSP), còn được gọi là Chondroitin Sulfat Proteoglycan 4 (CSPG4, UniProt no. Q6UVK1 (version 70), NCBI RefSeq no. NP_001888.2); Kháng nguyên phôi gây ung thư (CEA), còn được gọi là phân tử bám dính tế bào có liên quan đến-kháng nguyên phôi gây ung thư 5 (CEACAM5, UniProt no. P06731 (version 119), NCBI RefSeq no. NP_004354.2); và CD3, cụ thể là cấu trúc dưới phân tử epsilon của CD3 (xem UniProt no. P07766 (version 130), NCBI RefSeq no.

NP_000724.1, SEQ ID NO: 103 cho trình tự của người; hoặc UniProt no. Q95LI5 (version 49), NCBI GenBank no. BAB71849.1, SEQ ID NO: 104 cho trình tự của khỉ đuôi dài [Macaca fascicularis]). Theo một vài phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế gắn kết với epitop của CD3 hoặc một kháng nguyên tế bào đích mà bảo toàn trong số CD3 hoặc kháng nguyên đích từ các loài khác nhau. Theo một vài phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế gắn kết với CD3 và CEACAM5, nhưng không gắn kết với CEACAM1 hoặc CEACAM6. Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" để chỉ việc gắn kết là chọn lọc đối với kháng nguyên và có thể phân biệt được với các tương tác không mong muốn hoặc không đặc hiệu. Khả năng của phần gắn kết kháng nguyên gắn kết với phần quyết định tính kháng nguyên đặc hiệu có thể được xác định bằng thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết-enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (được phân tích trên thiết bị BIAcore) (Liljeblad và các đồng tác giả, Glyco J 17, 323-329 (2000)), và các thử nghiệm gắn kết truyền thống (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Theo một phương án, mức độ gắn kết một phần gắn kết kháng nguyên với một protein không liên quan nhỏ hơn khoảng 10% so với mức gắn kết phần gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên như được xác định, ví dụ, bằng SPR. Theo một vài phương án, phần gắn kết kháng nguyên mà gắn kết với kháng nguyên, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm phần gắn kết kháng nguyên, có hằng số phân ly (K_D) là ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM, hoặc ≤ 0,001 nM (ví dụ 10^{-8} M hoặc thấp hơn, ví dụ từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M).

Thuật ngữ "ái lực" chỉ cường độ tổng cộng tất cả các tương tác không phải đồng hoá trị giữa một vị trí gắn kết duy nhất của một phân tử (ví dụ, một thụ thể) và đối tác gắn kết của nó (ví dụ, một phối tử). Trừ khi có chỉ dẫn khác, như được sử dụng trong bản mô tả này, "ái lực gắn kết" chỉ ái lực gắn kết nội tại phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của một cặp gắn kết (ví dụ, phần gắn kết kháng nguyên và kháng nguyên, hoặc thụ thể và phối tử của nó). Ái lực của một phân tử X đối với đối tác Y của nó nói chung có thể được biểu thị bằng hằng số phân ly (K_D), là tỷ số giữa hằng số tốc độ phân ly và kết hợp (tương ứng là k_{off} và k_{on}). Do đó, các ái lực tương đương có thể bao gồm các hằng số tốc độ khác nhau, miễn là tỷ số của các hằng số tốc độ này không thay đổi. Có thể xác định ái lực bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các

phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Phương pháp cụ thể để xác định ái lực là phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

"Gắn kết giảm", ví dụ gắn kết giảm đối với một thụ thể Fc, chỉ giảm ái lực đối với tương tác tương ứng, như được xác định ví dụ bằng SPR. Để rõ hơn, thuật ngữ cũng bao gồm giảm ái lực đến bằng không (hoặc thấp hơn ngưỡng phát hiện của phương pháp phân tích), có nghĩa là hoàn toàn không có tương tác. Ngược lại, thuật ngữ "gắn kết gia tăng" chỉ sự gia tăng ái lực gắn kết đối với tương tác tương ứng.

Thuật ngữ "hoạt hoá tế bào T" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ một hoặc nhiều đáp ứng tế bào của lympho bào T, cụ thể là lympho bào T gây độc tế bào, được chọn từ: tăng sinh, biệt hoá, bài tiết xytokin, giải phóng phân tử hiệu ứng gây độc tế bào, hoạt tính gây độc tế bào, và biểu hiện các chất đánh dấu hoạt hoá. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế có khả năng gây cảm ứng hoạt hoá tế bào T. Các thử nghiệm thích hợp để xác định mức hoạt hoá tế bào T là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "kháng nguyên tế bào đích" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ phần quyết định tính kháng nguyên được trình diện trên bề mặt của một tế bào đích, ví dụ tế bào trong khối u, như tế bào ung thư hoặc tế bào mô đệm khối u.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thứ nhất" và "thứ hai" liên quan đến các phần gắn kết kháng nguyên v.v., được sử dụng để tiện phân biệt khi có nhiều hơn một loại phần gắn kết. Việc sử dụng các thuật ngữ này không nhằm chỉ thứ bậc đặc hiệu hoặc định hướng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trừ khi có chỉ rõ.

Thuật ngữ "phân tử Fab" chỉ protein gồm có miền VH và CH1 của chuỗi nặng ("chuỗi nặng Fab") và miền VL và CL của chuỗi nhẹ ("chuỗi nhẹ Fab") của một globulin miễn dịch.

Thuật ngữ "được dung hợp" có nghĩa là các thành phần (ví dụ phân tử Fab và cấu trúc dưới phân tử miền Fc) được nối với nhau bởi các liên kết peptit, trực tiếp hoặc qua một hoặc nhiều liên kết peptit.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "mạch đơn" chỉ phân tử bao gồm các monome axit amin được nối mạch thẳng bằng các liên kết peptit. Theo một vài

phương án, một trong số các phần gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab mạch đơn, có nghĩa là phân tử Fab trong đó chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được nối với nhau bằng liên kết peptit để tạo thành mạch đơn peptit. Theo một phương án cụ thể này, đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ Fab được nối với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab trong phân tử Fab mạch đơn.

Thuật ngữ phân tử Fab "lai chéo" (còn được gọi là "Crossfab") chỉ phân tử Fab trong đó các vùng biến đổi hoặc các vùng ổn định chuỗi nặng Fab và chuỗi nhẹ Fab được hoán vị, có nghĩa là phân tử Fab lai chéo bao gồm mạch peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng ổn định chuỗi nặng, và mạch peptit gồm có chuỗi nặng vùng biến đổi và chuỗi nhẹ vùng ổn định. Để rõ hơn, trong phân tử Fab lai chéo trong đó các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị, mạch peptit gồm có vùng ổn định chuỗi nặng trong bản mô tả này được gọi là "chuỗi nặng" của phân tử Fab lai chéo. Ngược lại, trong phân tử Fab lai chéo trong đó các vùng ổn định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị, mạch peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng trong bản mô tả này được gọi là "chuỗi nặng" của phân tử Fab lai chéo.

Trái lại, thuật ngữ phân tử Fab "thông thường" chỉ phân tử Fab ở dạng tự nhiên của nó, có nghĩa là bao gồm chuỗi nặng gồm có vùng biến đổi và vùng ổn định chuỗi nặng (VH-CH1), và chuỗi nhẹ gồm có vùng biến đổi và vùng ổn định chuỗi nhẹ (VL-CL).

Thuật ngữ "phân tử globulin miễn dịch" chỉ protein có cấu trúc của một kháng thể có trong tự nhiên. Ví dụ, các globulin miễn dịch của nhóm IgG là các glycoprotein dị tetrame khoảng 150.000 dalton, gồm có hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng được liên kết đisulfua với nhau. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nặng có một vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền biến đổi chuỗi nặng hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, tiếp đó là ba miền ổn định (CH1, CH2, và CH3), còn được gọi là vùng ổn định chuỗi nặng. Tương tự, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nhẹ có một vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền chuỗi nhẹ hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, tiếp đó là miền ổn định chuỗi nhẹ (CL), còn được gọi là vùng ổn định chuỗi nhẹ. Chuỗi nặng của một globulin miễn dịch có thể là một trong năm loại, đó là α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG), hoặc μ (IgM), một vài loại trong số này còn được chia thành các phân nhóm, ví dụ γ_1 (IgG_1), γ_2 (IgG_2), γ_3 (IgG_3), γ_4 (IgG_4), α_1 (IgA_1) và α_2 (IgA_2). Chuỗi nhẹ của globulin

miễn dịch có thể là một trong hai loại, đó là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của miền ổn định của nó. Globulin miễn dịch về cơ bản gồm có hai phân tử Fab và một miền Fc, được nối với nhau qua vùng bản lề của globulin miễn dịch.

Thuật ngữ "kháng thể" trong bản mô tả này được sử dụng theo nghĩa rộng và bao hàm nhiều cấu trúc kháng thể, bao gồm nhưng không giới hạn ở, các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, và các mảnh kháng thể miễn là chúng có hoạt tính gắn kết kháng nguyên mong muốn.

Thuật ngữ "mảnh kháng thể" chỉ phân tử không phải là một kháng thể nguyên vẹn mà bao gồm một đoạn của kháng thể nguyên vẹn gắn kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn có gắn kết với. Ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm nhưng không giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, các kháng thể dạng dime đặc hiệu kép, các kháng thể mạch thẳng, các phân tử kháng thể mạch đơn (ví dụ scFv), và các kháng thể đơn miền. Tham khảo về các mảnh kháng thể, xem tài liệu: Nat Med 9, 129-134 (2003) của Hudson và các đồng tác giả. Tham khảo về các mảnh scFv, xem ví dụ tài liệu: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg và Moore biên tập, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) của Plückthun; Công bố đơn đề nghị cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế số WO 93/16185; và các Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 5,571,894 và 5,587,458. Tài liệu tham khảo về các mảnh Fab và $F(ab')_2$ bao gồm các gốc epitop gắn kết thụ thể dự phòng và có thời gian bán thải *in vivo* gia tăng, tham khảo Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 5,869,046. Các kháng thể dạng dime đặc hiệu kép là các mảnh kháng thể với hai vị trí gắn kết kháng nguyên có thể là hiệu giá kép hoặc đặc hiệu kép. Tham khảo, ví dụ, Bằng độc quyền sáng chế Châu Âu số 404,097; Công bố đơn đề nghị cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế số WO 1993/01161; Nat Med 9, 129-134 (2003) của Hudson và các đồng tác giả; và Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993) của Hollinger và các đồng tác giả. Các kháng thể tam đặc hiệu và kháng thể tứ đặc hiệu cũng được mô tả trong Nat Med 9, 129-134 (2003) của Hudson và các đồng tác giả. Các kháng thể đơn miền là các mảnh kháng thể bao gồm toàn bộ hoặc một đoạn của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc toàn bộ hoặc một đoạn của miền biến đổi chuỗi nhẹ của một kháng thể. Theo một vài phương án, kháng thể mạch đơn là kháng thể mạch đơn của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; tham khảo, ví dụ Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 6,248,516 B1). Các mảnh kháng thể có thể được điều chế bằng nhiều kỹ thuật, bao gồm nhưng không giới hạn ở thuỷ phân phân giải protein kháng thể nguyên vẹn cũng như sản

sinh bởi các tế bào vật chủ tái tổ hợp (ví dụ E. coli hoặc thể thực khuẩn), như được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "miền gắn kết kháng nguyên" chỉ phần của kháng thể bao gồm vùng gắn kết đặc hiệu với và bổ trợ với một phần hoặc toàn bộ kháng nguyên. Miền gắn kết kháng nguyên có thể được tạo ra bởi, ví dụ, một hoặc nhiều miền biến đổi kháng thể (còn được gọi là các vùng biến đổi kháng thể). Cụ thể là, miền gắn kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH).

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ kháng thể mà tham gia vào quá trình gắn kết kháng thể với kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (tương ứng là VH và VL) của một kháng thể nguyên thuỷ nói chung có cấu trúc tương tự nhau, với mỗi miền bao gồm bốn vùng khung bảo toàn (các FR) và ba vùng siêu biến (các HVR). Xem, ví dụ, Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman và Co., trang 91 (2007) của Kindt và các đồng tác giả. Miền VH hoặc VL đơn nhất có thể là đủ để mang lại tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "HVR", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ một trong các vùng của miền biến đổi kháng thể mà có siêu biến về trình tự và/hoặc các quai xác định cấu trúc hình dạng ("các quai siêu biến"). Nói chung, các kháng thể bốn chuỗi nguyên thuỷ bao gồm sáu HVR; ba ở VH (H1, H2, H3), và ba ở VL (L1, L2, L3). Các HVR nói chung bao gồm các gốc axit amin từ các quai siêu biến và/hoặc từ các vùng xác định tính bổ trợ (các CDR), các vùng này có mức độ thay đổi trình tự cao nhất và/hoặc tham gia vào nhận biết kháng nguyên. Trừ CDR1 ở VH, các CDR nói chung bao gồm các gốc axit amin tạo thành các vòng siêu biến. Các vùng siêu biến (các HVR) còn được gọi là "các vùng xác định tính bổ trợ" (các CDR), và các thuật ngữ này được dùng hoán đổi trong bản mô tả này để chỉ các đoạn của vùng biến đổi tạo thành các vùng gắn kết kháng nguyên. Vùng cụ thể này đã được Kabat và các đồng tác giả mô tả trong tài liệu: Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) của U.S. Dept. of Health and Human Services, và J Mol Biol 196:901-917 (1987), của Chothia và các đồng tác giả, trong đó các định nghĩa bao gồm đoạn trùng lặp hoặc các phân nhóm các gốc axit amin khi so sánh với nhau. Tuy nhiên, áp dụng một trong hai định nghĩa để chỉ một CDR của

một kháng thể hoặc biến thể của nó là dự định trong phạm vi của các thuật ngữ như được xác định và sử dụng trong bản mô tả này. Các gốc axit amin thích hợp bao gồm các CDR như được xác định trong các tài liệu nêu trên được nêu trong Bảng A để so sánh. Số gốc chính xác bao gồm một CDR cụ thể sẽ thay đổi tuỳ thuộc vào trình tự và kích cỡ của CDR đó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thông thường có thể xác định những gốc nào bao gồm một CDR cụ thể với trình tự axit amin vùng biến đổi của kháng thể đó.

Bảng A: Định nghĩa CDR[1]

CDR	Kabat	Chothia	AbM[2]
V_H CDR1	31-35	26-32	26-35
V_H CDR2	50-65	52-58	50-58
V_H CDR3	95-102	95-102	95-102
V_L CDR1	24-34	26-32	24-34
V_L CDR2	50-56	50-52	50-56
V_L CDR3	89-97	91-96	89-97

[1] Cách đánh số của tất cả các định nghĩa về CDR trong Bảng A là theo quy ước đánh số của Kabat và các đồng tác giả (xem bên dưới).

[2] "AbM" với chữ cái "b" viết thường như được sử dụng trong Bảng A chỉ các CDR như được xác định bởi phần mềm xây dựng mô hình kháng thể "AbM" của Oxford Molecular.

Kabat và các đồng tác giả cũng xác định một hệ thống đánh số cho các trình tự vùng biến đổi có thể áp dụng cho kháng thể bất kỳ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể gọi hệ thống này là "cách đánh số Kabat" cho trình tự vùng biến đổi bất kỳ, mà không cần phải dựa vào các dữ liệu thực nghiệm ngoài bản thân trình tự đó. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "cách đánh số Kabat" chỉ hệ thống đánh số của Kabat và các đồng tác giả, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of

Proteins of Immunological Interest" (1983). Trừ khi có quy định khác, dẫn chiếu đến cách đánh số của các vị trí gốc axit amin cụ thể trong một vùng biến đổi của kháng thể là theo hệ thống đánh số Kabat.

Các trình tự polypeptit trong danh mục trình tự là không được đánh số theo hệ thống đánh số Kabat. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể chuyển đổi cách đánh số các trình tự trong danh mục trình tự thành cách đánh số Kabat.

"Khung" hoặc "FR" chỉ các gốc miền biến đổi không phải là các gốc vùng siêu biến (HVR). FR của một miền biến đổi nói chung gồm có bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Do đó, các trình tự HVR và FR nói chung xuất hiện trong trình tự dưới đây ở VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Thuật ngữ "nhóm" kháng thể hoặc globulin miễn dịch chỉ loại miền ổn định hoặc vùng ổn định của chuỗi nặng của nó. Có năm nhóm kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài nhóm trong số này có thể chia thành các phân nhóm (isotyp), ví dụ, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, và IgA_2. Miền ổn định chuỗi nặng mà tương ứng với các nhóm khác nhau của các globulin miễn dịch tương ứng được gọi là α, δ, ε, γ, và μ.

Thuật ngữ "miền Fc" hoặc "vùng Fc" trong bản mô tả này để chỉ vùng đầu tận cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch có chứa ít nhất một đoạn của vùng ổn định. Thuật ngữ này bao gồm các vùng Fc trình tự nguyên thuỷ và các vùng Fc biến thể. Mặc dù biên giới của vùng Fc của chuỗi nặng IgG có thể thay đổi ít nhiều, vùng Fc chuỗi nặng IgG của người thường được xác định kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận cùng C (Lys447) của vùng Fc có thể có mặt hoặc không có mặt. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này, cách đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng ổn định là theo hệ thống đánh số của EU, còn được gọi là chỉ số EU, như Kabat và các đồng tác giả mô tả trong tài liệu: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Một "cấu trúc dưới phân tử" của một miền Fc như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ một trong số hai polypeptit tạo thành miền Fc đime, có nghĩa là polypeptit bao gồm các vùng ổn định đầu tận cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch, có khả năng tự kết hợp ổn định. Ví dụ, cấu trúc dưới phân tử của miền Fc IgG bao gồm CH2 IgG và miền ổn định CH3 IgG.

Thuật ngữ "cải biến thúc đẩy sự kết hợp giữa cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc" là xử lý các cải biến mạch chính peptit hoặc sau dịch mã của một cấu trúc dưới phân tử miền Fc mà làm giảm hoặc ngăn ngừa sự kết hợp của một polypeptit bao gồm cấu trúc dưới phân tử miền Fc với polypeptit giống hệt để tạo thành đồng đime. Một cải biến thúc đẩy sự kết hợp như được sử dụng trong bản mô tả này cụ thể là bao gồm các cải biến riêng biệt được tạo ra đối với một trong hai cấu trúc dưới phân tử miền Fc được mong muốn cần kết hợp (có nghĩa là cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc), trong đó các cải biến là bổ trợ cho nhau sao cho thúc đẩy sự kết hợp hai cấu trúc dưới phân tử miền Fc. Ví dụ, cải biến thúc đẩy kết hợp có thể làm biến đổi cấu trúc hoặc điện tích của một hoặc cả hai cấu trúc dưới phân tử của miền Fc sao cho sự kết hợp chúng tương ứng sẽ có lợi về mặt không gian hoặc ổn định về điện tích. Do đó, (dị)đime hoá xảy ra giữa một polypeptit bao gồm cấu trúc dưới phân tử miền Fc thứ nhất và một polypeptit bao gồm cấu trúc dưới phân tử miền Fc thứ hai, mà có thể là không đồng nhất với nhau theo nghĩa là các thành phần khác nữa được dung hợp với một trong hai cấu trúc dưới phân tử này (ví dụ các phần gắn kết kháng nguyên) là không giống nhau. Theo một vài phương án, cải biến thúc đẩy kết hợp bao gồm một đột biến axit amin ở miền Fc, cụ thể là thay thế axit amin. Theo một phương án cụ thể, cải biến thúc đẩy kết hợp bao gồm đột biến axit amin riêng biệt, cụ thể là thay thế axit amin, ở một trong số hai cấu trúc dưới phân tử của miền Fc.

Thuật ngữ "các chức năng hiệu ứng" chỉ các hoạt tính sinh học do vùng Fc của một kháng thể, mà có thể thay đổi theo isotyp kháng thể. Ví dụ về các chức năng hiệu ứng của kháng thể bao gồm: gắn kết C1q và độc tính gây độc tế bào tuỳ thuộc bổ thể (CDC), gắn kết thụ thể Fc, độc tính gây độc tế bào qua trung gian-tế bào tuỳ thuộc kháng thể (ADCC), thực bào tế bào tuỳ thuộc-kháng thể (ADCP), bài tiết xytokin, hấp thụ kháng nguyên qua trung gian-phức hợp miễn dịch bởi các tế bào trình diện kháng nguyên, điều tiết giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B), và hoạt hoá tế bào B.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "xử lý, được xử lý" bao gồm xử lý cải biến mạch chính peptit hoặc sau dịch mã của một polypeptit có trong tự nhiên hoặc tái tổ hợp hoặc mảnh của chúng. Xử lý bao gồm các cải biến trình tự axit amin, kiểu glycosyl hoá, hoặc nhóm mạch bên của các axit amin riêng lẻ, cũng như tổ hợp của các cách xử lý này.

Thuật ngữ "đột biến axit amin" như được sử dụng trong bản mô tả này bao hàm các thay thế, khuyết đoạn, cài xen, và cải biến axit amin. Tổ hợp bất kỳ thay thế, khuyết đoạn, cài xen, và cải biến có thể được tiến hành để có được cấu trúc cuối cùng, miễn là cấu trúc này có các đặc tính mong muốn, ví dụ, gắn kết giảm đối với một thụ thể Fc, hoặc kết hợp gia tăng với một peptit khác. Các khuyết đoạn và cài xen trình tự axit amin bao gồm khuyết đoạn và cài xen các axit amin đầu tận cùng-amino và/hoặc -carboxy. Các đột biến axit amin cụ thể là các thay thế axit amin. Nhằm mục đích làm thay đổi ví dụ các đặc tính gắn kết của vùng Fc, các thay thế axit amin không bảo toàn, có nghĩa là thay thế một axit amin bằng một axit amin khác có các tính chất về cấu trúc và/hoặc hoá học khác biệt, là được đặc biệt ưu tiên. Các thay thế axit amin bao gồm thay thế các axit amin không có trong tự nhiên hoặc các dẫn xuất axit amin có trong tự nhiên của hai mươi axit amin tiêu chuẩn (ví dụ 4-hydroxyprolin, 3-metylhistidin, ornithin, homoserin, 5-hydroxylysin). Đột biến axit amin có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp di truyền hoặc hoá học đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp di truyền có thể bao gồm phương pháp gây đột biến định hướng-vị trí, PCR, tổng hợp gen và phương pháp tương tự. Nên hiểu là các phương pháp làm biến đổi nhóm mạch bên của một axit amino bằng các phương pháp không phải là xử lý gen, như cải biến hoá học cũng có thể hữu ích. Nhiều cách ký hiệu khác có thể được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ cùng một đột biến axit amin. Ví dụ, thay thế prolin ở vị trí 329 của miền Fc thành glyxin có thể ký hiệu là 329G, G329, G_{329}, P329G, hoặc Pro329Gly.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit" chỉ một phân tử bao gồm các monome (axit amin) được liên kết mạch thẳng bằng các liên kết amit (còn được gọi là liên kết peptit). Thuật ngữ "polypeptit" chỉ mạch bất kỳ có hai hoặc nhiều axit amin, và không chỉ độ dài cụ thể của sản phẩm này. Do đó, các peptit, đipeptit, tripeptit, oligopeptit, "protein," "mạch axit amin," hoặc thuật ngữ khác bất kỳ được sử dụng để chỉ một mạch có hai hoặc nhiều axit amin, được bao gồm trong phạm vi định nghĩa của "polypeptit," và thuật ngữ "polypeptit" có thể được sử dụng thay cho, hoặc hoán đổi với thuật ngữ bất kỳ trong số các thuật ngữ này. Thuật ngữ "polypeptit" cũng dự định để chỉ các sản phẩm của những cải biến sau biểu hiện của polypeptit này, mà không chỉ giới hạn ở glycosyl hoá, axetyl hoá, phosphoryl hoá, amit hoá, tạo dẫn xuất bằng các nhóm bảo vệ/phong bế đã biết, phân giải protein, hoặc cải biến bằng các axit amin không có trong tự nhiên. Polypeptit có thể được tạo dẫn xuất từ một nguồn sinh học tự nhiên hoặc được

sản xuất bằng công nghệ tái tổ hợp, nhưng không nhất thiết được dịch mã từ một trình tự axit nucleic được chỉ định. Polypeptit có thể được tạo ra bằng cách bất kỳ, kể cả tổng hợp hoá học. Polypeptit của sáng chế có thể có kích cỡ axit amin khoảng 3 hoặc nhiều hơn, 5 hoặc nhiều hơn, 10 hoặc nhiều hơn, 20 hoặc nhiều hơn, 25 hoặc nhiều hơn, 50 hoặc nhiều hơn, 75 hoặc nhiều hơn, 100 hoặc nhiều hơn, 200 hoặc nhiều hơn, 500 hoặc nhiều hơn, 1.000 hoặc nhiều hơn, hoặc 2.000 hoặc nhiều hơn. Các polypeptit có thể có cấu trúc ba chiều xác định, mặc dù chúng không nhất thiết có cấu trúc này. Các polypeptit với cấu trúc ba chiều xác định là được đề cập như được cuộn gập, và các polypeptit mà không có cấu trúc ba chiều xác định, mà có thể có một số lượng lớn các cấu dạng khác nhau, và là được đề cập như chưa cuộn gập.

Thuật ngữ polypeptit "phân lập được" hoặc biến thể, hoặc dẫn xuất của nó để chỉ polypeptit không có trong môi trường tự nhiên của nó. Không đòi hỏi mức độ tinh sạch cụ thể. Ví dụ, polypeptit phân lập được có thể được tách loại từ môi trường nguyên thuỷ hoặc tự nhiên của nó. Các polypeptit và protein được sản xuất bằng cách tái tổ hợp, được biểu hiện trong các tế bào vật chủ được xem là được phân lập theo sáng chế, dưới dạng các polypeptit nguyên thuỷ hoặc tái tổ hợp mà đã được tách, phân đoạn hoặc tinh chế một phần hoặc về cơ bản bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ.

"Tỷ lệ phần trăm (%) mức tương đồng trình tự axit amin" đề cập đến trình tự polypeptit tham chiếu được xác định là tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin trong trình tự khảo sát mà giống với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi sắp thẳng mạch trình tự và đưa vào các khe trống, nếu cần, để có được mức tương đồng trình tự tính theo tỷ lệ phần trăm tối đa, và không tính đến các thay thế bảo toàn là một phần của sự tương đồng trình tự. Có thể tiến hành sắp thẳng mạch để xác định tỷ lệ phần trăm mức tương đồng trình tự axit amin bằng nhiều cách trong lĩnh vực, ví dụ bằng cách sử dụng các phần mềm máy tính như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định các thông số thích hợp để sắp thẳng mạch các trình tự, kể cả các thuật toán bất kỳ để thực hiện sắp thẳng mạch trên toàn bộ độ dài của các trình tự sẽ so sánh. Cho các mục đích trong bản mô tả này, tuy nhiên, các giá trị % mức tương đồng trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 là của Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp đơn bảo hộ tại Cục Bản quyền Mỹ (U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559), đã đăng

ký theo Đăng ký Bản quyền Mỹ số TXU510087. Chương trình ALIGN-2 hiện có sẵn từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể viết lại từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 phải được viết lại để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, kể cả UNIX V4.0D kỹ thuật số. Tất cả các thông số so sánh trình tự được đặt bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi. Trong các trường hợp khi sử dụng ALIGN-2 để so sánh trình tự axit amin, % mức tương đồng trình tự axit amin của một trình tự axit amin A đã cho với trình tự axit amin B (nói cách khác, trình tự axit amin A có % mức tương đồng trình tự axit amin với trình tự axit amin B) được tính như sau:

$$100 \times X/Y$$

trong đó X là số lượng các gốc axit amin được ghi điểm là cặp giống nhau theo chương trình sắp thẳng mạch trình tự ALIGN-2 khi sắp thẳng mạch A và B, và trong đó Y là tổng số các gốc axit amin của B. Nên hiểu là độ dài trình tự axit amin A không tương đương với độ dài trình tự axit amin B, % mức tương đồng trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng % mức tương đồng trình tự axit amin của B so với A. Trừ khi có đề cập cụ thể khác, tất cả các giá trị % mức tương đồng trình tự axit amin được sử dụng trong bản mô tả này như được mô tả ở đoạn trên đây sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ "polynucleotit" chỉ phân tử hoặc cấu trúc axit nucleic được phân lập, ví dụ ARN thông tin (mARN), ARN thu được từ-virut, hoặc ADN plasmit (ADNp). Một polynucleotit có thể bao gồm liên kết phosphodieste thông thường hoặc không thông thường (ví dụ liên kết amit, như liên kết tìm thấy trong các axit nucleic của peptit (PNA). Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" chỉ một hoặc nhiều đoạn axit nucleic, ví dụ các đoạn ADN hoặc ARN, có trong một polynucleotit.

Thuật ngữ phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit "phân lập được" chỉ phân tử axit nucleic, ADN hoặc ARN, mà đã được tách loại từ môi trường nguyên thuỷ của nó. Ví dụ, polynucleotit tái tổ hợp mã hoá polypeptit có chứa trong một vectơ được xem là được phân lập theo sáng chế. Ví dụ khác về polynucleotit phân lập được bao gồm các polynucleotit tái tổ hợp được duy trì trong các tế bào vật chủ khác loài hoặc các polynucleotit được tinh chế (một phần hoặc về cơ bản) trong dung dịch. Polynucleotit phân lập được bao gồm phân tử polynucleotit có trong các tế bào thông thường có chứa phân tử polynucleotit, nhưng phân tử polynucleotit có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí trong nhiễm sắc thể khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó. Các phân tử ARN

phân lập được bao gồm các bản phiên mã ARN *in vivo* hoặc *in vitro* của sáng chế, cũng như các dạng sợi dương tính và âm tính, và các dạng sợi kép. Các polynucleotit hoặc axit nucleic phân lập được theo sáng chế còn bao gồm các phân tử được sản xuất bằng cách tổng hợp. Ngoài ra, polynucleotit hoặc axit nucleic có thể là hoặc có thể bao gồm yếu tố điều hoà như đoạn khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, hoặc đoạn kết thúc phiên mã.

Axit nucleic hoặc polynucleotit có trình tự nucleotit "tương đồng" ít nhất, ví dụ, 95% với trình tự nucleotit tham chiếu của sáng chế, nên hiểu là trình tự nucleotit của polynucleotit là tương đồng với trình tự tham chiếu trừ việc trình tự polynucleotit có thể bao gồm tối đa đến năm đột biến điểm/100 nucleotit của trình tự nucleotit tham chiếu. Nói cách khác, để thu được polynucleotit có trình tự nucleotit tương đồng ít nhất 95% với trình tự nucleotit tham chiếu, tối đa đến 5% nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được khuyết đoạn hoặc thay thế bằng một nucleotit khác, hoặc số lượng các nucleotit tối đa đến 5% trong số toàn bộ các nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được cài xen vào trình tự tham chiếu. Những thay đổi này của trình tự tham chiếu có thể ở các vị trí đầu tận cùng 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit tham chiếu hoặc ở vị trí bất kỳ giữa các vị trí đầu tận cùng này, rải rác riêng lẻ trong số các gốc trong trình tự tham chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm tiếp giáp trong trình tự tham chiếu. Thực tế là, trình tự polynucleotit cụ thể bất kỳ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nucleotit của sáng chế thông thường có thể được xác định bằng cách sử dụng các chương trình máy tính đã biết, như các chương trình nêu trên đối với các polypeptit (ví dụ ALIGN-2).

Thuật ngữ "cat-xet biểu hiện" chỉ một polynucleotit được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc bằng cách tổng hợp, với một loạt các yếu tố axit nucleic xác định cho phép phiên mã một axit nucleic trong tế bào đích. Cat-xet biểu hiện tái tổ hợp có thể được hợp nhất vào plasmit, nhiễm sắc thể, ADN ty lạp thể, ADN plastid, virut, hoặc đoạn axit nucleic. Thông thường, đoạn cat-xet biểu hiện tái tổ hợp vectơ biểu hiện bao gồm, trong số các trình tự khác, trình tự axit nucleic sẽ phiên mã và đoạn khởi đầu. Theo một vài phương án, cat-xet biểu hiện của sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit mã hoá các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép của sáng chế hoặc các mảnh của nó.

Thuật ngữ "vectơ" hoặc "vectơ biểu hiện" đồng nghĩa với "cấu trúc biểu hiện" và chỉ phân tử ADN được sử dụng để đưa vào và điều khiển việc biểu hiện một gen cụ thể,

mà nó được kết hợp có điều khiển với trong tế bào đích. Thuật ngữ bao gồm vectơ dưới dạng cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vectơ được hợp nhất vào bộ gen của tế bào vật chủ mà nó đã được đưa vào. Vectơ biểu hiện của sáng chế bao gồm cat-xet biểu hiện. Các vectơ biểu hiện cho phép phiên mã số lượng lớn các mARN ổn định. Khi vectơ biểu hiện ở trong tế bào đích, phân tử axit ribonucleic hoặc protein mà được mã hoá bởi gen được sản sinh bởi bộ máy phiên mã và/hoặc dịch mã của tế bào. Theo một phương án, vectơ biểu hiện của sáng chế bao gồm cat-xet biểu hiện mà bao gồm trình tự polynucleotit mã hoá các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép của sáng chế hoặc các mảnh của nó.

Thuật ngữ "tế bào vật chủ", "dòng tế bào vật chủ", và "dịch nuôi cấy tế bào vật chủ" được sử dụng thay thế lẫn nhau và chỉ các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh đã được đưa vào, tế bào thế hệ con cháu của các tế bào này. Các tế bào vật chủ bao gồm "các thể biến nạp" và "các tế bào biến nạp," bao gồm tế bào được biến nạp sơ cấp và các tế bào con cháu thu được từ đó bất kể số lần cấy chuyển. Các tế bào thế hệ sau có thể không hoàn toàn tương đồng về hàm lượng axit nucleic với tế bào gốc, nhưng có thể có chứa các đột biến. Các tế bào thế hệ sau đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc chọn lọc trong tế bào được biến nạp ban đầu được bao gồm trong bản mô tả này. Tế bào vật chủ là loại tế bào bất kỳ có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép của sáng chế. Các tế bào vật chủ bao gồm các tế bào được nuôi cấy, *ví dụ* các tế bào động vật có vú được nuôi cấy, như các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào NS0, các tế bào SP2/0, các tế bào u tuỷ YO, các tế bào u tuỷ P3X63 của chuột, các tế bào PER, các tế bào PER.C6 hoặc các tế bào lai, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, và các tế bào thực vật, kể cả các tế bào có trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen, hoặc thực vật hoặc mô động vật được nuôi cấy.

Thuật ngữ “thụ thể Fc hoạt hoá” là thụ thể Fc sau khi liên hợp bởi một miền Fc của một kháng thể sẽ phát các sự kiện tín hiệu kích thích tế bào mang thụ thể thực hiện các chức năng hiệu ứng. Thụ thể Fc hoạt hoá của người bao gồm FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), và FcαRI (CD89).

Độc tính gây độc tế bào qua trung gian-tế bào tuỳ thuộc kháng thể (ADCC) là một cơ chế miễn dịch dẫn đến phân giải các tế bào đích được bao phủ-kháng thể bởi các tế bào hiệu ứng miễn dịch. Các tế bào đích là các tế bào mà các kháng thể hoặc các dẫn xuất

của chúng bao gồm vùng Fc gắn kết đặc hiệu với, nói chung qua phần protein ở đầu tận cùng N đối với vùng Fc. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ADCC giảm" được xác định là giảm số lượng các tế bào đích bị phân giải trong một khoảng thời gian xác định, ở nồng độ đã cho của kháng thể trong môi trường xung quanh các tế bào đích, theo cơ chế của ADCC được xác định ở trên, và/hoặc tăng nồng độ kháng thể trong môi trường xung quanh các tế bào đích, cần thiết để đạt được sự phân giải số lượng nhất định các tế bào đích trong một khoảng thời gian xác định, theo cơ chế ADCC. Giảm ADCC là liên quan đến ADCC qua trung gian cùng kháng thể này được sản sinh bởi cùng loại các tế bào vật chủ, sử dụng cùng các phương pháp sản xuất, tinh chế, bào chế và bảo quản (là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật), nhưng chưa được xử lý. Ví dụ giảm ADCC qua trung gian một kháng thể bao gồm trong miền Fc của nó một thay thế axit amin làm giảm ADCC, là liên quan đến ADCC qua trung gian cùng kháng thể này mà không có thay thế axit amin này trong miền Fc. Các thử nghiệm thích hợp để xác định ADCC là đã biết trong lĩnh vực này (xem công bố đơn PCT số WO 2006/082515 hoặc WO 2012/130831).

Thuật ngữ "lượng có hiệu quả" của một chất chỉ lượng cần thiết để thu được thay đổi sinh lý trong tế bào hoặc mô mà được cho dùng chất này.

Thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị" của một chất, ví dụ dược phẩm, chỉ lượng có hiệu quả, ở các mức liều và trong khoảng thời gian cần thiết, để thu được kết quả điều trị hoặc phòng bệnh mong muốn. Một lượng có hiệu quả điều trị của một chất ví dụ loại bỏ, làm chậm, giảm thiểu hoặc ngăn ngừa các tác dụng bất lợi của một bệnh.

Thuật ngữ "cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Các động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vật nuôi trong nhà (ví dụ bò, cừu, mèo, chó và ngựa), các động vật linh trưởng (ví dụ người và các động vật linh trưởng không phải là người như khỉ), thỏ, và các động vật gặm nhấm (ví dụ chuột và chuột cống). Cụ thể là, cá thể hoặc đối tượng là người.

Thuật ngữ "dược phẩm" chỉ chế phẩm ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của một thành phần hoạt tính có chứa trong đó để có hiệu quả, và có chứa các thành phần bổ sung khác không gây độc đối với đối tượng cho dùng chế phẩm này.

Thuật ngữ "chất mang dược dụng" chỉ một thành phần trong dược phẩm, không phải là thành phần hoạt tính, không độc đối với một đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất làm ổn định hoặc chất bảo quản.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "điều trị" (và các biến thể ngữ pháp của nó) chỉ sự can thiệp lâm sàng trong một nỗ lực làm thay đổi tiến trình tự nhiên của một bệnh ở một cá thể đang được điều trị, và có thể được tiến hành để phòng ngừa hoặc trong tiến trình bệnh lý lâm sàng. Các tác dụng mong muốn của việc điều trị bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngăn ngừa sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh, giảm nhẹ triệu chứng, giảm thiểu các hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp của bệnh này, ngăn ngừa di căn, giảm tốc độ tiến triển của bệnh, cải thiện, hoặc giảm nhẹ trạng thái bệnh, và sự thuyên giảm hoặc tiên lượng bệnh được cải thiện. Theo một vài phương án, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế được sử dụng để làm chậm sự phát triển của một bệnh hoặc làm chậm tiến triển xấu của bệnh.

Thuật ngữ "tờ hướng dẫn sử dụng" được sử dụng để chỉ các hướng dẫn thông thường được bao gồm trong bao gói thương phẩm của các sản phẩm trị liệu, mà có chứa thông tin về chỉ định, cách dùng, liều dùng, phác đồ kết hợp, chống chỉ định và/hoặc các cảnh báo về việc sử dụng các sản phẩm trị liệu này.

Mô tả chi tiết các phương án của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm

(i) phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và phân tử này bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10;

(ii) phần gắn kết kháng nguyên thứ hai là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên tế bào đích.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin

tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 31.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7.

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30.

Theo một phương án cụ thể khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án cụ thể khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 40 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 và SEQ ID NO: 50.

Theo một phương án cụ thể khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án cụ thể khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 41 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 51.

Theo một phương án cụ thể khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm

(i) phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10;

(ii) phần gắn kết kháng nguyên thứ hai là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm

(i) phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3

và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7,

(ii) phần gắn kết kháng nguyên thứ hai là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm

(i) phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10;

(ii) phần gắn kết kháng nguyên thứ hai là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm

(i) phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7.

(ii) phần gắn kết kháng nguyên thứ hai là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17.

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi hoặc vùng ổn định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab thông thường.

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo, trong đó các vùng ổn định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị, và phần gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab thông thường. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai được dung hợp với nhau, tuỳ ý qua một liên kết peptit.

Theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm một miền Fc bao gồm cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng kết hợp ổn định.

Theo một phương án cụ thể hơn nữa, không nhiều hơn một phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 có mặt trong phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (có nghĩa là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T tạo ra gắn kết hoá trị một với CD3).

Các kiểu phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T

Các thành phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được dung hợp với nhau ở nhiều loại cấu hình. Các cấu hình ví dụ được mô tả trong các Fig. 1, Fig. 3 và Fig. 5.

Theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm một miền Fc bao gồm cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng kết hợp ổn định. Theo một vài phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc.

Theo một phương án này, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản gồm có phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ

hai, một miền Fc bao gồm cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai, và tuỳ ý một hoặc nhiều liên kết peptit, trong đó phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai, và phần gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Tuỳ ý, chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai còn có thể dung hợp với nhau.

Theo một phương án khác này, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản gồm có phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, một miền Fc bao gồm cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai, và tuỳ ý một hoặc nhiều liên kết peptit, trong đó phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai lần lượt được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong số các cấu trúc dưới phân tử của miền Fc.

Theo các phương án khác, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc.

Theo một phương án cụ thể này, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản gồm có phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, một miền Fc bao gồm cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai, và tuỳ ý một hoặc nhiều liên kết peptit, trong đó phần gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất, và phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Tuỳ ý, chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai còn có thể dung hợp với nhau.

Các phần gắn kết kháng nguyên có thể được dung hợp với miền Fc hoặc với nhau một cách trực tiếp hoặc thông qua một liên kết peptit, bao gồm một hoặc nhiều axit amin, thông thường khoảng 2-20 axit amin. Các liên kết peptit là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong bản mô tả này. Các liên kết peptit thích hợp không gây miễn dịch bao gồm, ví dụ, các liên kết peptit $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ hoặc $G_4(SG_4)_n$. "n" nói chung là số trong khoảng từ 1 đến 10, thông thường trong khoảng 2 và 4. Liên kết peptit đặc biệt thích hợp để dung hợp các chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai với nhau là $(G_4S)_2$. Liên kết peptit ví dụ thích hợp để nối các chuỗi nặng Fab thích hợp của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai là EPKSC(D)-$(G_4S)_2$ (các SEQ ID NO 105 và 106). Ngoài ra, các liên kết có thể bao gồm (một đoạn của) vùng bản lề globulin miễn dịch. Cụ thể là, trong trường hợp phần gắn kết kháng nguyên được dung hợp với đầu tận cùng N của một cấu trúc dưới phân tử của miền Fc, phần này có thể dung hợp qua một vùng bản lề globulin miễn dịch hoặc một đoạn của nó, kèm theo hoặc không kèm theo liên kết peptit bổ sung.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T kèm theo phần gắn kết kháng nguyên đơn nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên tế bào đích (ví dụ như thể hiện trong các Fig. 1A, Fig. 1D, Fig. 1F hoặc Fig. 1H) là hữu ích, cụ thể là trong các trường hợp khi hấp thụ nội phân tử kháng nguyên tế bào đích được cho là xảy ra sau khi gắn kết phần gắn kết kháng nguyên ái lực cao. Trong các trường hợp này, sự có mặt của nhiều hơn một phần gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với kháng nguyên tế bào đích có thể làm tăng cường hấp thụ nội phân tử của kháng nguyên tế bào đích, do đó giảm độ sẵn có của nó.

Trong nhiều trường hợp khác, tuy nhiên, sẽ là có lợi có phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm hai hoặc nhiều phần gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với một kháng nguyên tế bào đích (xem các ví dụ được minh hoạ trong Fig. 1B, Fig. 1C, Fig. 1E hoặc Fig. 1G), ví dụ làm tối ưu hoá việc định hướng đến vị trí đích hoặc cho phép liên kết ngang của các kháng nguyên tế bào đích.

Do đó, theo một vài phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế còn bao gồm một phần gắn kết kháng nguyên thứ ba là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên tế bào đích. Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ ba là phân tử Fab thông thường. Theo một

phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với cùng kháng nguyên tế bào đích như phần gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba là có khả năng gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên tế bào đích. Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba là giống nhau (có nghĩa là chúng có cùng trình tự axit amin).

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA, trong đó các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30.

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; và các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA, trong đó các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30.

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; và các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA, trong đó các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30.

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 31, và các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA, trong đó các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3, và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, và các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA, trong đó các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP, trong đó các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 40 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 và SEQ ID NO: 50.

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; và các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP, trong đó các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 40 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 và SEQ ID NO: 50.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; và các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP, trong đó các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 31, và các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP, trong đó các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 41 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%,

98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 51.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, và các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP, trong đó các phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Theo một phương án cụ thể hơn, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba lần lượt được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong số các cấu trúc dưới phân tử của miền Fc, và phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai. Tuỳ ý, chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai còn có thể dung hợp với nhau.

Phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có thể được dung hợp với miền Fc trực tiếp hoặc thông qua liên kết peptit. Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba được dung hợp với miền Fc thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, vùng bản lề globulin miễn dịch là vùng bản lề IgG_1 của người. Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba và miền Fc là một phần của phân tử globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch là globulin miễn dịch nhóm IgG. Theo một phương án cụ thể hơn, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch phân nhóm IgG1. Theo một phương án khác, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch phân nhóm IgG_4. Theo một phương án cụ thể

hơn nữa, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch của người. Theo các phương án khác, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch khảm hoặc globulin miễn dịch được làm tương thích với người. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản gồm có phân tử globulin miễn dịch có khả năng gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên tế bào đích, và phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, trong đó phần gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab, cụ thể là phân tử Fab lai chéo, được dung hợp với đầu tận cùng N của một trong số các chuỗi nặng globulin miễn dịch, tuỳ ý bằng một liên kết peptit.

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ ba lần lượt được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong số các cấu trúc dưới phân tử của miền Fc, và phần gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T về cơ bản gồm có một phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba, một miền Fc bao gồm cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai, và tuỳ ý một hoặc nhiều liên kết peptit, trong đó phần gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất, và phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất của miền Fc, và trong đó phần gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc. Tuỳ ý, chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai còn có thể dung hợp với nhau.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm:

(i) phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) 1 của SEQ ID NO: 4, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 5, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 8, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 9 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 10, trong đó phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai

chéo, trong đó vùng biến đổi hoặc vùng ổn định, cụ thể là các vùng ổn định, của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị;

(ii) phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba, một trong hai phần này là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm CDR 1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 25, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 26, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 28, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 29 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 30.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm

(i) phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, trong đó phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi hoặc vùng ổn định, cụ thể là các vùng ổn định, của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị;

(ii) phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba, một trong hai phần này là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm:

(i) phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) 1 của SEQ ID NO: 4, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 5, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 8, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 9 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 10, trong đó phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai

chéo trong đó vùng biến đổi hoặc vùng ổn định, cụ thể là các vùng ổn định, của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị;

(ii) phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba, một trong hai phần này là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP bao gồm CDR 1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 14, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 15, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 16, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 18, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 19 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm

(i) phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, trong đó phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi hoặc vùng ổn định, cụ thể là các vùng ổn định, của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị;

(ii) phần gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba, một trong hai phần này là một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với MCSP bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số bốn phương án nêu trên còn có thể bao gồm (iii) một miền Fc bao gồm cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng kết hợp ổn định, trong đó phần gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất, và phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất của miền Fc, và trong đó phần gắn kết kháng

nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc.

Trong một số phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế, chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp với nhau, tuỳ ý qua một liên kết peptit. Tuỳ thuộc vào cấu hình của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có thể được dung hợp ở đầu tận cùng C của nó với đầu tận cùng N của chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai, hoặc chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai có thể được dung hợp ở đầu tận cùng C của nó với đầu tận cùng N của chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Dung hợp các chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai còn làm giảm thiểu sự ghép cặp sai của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab không tương thích, và cũng làm giảm số lượng các plasmit cần thiết để biểu hiện một vài phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế.

Theo một vài phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất (có nghĩa là phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng một vùng biến đổi chuỗi nhẹ), vùng này sẽ chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với một cấu trúc dưới phân tử miền Fc ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4)), và polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với một cấu trúc dưới phân tử miền Fc ($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4)). Theo một vài phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$). Theo một vài phương án, các polypeptit được liên kết cộng hoá trị, ví dụ, bằng liên kết đisulfua.

Theo các phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất (có nghĩa là phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng ổn định chuỗi nặng được thay thế bằng vùng ổn định chuỗi nhẹ), phần này chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với một cấu trúc dưới phân tử miền Fc ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4)), và polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với một cấu trúc dưới phân tử miền Fc ($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4)). Theo một vài phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$). Theo một vài phương án, các polypeptit được liên kết cộng hoá trị, ví dụ, bằng liên kết đisulfua.

Theo một vài phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất (có nghĩa là phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng một vùng biến đổi chuỗi nhẹ), phần này chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai, phần này chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với một cấu trúc dưới phân tử miền Fc ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4)). Theo các phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất (có nghĩa là phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng ổn định chuỗi nặng được thay thế bằng vùng ổn định chuỗi nhẹ), phần này lại chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai, phần này lại chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng

carboxy với một cấu trúc dưới phân tử miền Fc ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-$VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-CH2-CH3(-CH4)). Theo các phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất, phần này lại chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất (có nghĩa là phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng một vùng biến đổi chuỗi nhẹ), phần này lại chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với một cấu trúc dưới phân tử miền Fc ($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4)). Theo các phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất, phần này lại chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất (có nghĩa là phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng ổn định chuỗi nặng được thay thế bằng vùng ổn định chuỗi nhẹ), phần này lại chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với một cấu trúc dưới phân tử miền Fc ($VH_{(2)}$-$CH1_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-CH2-CH3(-CH4)).

Theo một vài phương án trong số các phương án này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit chuỗi nhẹ Fab lai chéo của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$), và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$). Theo các phương án khác trong số các phương án này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit chuỗi nhẹ Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$), và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$). Theo các phương án khác nữa trong số các phương án này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất chia sẻ một liên kết peptit đầu

tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất, phần này lại chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai ($VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$-$VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$), polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất phần này lại chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai ($VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$-$VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$), polypeptit trong đó polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất phần này lại chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VL_{(1)}$-$CH1_{(1)}$), hoặc polypeptit trong đó polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ hai chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất phần này lại chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng ổn định chuỗi nhẹ Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất ($VL_{(2)}$-$CL_{(2)}$-$VH_{(1)}$-$CL_{(1)}$).

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo các phương án này còn có thể bao gồm (i) polypeptit cấu trúc dưới phân tử miền Fc (CH2-CH3(-CH4)), hoặc (ii) polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab của phần gắn kết kháng nguyên thứ ba chia sẻ một liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với cấu trúc dưới phân tử miền Fc ($VH_{(3)}$-$CH1_{(3)}$-CH2-CH3(-CH4)) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của một phần gắn kết kháng nguyên thứ ba ($VL_{(3)}$-$CL_{(3)}$). Theo một vài phương án, các polypeptit được liên kết cộng hoá trị, ví dụ, bằng liên kết đisulfua.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, các thành phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (ví dụ phần gắn kết kháng nguyên, miền Fc) có thể được dung hợp trực tiếp hoặc qua nhiều loại liên kết, cụ thể là các liên kết peptit bao gồm một hoặc nhiều axit amin, thông thường khoảng 2-20 axit amin, được mô tả trong bản mô tả này hoặc đã biết trong lĩnh vực này. Các liên kết peptit không gây miễn dịch, thích hợp bao gồm, ví dụ, các liên kết peptit $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ hoặc $G_4(SG_4)_n$, trong đó n nói chung là một số trong khoảng từ 1 đến 10, thông thường trong khoảng từ 2 đến 4.

Miền Fc

Miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gồm có một cặp mạch polypeptit bao gồm các miền chuỗi nặng của một phân tử globulin miễn dịch. Ví dụ, miền Fc của phân tử globulin miễn dịch G (IgG) là một đime, mỗi cấu trúc dưới phân tử của phân tử này bao gồm miền ổn định chuỗi nặng IgG của CH2 và CH3. Hai cấu trúc dưới phân tử của miền Fc có khả năng kết hợp ổn định với nhau. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế bao gồm không nhiều hơn một miền Fc.

Theo một phương án theo sáng chế, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là miền Fc của IgG. Theo một phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc của IgG_1. Theo một phương án khác, miền Fc là miền Fc của IgG_4. Theo một phương án cụ thể hơn, miền Fc là miền Fc của IgG_4 bao gồm thay thế axit amin ở vị trí S228 (cách đánh số Kabat), cụ thể là thay thế axit amin S228P. Việc thay thế axit amin làm giảm trao đổi nhánh Fab in vivo của các kháng thể IgG_4 (xem tài liệu: Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010), của Stubenrauch và các đồng tác giả). Theo một phương án cụ thể hơn nữa, miền Fc là của người. Trình tự ví dụ của vùng Fc của IgG_1 của người được nêu trong SEQ ID NO: 107.

Các cải biến miền Fc thúc đẩy dị đime hoá

Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T theo sáng chế bao gồm các phần gắn kết kháng nguyên khác nhau, được dung hợp với một trong số hai cấu trúc dưới phân tử của miền Fc, do đó hai cấu trúc dưới phân tử của miền Fc thông thường được bao gồm trong hai mạch polypeptit không giống nhau. Việc đồng biểu hiện tái tổ hợp các polypeptit này và đime hoá sau đó dẫn đến một vài tổ hợp có thể có của hai polypeptit này. Để cải thiện hiệu suất và độ tinh khiết của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T trong quá trình sản xuất tái tổ hợp, sẽ là có lợi nếu đưa vào miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T một cải biến thúc đẩy sự kết hợp giữa các polypeptit mong muốn.

Do đó, theo các phương án cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp giữa cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Vị trí của tương tác protein-protein phổ biến nhất giữa hai cấu trúc dưới phân tử của miền Fc của IgG của người là trong

miền CH3 của miền Fc. Bởi vậy, theo một phương án, cải biến là trong miền CH3 của miền Fc.

Theo một phương án cụ thể, cải biến này còn được gọi là cải biến "nốt phồng-thành-lỗ", bao gồm cải biến "nốt phồng" trong một trong số hai cấu trúc dưới phân tử của miền Fc và cải biến "lỗ" trong cấu trúc còn lại trong số hai cấu trúc dưới phân tử của miền Fc.

Công nghệ nốt phồng-thành-lỗ được mô tả trong tài liệu: US 5,731,168; US 7,695,936; Prot Eng 9, 617-621 (1996) của Ridgway và các đồng tác giả, và J Immunol Meth 248, 7-15 (2001) của Carter. Nói chung, phương pháp bao gồm đưa một chỗ lồi lên ("nốt phồng") vào giao diện của polypeptit thứ nhất và khoang trống tương ứng ("lỗ") vào giao diện của polypeptit thứ hai, sao cho nốt phồng có thể ở vị trí trong khoang trống để thúc đẩy sự tạo thành dị đime và ngăn cản sự tạo thành đồng đime. Các nốt phồng được tạo ra bằng cách thay thế axit amin mạch bên kích cỡ nhỏ từ giao diện của polypeptit thứ nhất bằng mạch bên kích cỡ lớn hơn (ví dụ tyrosin hoặc tryptophan). Các khoang trống bù trừ có kích cỡ tương đồng hoặc tương tự với các nốt phồng được tạo ra trong giao diện của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế các mạch bên kích cỡ lớn hơn bằng loại có mạch bên kích cỡ nhỏ hơn (ví dụ alanin hoặc threonin).

Do đó, theo một phương án cụ thể, trong miền CH3 thuộc cấu trúc dưới phân tử của miền Fc thuộc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, một gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có kích cỡ mạch bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra một nốt phồng bên trong miền CH3 thuộc cấu trúc dưới phân tử mà có thể ăn khớp vào vị trí trong khoang trống thuộc miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc, một gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có kích cỡ mạch bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra khoang trống bên trong miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ hai, trong đó nốt phồng bên trong miền CH3 thuộc cấu trúc dưới phân tử có thể khớp vào.

Nốt phồng và khoang trống có thể tạo ra bằng cách biến đổi axit nucleic mã hoá các polypeptit, ví dụ bằng cách gây đột biến đặc hiệu-vị trí, hoặc bằng cách tổng hợp peptit.

Theo một phương án cụ thể, trong miền CH3 thuộc cấu trúc dưới phân tử của miền Fc gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong miền

CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V). Theo một phương án, trong cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc gốc threonin ở vị trí 366 còn được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc lơxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A).

Theo một phương án khác nữa, trong cấu trúc dưới phân tử thứ nhất của miền Fc gốc serin ở vị trí 354 còn được thay thế bằng gốc xystein (S354C), và trong cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C). Đưa thêm hai gốc xystein này vào dẫn đến tạo thành cầu nối đisulfua giữa hai cấu trúc dưới phân tử của miền Fc, còn làm ổn định đime (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với CD3 được dung hợp (tuỳ ý qua phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với một kháng nguyên tế bào đích) với cấu trúc dưới phân tử thứ nhất của miền Fc (bao gồm cải biến "nốt phồng"). Không mang tính giới hạn sáng chế, việc dung hợp của phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với CD3 với cấu trúc dưới phân tử có chứa-nốt phồng của miền Fc sẽ giảm tối thiểu (tiếp) việc tạo ra các phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm hai phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với CD3 (cản trở về không gian của hai polypeptit có chứa-nốt phồng).

Theo một phương án khác, cải biến thúc đẩy kết hợp cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc bao gồm cải biến điều tiết các tác động dẫn hướng tĩnh điện, ví dụ như mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 2009/089004. Nói chung, phương pháp này bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin ở giao diện của hai cấu trúc dưới phân tử miền Fc bằng gốc axit amin tích điện sao cho việc tạo thành đồng đime trở nên không thuận lợi về mặt điện tích nhưng dị đime hoá lại thuận lợi về mặt điện tích.

Các cải biến miền Fc làm giảm khả năng gắn kết thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng

Miền Fc mang lại cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T các tính chất dược động học thuận lợi, kể cả thời gian bán thải trong huyết thanh kéo dài, tính chất này góp phần vào mức tích luỹ có lợi ở mô đích và tỷ lệ phân bố mô-máu thích hợp. Tuy nhiên, tính chất này cũng dẫn đến việc nhằm đích không mong muốn của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T đến các tế bào biểu hiện thụ thể Fc thay vì nhằm vào các tế bào mang kháng nguyên được ưu tiên. Hơn nữa, việc đồng

hoạt hoá các con đường phát tín hiệu thụ thể Fc có thể dẫn đến giải phóng xytokin, chất này kết hợp với các tính chất hoạt hoá tế bào T và thời gian bán thải kéo dài của phân tử gắn kết kháng nguyên, dẫn đến hoạt hoá quá mức các thụ thể xytokin và các tác dụng phụ nghiêm trọng khi dùng toàn thân. Hoạt hoá các tế bào miễn dịch (mang thụ thể Fc) mà không phải là tế bào T thậm chí có thể làm giảm hiệu lực của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, ví dụ do các tế bào NK có thể phá huỷ các tế bào T.

Do đó, theo các phương án cụ thể, miền Fc của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T theo sáng chế thể hiện ái lực gắn kết giảm đối với một thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng giảm, so với miền Fc của IgG_1 nguyên thuỷ. Theo một phương án này, miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) thể hiện ái lực gắn kết với một thụ thể Fc thấp hơn 50%, tốt hơn là thấp hơn 20%, tốt hơn nữa là thấp hơn 10% và tốt nhất là thấp hơn 5%, so với miền Fc của IgG_1 nguyên thuỷ (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm miền Fc của IgG_1 nguyên thuỷ), và/hoặc chức năng hiệu ứng thấp hơn 50%, tốt hơn là thấp hơn 20%, tốt hơn nữa là thấp hơn 10% và tốt nhất là thấp hơn 5%, so với miền Fc của IgG_1 nguyên thuỷ (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm miền Fc của IgG_1 nguyên thuỷ). Theo một phương án, miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) về cơ bản không gắn kết với một thụ thể Fc và/hoặc gây cảm ứng chức năng hiệu ứng. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc của người. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hoá. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ của người hoạt hoá, cụ thể hơn là FcγRIIIa, FcγRI hoặc FcγRIIa của người, cụ thể nhất là FcγRIIIa của người. Theo một phương án, chức năng hiệu ứng là một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm gồm CDC, ADCC, ADCP, và bài tiết xytokin. Theo một phương án cụ thể, chức năng hiệu ứng là ADCC. Theo một phương án, miền Fc thể hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) về cơ bản tương tự với miền Fc của IgG_1 nguyên thuỷ. Việc gắn kết về cơ bản tương tự với FcRn đạt được khi miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) thể hiện ái lực gắn kết của miền Fc của IgG1 nguyên thuỷ (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T

bao gồm miền Fc của IgG1 nguyên thuỷ) với FcRn cao hơn khoảng 70%, cụ thể là cao hơn khoảng 80%, cụ thể hơn là cao hơn khoảng 90%.

Theo một vài phương án, miền Fc được xử lý có ái lực gắn kết giảm đối với một thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng giảm, so với miền Fc không được xử lý. Theo các phương án cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm một hoặc nhiều đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc đối với một thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng. Thông thường, một hoặc nhiều đột biến axit amin giống nhau có mặt trong một trong hai cấu trúc dưới phân tử của miền Fc. Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc đối với một thụ thể Fc. Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc đối với một thụ thể Fc ít nhất 2 lần, ít nhất 5-lần, hoặc ít nhất 10-lần. Theo các phương án, trong trường hợp có nhiều hơn một đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc, tổ hợp của các đột biến axit amin này có thể làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc đối với một thụ thể Fc ít nhất 10-lần, ít nhất 20-lần, hoặc thậm chí ít nhất 50-lần. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc được xử lý thể hiện ái lực gắn kết đối với một thụ thể Fc thấp hơn 20%, cụ thể là thấp hơn 10%, cụ thể hơn nữa là thấp hơn 5% so với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm miền Fc không được xử lý. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo một vài phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc của người. Theo một vài phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hoá. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ của người hoạt hoá, cụ thể hơn nữa là FcγRIIIa, FcγRI hoặc FcγRIIa của người, cụ thể nhất là FcγRIIIa của người. Tốt hơn là, mức gắn kết với một trong số các thụ thể này giảm đi. Theo một vài phương án, ái lực gắn kết với thành phần bổ thể, cụ thể là ái lực gắn kết với C1q, cũng giảm đi. Theo một phương án, ái lực gắn kết với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) không giảm đi. Gắn kết về cơ bản tương tự với FcRn, có nghĩa là bảo toàn ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể này, đạt được khi miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) thể hiện ái lực gắn kết với FcRn cao hơn khoảng 70% ái lực gắn kết của dạng chưa được xử lý của miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm dạng chưa được xử lý của miền Fc này). Miền Fc, hoặc các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế bao gồm miền Fc này, có thể thể hiện ái lực này cao hơn khoảng 80% và thậm chí cao hơn khoảng

90%. Theo một vài phương án, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được xử lý có chức năng hiệu ứng giảm, so với miền Fc không được xử lý. Chức năng hiệu ứng giảm có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều chức năng sau: độc tính gây độc tế bào tuỳ thuộc bổ thể (CDC) giảm, độc tính gây độc tế bào qua trung gian-tế bào tuỳ thuộc kháng thể (ADCC) giảm, thực bào tế bào tuỳ thuộc-kháng thể (ADCP) giảm, bài tiết xytokin giảm, hấp thụ kháng nguyên qua trung gian-phức hợp miễn dịch bởi các tế bào trình diện kháng nguyên giảm đi, gắn kết giảm với các tế bào NK, gắn kết giảm với các đại thực bào, gắn kết giảm với bạch cầu đơn nhân, gắn kết giảm với các tế bào bạch cầu hạt, phát tín hiệu trực tiếp gây cảm ứng chết tế bào theo chương trình giảm đi, liên kết ngang các kháng thể đã gắn kết-đích giảm đi, quá trình trưởng thành tế bào sợi nhánh giảm đi, hoặc gây miễn dịch sơ bộ (mồi) tế bào T giảm đi. Theo một phương án, chức năng hiệu ứng giảm là một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm gồm CDC giảm, ADCC giảm, ADCP giảm, và bài tiết xytokin giảm. Theo một phương án cụ thể, chức năng hiệu ứng giảm là ADCC giảm. Theo một phương án, ADCC giảm là thấp hơn 20% ADCC được gây cảm ứng bởi miền Fc không được xử lý (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm miền Fc không được xử lý).

Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc đối với một thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng là thay thế axit amin. Theo một phương án, miền Fc bao gồm thay thế axit amin ở một vị trí được chọn từ nhóm gồm E233, L234, L235, N297, P331 và P329. Theo một phương án cụ thể hơn, miền Fc bao gồm thay thế axit amin ở một vị trí được chọn từ nhóm gồm L234, L235 và P329. Theo một vài phương án, miền Fc bao gồm thay thế các axit amin L234A và L235A. Theo một phương án này, miền Fc là miền Fc của IgG_1, cụ thể là miền Fc của IgG_1 của người. Theo một phương án, miền Fc bao gồm thay thế axit amin ở vị trí P329. Theo một phương án cụ thể hơn, thay thế axit amin là P329A hoặc P329G, cụ thể là P329G. Theo một phương án, miền Fc bao gồm thay thế axit amin ở vị trí P329 và thay thế axit amin khác nữa ở một vị trí được chọn từ E233, L234, L235, N297 và P331. Theo một phương án cụ thể hơn, thay thế axit amin khác nữa là E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D hoặc P331S. Theo các phương án cụ thể, miền Fc bao gồm thay thế các axit amin ở vị trí P329, L234 và L235. Theo các phương án cụ thể hơn nữa, miền Fc bao gồm đột biến các axit amin L234A, L235A và P329G ("P329G LALA"). Theo một phương án này, miền Fc là miền

Fc của IgG_1, cụ thể là miền Fc của IgG_1 của người. Tổ hợp "P329G LALA" thay thế các axit amin gần như loại bỏ hoàn toàn thụ thể Fcγ (cũng như bổ thể) gắn kết miền Fc của IgG_1 của người, như được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 2012/130831, được viện dẫn ở đây để tham khảo. WO 2012/130831 cũng mô tả các phương pháp điều chế các miền Fc đột biến và các phương pháp xác định các tính chất của nó như gắn kết thụ thể Fc hoặc các chức năng hiệu ứng.

Các kháng thể IgG_4 thể hiện ái lực gắn kết giảm với thụ thể Fc và chức năng hiệu ứng giảm so với các kháng thể IgG_1. Do đó, theo một vài phương án, miền Fc của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế là miền Fc của IgG_4, cụ thể là miền Fc của IgG_4 của người. Theo một phương án, miền Fc của IgG_4 bao gồm thay thế axit amin ở vị trí S228, cụ thể là thay thế axit amin S228P. Để làm giảm hơn nữa ái lực gắn kết của nó đối với một thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng của nó, theo một phương án, miền Fc của IgG_4 bao gồm thay thế axit amin ở vị trí L235, cụ thể là thay thế axit amin L235E. Theo một phương án khác, miền Fc của IgG_4 bao gồm thay thế axit amin ở vị trí P329, cụ thể là thay thế axit amin P329G. Theo một phương án cụ thể, miền Fc của IgG_4 bao gồm thay thế axit amin ở các vị trí S228, L235 và P329, cụ thể là thay thế axit amin S228P, L235E và P329G. Các thể đột biến miền Fc của IgG_4 và các tính chất gắn kết thụ thể Fcγ của chúng được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 2012/130831, được viện dẫn ở đây để tham khảo.

Theo một phương án cụ thể, miền Fc thể hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng hiệu ứng giảm, so với miền Fc của IgG1 nguyên thuỷ, là miền Fc của IgG_1 của người bao gồm thay thế các axit amin L234A, L235A và tuỳ ý P329G, hoặc miền Fc của IgG_4 bao gồm thay thế các axit amin S228P, L235E và tuỳ ý P329G.

Theo một vài phương án, N-glycosyl hoá miền Fc đã bị loại trừ. Theo phương án này, miền Fc bao gồm đột biến axit amin ở vị trí N297, cụ thể là thay thế axit amin thay asparagin bằng alanin (N297A) hoặc axit aspartic (N297D).

Ngoài các miền Fc được mô tả ở trên và trong Công bố đơn PCT số WO 2012/130831, các miền Fc có gắn kết thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng giảm đi cũng bao gồm các miền với thay thế một hoặc nhiều gốc của miền Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 6,737,056). Các thể đột biến Fc này bao gồm các thể đột biến Fc với thay thế ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269,

270, 297 và 327, kể cả thể đột biến Fc được gọi là "DANA" với thay thế các gốc 265 và 297 thành alanin (Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 7,332,581).

Các miền Fc đột biến có thể được điều chế bằng cách khuyết đoạn, thay thế, cài xen hoặc cải biến bằng cách sử dụng các phương pháp di truyền hoặc hoá học đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp di truyền có thể bao gồm gây đột biến đặc hiệu-vị trí trình tự ADN mã hoá, PCR, tổng hợp gen, và phương pháp tương tự. Các thay đổi nucleotit chính xác có thể được kiểm định ví dụ bằng cách xác định trình tự.

Có thể dễ dàng xác định việc gắn kết với các thụ thể Fc, ví dụ bằng ELISA, hoặc bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng thiết bị chuẩn như thiết bị BIAcore (GE Healthcare), và các thụ thể Fc này có thể thu được bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Thử nghiệm gắn kết thích hợp này được mô tả trong bản mô tả này. Theo cách khác, ái lực gắn kết của các miền Fc hoặc các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào bao gồm một miền Fc đối với các thụ thể Fc có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các dòng tế bào đã biết để biểu hiện các thụ thể Fc cụ thể, như là các tế bào NK của người biểu hiện thụ thể FcγIIIa.

Chức năng hiệu ứng của một miền Fc, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm miền Fc, có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Thử nghiệm thích hợp để xác định ADCC được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ khác về các thử nghiệm *in vitro* để xác định hoạt tính ADCC của một phân tử quan tâm được mô tả trong tài liệu: Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 5,500,362; Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) của Hellstrom và các đồng tác giả và Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985), của Hellstrom và các đồng tác giả; Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 5,821,337; J Exp Med 166, 1351-1361 (1987), của Bruggemann và các đồng tác giả. Theo cách khác, có thể sử dụng các phương pháp thử nghiệm không-phóng xạ (tham khảo, ví dụ, thử nghiệm độc tính tế bào-không phóng xạ để đo lưu lượng tế bào ACTI™ (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); và thử nghiệm độc tính tế bào không-phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Các tế bào hiệu ứng hữu ích cho các thử nghiệm này bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào giết tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của một phân tử quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ ở mô hình động vật

như được mô tả trong tài liệu: Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998) của Clynes và các đồng tác giả.

Theo một vài phương án, gắn kết miền Fc với thành phần bổ thể, cụ thể là với C1q, là giảm đi. Do đó, theo một vài phương án, trong đó miền Fc được xử lý có chức năng hiệu ứng giảm, chức năng hiệu ứng giảm này bao gồm CDC giảm đi. Có thể tiến hành các thử nghiệm gắn kết C1q để xác định xem liệu phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể gắn kết C1q và do đó có hoạt tính CDC hay không. Tham khảo, ví dụ, ELISA gắn kết C1q và C3c trong: WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá mức hoạt hoá bổ thể, có thể tiến hành thử nghiệm CDC (tham khảo, ví dụ, J Immunol Methods 202, 163 (1996), của Gazzano-Santoro và các đồng tác giả; Blood 101, 1045-1052 (2003), của Cragg và các đồng tác giả; và Blood 103, 2738-2743 (2004), của Cragg và Glennie).

Các phần gắn kết kháng nguyên

Phân tử gắn kết kháng nguyên của sáng chế là đặc hiệu kép, có nghĩa là phân tử này bao gồm ít nhất hai phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với hai phần quyết định tính kháng nguyên phân biệt. Theo sáng chế, các phần gắn kết kháng nguyên là các phân tử Fab (có nghĩa là các miền gắn kết kháng nguyên gồm có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi và vùng ổn định). Theo một phương án, các phân tử Fab là của người. Theo một phương án khác, các phân tử Fab được làm tương thích với người. Theo một phương khác khác nữa, các phân tử Fab này bao gồm vùng ổn định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người.

Ít nhất một trong số các phần gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab lai chéo. Cải biến này ngăn ngừa sự ghép cặp sai các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ các phân tử Fab khác nhau, nhờ đó cải thiện hiệu suất và độ tinh khiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế trong sản xuất tái tổ hợp. Trong một phân tử Fab lai chéo cụ thể hữu ích cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế, các vùng ổn định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị. Trong một phân tử Fab lai chéo khác hữu ích cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế, các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị.

Theo một phương án cụ thể theo sáng chế, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng gắn kết đồng thời với một kháng nguyên tế bào đích, cụ thể là kháng nguyên tế bào khối u, và CD3. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng liên kết ngang tế bào T và tế bào đích bằng cách gắn kết đồng thời với một kháng nguyên tế bào đích và CD3. Theo một phương án cụ thể hơn, việc gắn kết đồng thời này dẫn đến phân giải tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u. Theo một phương án, việc gắn kết đồng thời này dẫn đến hoạt hoá tế bào T. Theo các phương án khác, việc gắn kết đồng thời này dẫn đến đáp ứng tế bào của lympho bào T, cụ thể là lympho bào T gây độc tế bào, được chọn từ nhóm gồm: tăng sinh, biệt hoá, bài tiết xytokin, giải phóng phân tử hiệu ứng gây độc tế bào, hoạt tính gây độc tế bào, và biểu hiện các chất đánh dấu hoạt hoá. Theo một phương án, gắn kết phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T với CD3 không kèm theo gắn kết đồng thời với kháng nguyên tế bào đích không dẫn đến hoạt hoá tế bào T.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng định hướng lại hoạt tính gây độc tế bào của tế bào T nhằm vào tế bào đích. Theo một phương án cụ thể, việc định hướng lại này độc lập với việc trình diện kháng nguyên peptit qua trung gian-MHC của tế bào đích và/hoặc tính đặc hiệu của tế bào T.

Cụ thể là, tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế là tế bào T gây độc tế bào. Theo một vài phương án, tế bào T là tế bào T $CD4^+$ hoặc $CD8^+$, cụ thể là tế bào T $CD8^+$.

Phần gắn kết CD3

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế bao gồm ít nhất một phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với CD3 (còn được gọi trong bản mô tả này là "phần gắn kết kháng nguyên CD3" hoặc "phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất"). Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm không nhiều hơn một phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T tạo ra gắn kết đặc hiệu với CD3. Gắn kết kháng nguyên CD3 là một phân tử Fab lai chéo, có nghĩa là phân tử Fab trong đó vùng biến đổi hoặc vùng ổn định của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được hoán vị. Theo các phương án, trong trường hợp có nhiều hơn một phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu

với một kháng nguyên tế bào đích được bao gồm trong phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 tốt hơn là phân tử Fab lai chéo và các phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên tế bào đích là các phân tử Fab thông thường.

Theo một phương án cụ thể, CD3 là CD3 của người (SEQ ID NO: 103) hoặc CD3 của khỉ đuôi dài (SEQ ID NO: 104), cụ thể nhất là CD3 của người. Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên CD3 phản ứng chéo (có nghĩa là cụ thể là gắn kết với) đối với CD3 của người và khỉ đuôi dài. Theo một vài phương án, phần gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với cấu trúc dưới phân tử epsilon của CD3.

Phần gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 5, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 9, và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên CD3 có trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33, và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 31.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 33 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm: SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 31.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên CD3 có trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ

ID NO: 3 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 7.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 3 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 7.

Phần gắn kết kháng nguyên tế bào đích

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế bao gồm ít nhất một phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với một kháng nguyên tế bào đích (còn được gọi trong bản mô tả này là "phần gắn kết kháng nguyên tế bào đích" hoặc phần gắn kết kháng nguyên "thứ hai" hoặc "thứ ba"). Theo một vài phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm hai phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với một kháng nguyên tế bào đích. Theo một phương án cụ thể này, một trong hai phần gắn kết kháng nguyên này gắn kết đặc hiệu với cùng phần quyết định tính kháng nguyên. Theo một phương án cụ thể hơn, tất cả các phần gắn kết kháng nguyên là giống nhau. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm phân tử globulin miễn dịch có khả năng gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên tế bào đích. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm không hiều hơn hai phần gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với một kháng nguyên tế bào đích.

Phần gắn kết kháng nguyên tế bào đích nói chung là phân tử Fab, cụ thể là phân tử Fab thông thường mà gắn kết với phần quyết định tính kháng nguyên đặc hiệu và có thể định hướng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T đến vị trí đích, ví dụ đến loại tế bào khối u đặc hiệu mang phần quyết định tính kháng nguyên.

Theo một vài phương án, phần gắn kết kháng nguyên tế bào đích gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào. Theo một phương án cụ thể, phần gắn kết kháng nguyên tế bào đích gắn kết đặc hiệu với vùng gần màng của kháng nguyên bề mặt tế bào. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên bề mặt tế bào là kháng nguyên phôi gây ung thư (CEA) và vùng gần màng là miền B3 của CEA (các gốc 208-286 của SEQ ID NO: 119).

Theo một phương án cụ thể khác, kháng nguyên bề mặt tế bào là Proteoglycan Chondroitin Sulfat có liên quan đến u melanin (MCSP) và vùng gần màng là miền D3 của MSCP (SEQ ID NO: 118).

Theo một vài phương án, phần gắn kết kháng nguyên tế bào đích được định hướng đến kháng nguyên kèm theo một tình trạng bệnh lý, như kháng nguyên được trình diện trên tế bào khối u hoặc tế bào nhiễm virut. Các kháng nguyên thích hợp là các kháng nguyên bề mặt tế bào, ví dụ, nhưng không giới hạn ở, các thụ thể bề mặt tế bào. Theo các phương án cụ thể, kháng nguyên là kháng nguyên của người. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên tế bào đích được chọn từ Proteoglycan Chondroitin Sulfat có liên quan đến u melanin (MCSP, CSPG4) và kháng nguyên phôi gây ung thư (CEA, CEACAM5).

Theo một vài phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm ít nhất một phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với Proteoglycan Chondroitin Sulfat có liên quan đến u melanin (MCSP). Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 40 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 và SEQ ID NO: 50.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 14, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 15, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 16, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 18, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 19, và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 20.

Theo một phương án khác, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP có trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 41 và trình tự vùng

biến đổi chuỗi nhẹ tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 51.

Theo một phương án khác, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 41 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 51.

Theo một phương án khác, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP có trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO:13 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 17 hoặc các biến thể của chúng mà vẫn giữ được chức năng.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu đối với MCSP bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 13 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 17.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 12, trình tự polypeptit tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 53, trình tự polypeptit tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 54, và trình tự polypeptit tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 55.

Theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm ít nhất một phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu với kháng nguyên phôi gây ung thư (CEA). Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu với CEA bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ chuỗi nặng (CDR) được chọn từ

nhóm gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và SEQ ID NO: 26 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu với CEA bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 25, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 26, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 28, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 29, và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 30.

Theo một phương án khác, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu với CEA có trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 23 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 27, hoặc các biến thể của chúng mà vẫn giữ được chức năng.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu với CEA bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và một vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án, phần gắn kết kháng nguyên mà đặc hiệu với CEA bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 23 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 27.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 22, trình tự polypeptit tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 56, trình tự polypeptit tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 57, và trình tự polypeptit tương đồng ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 58.

Các polynucleotit

Sáng chế còn đề cập đến các polynucleotit phân lập được mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T như được mô tả trong bản mô tả này hoặc mảnh của nó. Theo một vài phương án, mảnh này là mảnh gắn kết kháng nguyên.

Các polynucleotit của sáng chế bao gồm các polynucleotit tương đồng ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với các trình tự nêu

trong các SEQ ID NO 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74,75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92,93, 94, 95, 96, 97 và 98 kể cả các mảnh chức năng hoặc các biến thể của chúng.

Các polynucleotit mã hoá các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế có thể được biểu hiện dưới dạng polynucleotit đơn nhất mã hoá toàn bộ phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T hoặc dưới dạng nhiều (ví dụ, hai hoặc nhiều) polynucleotit được đồng biểu hiện. Các polypeptit được mã hoá bởi các polynucleotit mà đồng biểu hiện có thể kết hợp thông qua, ví dụ, các liên kết đisulfua hoặc các cách khác để tạo thành phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T hoạt động. Ví dụ, đoạn chuỗi nhẹ của phần gắn kết kháng nguyên có thể được mã hoá bởi một polynucleotit riêng biệt từ đoạn phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm đoạn chuỗi nặng của phần gắn kết kháng nguyên, một cấu trúc dưới phân tử miền Fc và tuỳ ý (một phần của) một phần gắn kết kháng nguyên khác. Khi được đồng biểu hiện, các polypeptit chuỗi nặng sẽ kết hợp với các polypeptit chuỗi nhẹ để tạo thành phần gắn kết kháng nguyên. Trong một ví dụ khác, đoạn phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm một trong số hai cấu trúc dưới phân tử miền Fc và tuỳ ý (một phần của) một hoặc nhiều phần gắn kết kháng nguyên có thể được mã hoá bởi polynucleotit riêng biệt từ đoạn phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm cấu trúc còn lại trong số hai cấu trúc dưới phân tử miền Fc và tuỳ ý (một phần của) phần gắn kết kháng nguyên. Khi được đồng biểu hiện, các cấu trúc dưới phân tử miền Fc sẽ kết hợp để tạo thành miền Fc.

Theo một vài phương án, polynucleotit phân lập được mã hoá toàn bộ phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án khác, polynucleotit phân lập được mã hoá các polypeptit được bao gồm trong phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập được mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này bao gồm trình tự mã hoá trình tự vùng biến đổi như thể hiện trong các SEQ ID NO 3, 7, 13, 17, 23, 27, 31, 32, 33, 34, 36, 39, 41, 43, 46, 47 hoặc 51. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập được

mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T hoặc mảnh của chúng, trong đó polynucleotit này bao gồm trình tự mã hoá trình tự polypeptit như thể hiện trong các SEQ ID NO 22, 56, 57, 58, 12, 53, 54 và 55. Theo một phương án khác, sáng chế còn đề cập đến polynucleotit phân lập được mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này bao gồm trình tự tương đồng ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự nucleotit thể hiện trong các SEQ ID NO 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74,75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92,93, 94, 95, 96, 97 hoặc 98. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập được mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này bao gồm trình tự axit nucleic thể hiện trong các SEQ ID NO 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74,75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92,93, 94, 95, 96, 97 hoặc 98. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập được mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này bao gồm trình tự mã hoá trình tự vùng biến đổi tương đồng ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự axit amin trong các SEQ ID NO 3, 7, 13, 17, 23, 27, 31, 32, 33, 34, 36, 39, 41, 43, 46, 47 hoặc 51. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập được mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này bao gồm trình tự mã hoá trình tự polypeptit tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự axit amin trong các SEQ ID NO 22, 56, 57, 58, 12, 53, 54 hoặc 55. Sáng chế bao gồm polynucleotit phân lập được mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này bao gồm trình tự mã hoá trình tự vùng biến đổi của các SEQ ID NO 3, 7, 13, 17, 23, 27, 31, 32, 33, 34, 36, 39, 41, 43, 46, 47 hoặc 51 với các thay thế axit amin bảo toàn. Sáng chế cũng bao gồm polynucleotit phân lập được mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit này bao gồm trình tự mã hoá trình tự polypeptit của các SEQ ID NO 22, 56, 57, 58, 12, 53, 54 hoặc 55 với các thay thế axit amin bảo toàn.

Theo một vài phương án, polynucleotit hoặc axit nucleic là ADN. Theo các phương án khác, polynucleotit của sáng chế là ARN, ví dụ, ở dạng ARN thông tin (mARN). ARN của sáng chế có thể là sợi đơn hoặc sợi kép.

Các phương pháp tái tổ hợp

Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế có thể thu được, ví dụ, bằng cách tổng hợp peptit trạng thái rắn (ví dụ tổng hợp pha rắn Merrifield) hoặc sản xuất tái tổ hợp. Để sản xuất tái tổ hợp, một hoặc nhiều polynucleotit mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh), ví dụ, như nêu trên, được phân lập và cài xen vào một hoặc nhiều vectơ để tách dòng tiếp và/hoặc biểu hiện trong tế bào vật chủ. Polynucleotit này có thể dễ dàng được phân lập và xác định trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường. Theo một phương án, vectơ, tốt hơn là vectơ biểu hiện, bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit của sáng chế được đề cập đến. Các phương pháp là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng để tạo cấu trúc các vectơ biểu hiện có chứa trình tự mã hoá của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T (mảnh) cùng với các tín hiệu kiểm soát phiên mã/dịch mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm các kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, các kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp/tái tổ hợp di truyền *in vivo*. Tham khảo, ví dụ, các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu: MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989), của Maniatis và các đồng tác giả; và CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates và Wiley Interscience, N.Y (1989), của Ausubel và các đồng tác giả. Vectơ biểu hiện là một phần của plasmit, virut, hoặc có thể là mảnh axit nucleic. Vectơ biểu hiện bao gồm cat-xet biểu hiện mà polynucleotit mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) (có nghĩa là vùng mã hoá) được tách dòng vào kết hợp có điều khiển với đoạn khởi đầu và/hoặc các yếu tố kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã khác. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vùng mã hoá" là đoạn axit nucleic gồm có các codon được dịch mã thành axit amin. Mặc dù "codon dừng" (TAG, TGA, hoặc TAA) không được dịch mã thành axit amin, nó có thể được xem là một phần của vùng mã hoá, nếu có, nhưng các trình tự tiếp giáp, ví dụ các đoạn khởi đầu, các vị trí gắn kết ribosom, các đoạn kết thúc phiên mã, các intron, vùng không dịch mã 5' và 3', và các đoạn tương tự, không phải là một phần của vùng mã hoá. Hai hoặc nhiều vùng mã hoá có thể có mặt trong một cấu trúc polynucleotit đơn nhất, ví dụ trên vectơ đơn nhất, hoặc trong các cấu

trúc polynucleotit tách biệt, ví dụ trên các vectơ tách biệt (khác nhau). Ngoài ra, vectơ bất kỳ có thể chứa vùng mã hoá đơn nhất, hoặc có thể bao gồm hai hoặc nhiều vùng mã hoá, ví dụ vectơ của sáng chế có thể mã hoá một hoặc nhiều polypeptit, các polypeptit này được tách sau khi dịch mã hoặc đồng thời lúc dịch mã thành các protein thành phẩm bằng cách phân huỷ protein. Ngoài ra, vectơ, polynucleotit, hoặc axit nucleic của sáng chế có thể mã hoá các vùng mã hoá khác loài, được dung hợp hoặc không được dung hợp với polynucleotit mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) của sáng chế, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của nó. Các vùng mã hoá khác loài bao gồm, không chỉ giới hạn ở, các yếu tố hoặc mô-típ chuyên biệt, như là peptit tín hiệu bài tiết hoặc miền hoạt động khác loài. Kết hợp có điều khiển là khi vùng mã hoá một sản phẩm gen, ví dụ polypeptit, được kết hợp với một hoặc nhiều trình tự điều hoà theo cách sao cho làm cho việc biểu hiện sản phẩm gen này chịu ảnh hưởng hoặc chịu sự kiểm soát của (các) trình tự điều hoà. Hai mảnh ADN (như là vùng mã hoá polypeptit và đoạn khởi đầu kết hợp với nó) "được kết hợp có điều khiển" nếu gây cảm ứng chức năng đoạn khởi đầu dẫn đến phiên mã mARN mã hoá sản phẩm gen mong muốn và nếu bản chất của liên kết giữa hai mảnh ADN không gây ảnh hưởng đến khả năng của trình tự điều hoà điều khiển biểu hiện việc biểu hiện của sản phẩm gen hoặc ảnh hưởng đến khả năng của khuôn mẫu ADN sẽ được phiên mã. Bởi vậy, vùng đoạn khởi đầu sẽ được kết hợp có điều khiển với axit nucleic mã hoá polypeptit nếu đoạn khởi đầu này có khả năng thực hiện việc phiên mã axit nucleic đó. Đoạn khởi đầu có thể là đoạn khởi đầu đặc hiệu-tế bào mà điều khiển quá trình phiên mã chủ yếu của ADN chỉ ở các tế bào xác định trước. Các yếu tố kiểm soát phiên mã khác, ngoài đoạn khởi đầu, ví dụ yếu tố tăng cường, yếu tố điều hành, yếu tố kìm hãm, và các yếu tố kết thúc phiên mã, có thể được kết hợp có điều khiển polynucleotit để điều khiển quá trình phiên mã đặc hiệu-tế bào. Các đoạn khởi đầu thích hợp và các vùng kiểm soát phiên mã khác được bộc lộ trong bản mô tả này. Nhiều loại vùng kiểm soát phiên mã là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật. Các vùng này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các vùng kiểm soát phiên mã, mà hoạt động ở tế bào động vật có xương sống, như là, nhưng không giới hạn ở, đoạn khởi đầu và các đoạn tăng cường từ các virut cự bào (ví dụ đoạn khởi đầu sớm, kết hợp với intron-A), virut simian 40 (ví dụ đoạn khởi đầu sớm), và retrovirut (như là, ví dụ virut *Rous sarcoma*). Các vùng kiểm soát phiên mã khác bao gồm các vùng thu được từ các gen động vật có xương sống như là actin, protein sốc nhiệt, hormon tăng trưởng

của bò và â-globin của thỏ, cũng như các trình tự khác có khả năng kiểm soát việc biểu hiện gen ở các tế bào sinh vật có nhân điển hình. Các vùng kiểm soát phiên mã thích hợp bổ sung bao gồm các đoạn khởi đầu đặc hiệu mô và gen tăng cường cũng như các đoạn khởi đầu có thể gây cảm ứng (ví dụ đoạn khởi đầu có thể gây cảm ứng bằng tetraxyclin). Tương tự, nhiều loại yếu tố kiểm soát dịch mã là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật. Các yếu tố này bao gồm, nhưng không giới hạn ở các vị trí gắn kết ribosom, các codon khởi đầu và kết thúc dịch mã, và các yếu tố thu được từ hệ virut (cụ thể là vị trí xâm nhập ribosom nội bào, hoặc IRES, còn được gọi là trình tự CITE). Cat-xet biểu hiện cũng có thể bao gồm các dấu hiệu khác như là điểm khởi đầu sao chép, và/hoặc các yếu tố tích hợp nhiễm sắc thể như là đoạn lặp đầu tận cùng kéo dài của retrovirut (LTR), hoặc đoạn lặp đầu tận cùng nghịch đảo (ITR) của virut liên quan đến adenovirut (AAV).

Các vùng mã hoá polynucleotit và axit nucleic của sáng chế có thể được kết hợp với các vùng mã hoá bổ sung mã hoá các peptit bài tiết hoặc tín hiệu, các tín hiệu này điều khiển việc bài tiết polypeptit được mã hoá bởi polynucleotit của sáng chế. Ví dụ, nếu cần phân tử bài tiết gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, ADN mã hoá trình tự tín hiệu có thể đặt phía trước axit nucleic mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế hoặc mảnh của nó. Theo giả thuyết tín hiệu, các protein được bài tiết bởi các tế bào động vật có vú có trình tự dẫn peptit tín hiệu hoặc bài tiết được phân giải từ protein trưởng thành sau khi khởi đầu quá trình truy xuất mạch protein đang tăng trưởng qua lưới nội mô. Người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật biết được là các polypeptit được bài tiết bởi các tế bào động vật có xương sống nói chung có peptit tín hiệu được dung hợp với đầu tận cùng N của polypeptit, polypeptit này được phân giải từ polypeptit được dịch mã để tạo ra dạng được bài tiết hoặc "trưởng thành" của polypeptit. Theo một vài phương án, peptit tín hiệu nguyên thuỷ, *ví dụ* peptit tín hiệu globulin miễn dịch chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được sử dụng, hoặc dẫn xuất hoạt động của trình tự đó vẫn giữ được khả năng điều khiển việc bài tiết polypeptit mà được kết hợp có điều khiển với nó. Theo cách khác, có thể sử dụng peptit tín hiệu của động vật có vú khác loài, hoặc dẫn xuất hoạt động của nó. Ví dụ, trình tự dẫn kiểu hoang có thể được thay thế bằng trình tự dẫn yếu tố hoạt hoá plasminogen mô của người (TPA) hoặc β-glucuronidaza của chuột. Trình tự axit amin và polynucleotit của các peptit tín hiệu bài tiết được nêu trong các SEQ ID NO 108-116.

ADN mã hoá trình tự protein ngắn mà có thể được sử dụng để tạo thuận lợi cho quá trình tinh chế sau đó (ví dụ nhãn histidin) hoặc hỗ trợ gắn nhãn phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được bao gồm bên trong hoặc ở các đầu của polynucleotit mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh).

Theo một phương án khác, tế bào vật chủ bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit của sáng chế được đề cập đến. Theo một vài phương án, tế bào vật chủ bao gồm một hoặc nhiều vectơ của sáng chế được đề cập đến. Các polynucleotit và các vectơ có thể hợp nhất dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu, một cách đơn lẻ hoặc tổ hợp, lần lượt được mô tả trong bản mô tả này liên quan đến các polynucleotit và các vectơ. Theo phương án này, tế bào vật chủ bao gồm (ví dụ đã được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với) vectơ bao gồm polynucleotit mã hoá (một phần của) phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào vật chủ" chỉ loại hệ tế bào bất kỳ có thể được xử lý để tạo ra các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế hoặc các mảnh của nó. Các tế bào vật chủ thích hợp để sao chép và hỗ trợ việc biểu hiện các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T là đã biết trong lĩnh vực này. Các tế bào này có thể được chuyển nhiễm hoặc tải nạp thích hợp với vectơ biểu hiện cụ thể và lượng lớn các tế bào chứa vectơ có thể được sinh trưởng để gây giống quy mô lớn hơn để thu được lượng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T đủ cho ứng dụng lâm sàng. Các tế bào vật chủ thích hợp bao gồm sinh vật nhân chuẩn, như là E. coli, hoặc nhiều loại tế bào sinh vật có nhân điển hình, như là tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO), các tế bào côn trùng, hoặc tế bào tương tự. Ví dụ, các polypeptit có thể được sản xuất ở vi khuẩn đặc biệt khi không cần đến quá trình glycosyl hoá. Sau khi biểu hiện, polypeptit có thể được phân lập từ sinh khối tế bào vi khuẩn ở phân đoạn hoà tan và có thể được tinh chế tiếp. Ngoài các sinh vật nhân chuẩn, vi sinh vật có nhân điển hình như là nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp đối với các vectơ mã hoá-polypeptit, kể cả các chủng nấm và nấm men, trong đó con đường glycosyl hoá của chúng đã "được làm tương thích với người", dẫn đến sản sinh polypeptit có kiểu glycosyl hoá một phần hoặc hoàn toàn là của người. Xem tài liệu: Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), của Gerngross, và Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Các tế bào vật chủ thích hợp để biểu hiện các polypeptit (được glycosyl hoá) cũng thu được từ các sinh

vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Ví dụ về các tế bào động vật không xương sống bao gồm các tế bào thực vật và côn trùng. Nhiều chủng baculovirus đã được xác định có thể sử dụng kết hợp với các tế bào côn trùng, cụ thể là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*. Có thể sử dụng nuôi cấy tế bào thực vật làm vật chủ. Xem tài liệu, ví dụ các Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để sản xuất các kháng thể ở thực vật chuyển gen). Các tế bào động vật có xương sống cũng có thể sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú được làm thích hợp để sinh trưởng trong huyền phù có thể là hữu ích. Ví dụ khác về các dòng tế bào vật chủ có vú hữu ích là dòng tế bào CV1 thận của khỉ được biến nạp với SV40 (COS-7); dòng tế bào phôi thận của người (các tế bào 293 hoặc 293T như được mô tả trong tài liệu, ví dụ, J Gen Virol 36, 59 (1977) của Graham và các đồng tác giả), tế bào thận chuột đồng con (BHK), tế bào Sertoli của chuột (các tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Biol Reprod 23, 243-251 (1980) của Mather), tế bào thận khỉ (CV1), tế bào thận khỉ xanh Châu Phi (VERO-76), các tế bào carxinoma cổ tử cung của người (HELA), tế bào thận chó (MDCK), tế bào gan chuột buffalo (BRL 3A), tế bào phổi của người (W138), tế bào gan của người (Hep G2), các tế bào khối u vú của chuột (MMT 060562), các tế bào TRI (như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982) của Mather và các đồng tác giả), các tế bào MRC 5, và các tế bào FS4. Các dòng tế bào vật chủ có vú hữu ích bao gồm các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO), bao gồm các tế bào dhfr$^-$ CHO (Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980), của Urlaub và các đồng tác giả); và các dòng tế bào u tuỷ như là YO, NS0, P3X63 và Sp2/0. Để xem xét các dòng tế bào vật chủ có vú thích hợp để sản xuất protein, xem tài liệu, ví dụ, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) của Yazaki và Wu. Các tế bào vật chủ bao gồm các tế bào được nuôi cấy, ví dụ, các tế bào động vật có vú, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, các tế bào vi khuẩn và các tế bào thực vật được nuôi cấy, kể cả các tế bào trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc mô thực vật hoặc động vật được nuôi cấy. Theo một phương án, tế bào vật chủ là tế bào có nhân điển hình, tốt hơn là tế bào động vật có vú, như là tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO), tế bào phôi thận của người (HEK) hoặc tế bào lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20).

Các công nghệ chuẩn là đã biết trong lĩnh vực này để biểu hiện các gen lạ trong các hệ thống này. Các tế bào biểu hiện polypeptit bao gồm chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của miền gắn kết kháng nguyên như là kháng thể, có thể được xử lý để biểu hiện mạch còn lại trong số các mạch kháng thể sao cho sản phẩm được biểu hiện là kháng thể có cả hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm nuôi cấy tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, như đề cập trong bản mô tả này, trong điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, và thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T từ tế bào vật chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào vật chủ).

Các cấu phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dung hợp di truyền với nhau. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T có thể được thiết kế sao cho các cấu phần của nó được dung hợp trực tiếp với nhau hoặc hoặc gián tiếp thông qua một trình tự liên kết. Thành phần và độ dài của liên kết này có thể được xác định theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và có thể được thử nghiệm về hiệu lực. Ví dụ về các trình tự liên kết giữa các cấu phần khác nhau của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được tìm thấy trong các trình tự được đề cập trong bản mô tả này. Cũng có thể bao gồm thêm các trình tự bổ sung để hợp nhất một vị trí phân cắt nhằm tách loại các cấu phần riêng rẽ của thể dung hợp, nếu muốn, ví dụ trình tự nhận biết endopeptidaza.

Theo một vài phương án, một hoặc nhiều phần gắn kết kháng nguyên của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T bao gồm ít nhất vùng biến đổi kháng thể có khả năng gắn kết phần quyết định tính kháng nguyên. Các vùng biến đổi có thể tạo thành một phần của và thu được từ các kháng thể có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên và các mảnh của chúng. Các phương pháp sản xuất các kháng thể đa dòng và các kháng thể đơn dòng là đã biết trong lĩnh vực này (xem tài liệu, ví dụ "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, của Harlow và Lane). Các kháng thể không có trong tự nhiên có thể được cấu trúc bằng cách tổng hợp peptit-pha rắn, có thể được sản xuất bằng cách tái tổ hợp (ví dụ như được mô tả trong Bằng độc

quyền sáng chế của Mỹ số US 4,186,567) hoặc có thể thu được, ví dụ, bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp bao gồm các chuỗi nặng thay đổi và các chuỗi nhẹ thay đổi (xem tài liệu, ví dụ Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số US 5,969,108 cấp cho McCafferty).

Kháng thể, mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của loài động vật bất kỳ có thể được sử dụng trong các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế. Các kháng thể, các mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc các vùng biến đổi không mang tính giới hạn, hữu ích theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ chuột, động vật linh trưởng hoặc người. Nếu phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T dự định sử dụng cho người, có thể sử dụng dạng khảm kháng thể, trong đó các vùng ổn định của kháng thể là từ người. Có thể điều chế dạng kháng thể được làm tương thích với người hoặc hoàn toàn là của người theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem tài liệu, ví dụ Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 5,565,332 của Winter). Có thể làm tương thích với người bằng nhiều phương pháp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở (a) ghép các CDR không phải của người (ví dụ, kháng thể cho) vào vùng khung và vùng ổn định của người (ví dụ kháng thể nhận) có giữ lại hoặc không có giữ lại các gốc khung quan trọng (ví dụ, các gốc quan trọng để giữ được ái lực gắn kết kháng nguyên hoặc các chức năng kháng thể), (b) chỉ ghép các vùng xác định-tính đặc hiệu không phải của người (các SDR hoặc a-CDR; các gốc quan trọng để tương tác kháng nguyên-kháng thể) vào các vùng khung và vùng ổn định của người, hoặc (c) cấy ghép toàn bộ các miền biến đổi không phải của người, nhưng "bao bọc" chúng bằng các đoạn tương tự của người bằng cách thay thế các gốc bề mặt. Các kháng thể được làm tương thích với người và các phương pháp điều chế chúng được tổng hợp trong tài liệu, ví dụ, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008) của Almagro và Fransson, và còn được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Nature 332, 323-329 (1988), của Riechmann và các đồng tác giả; Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989), của Queen và các đồng tác giả; các Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, và 7,087,409; Nature 321, 522-525 (1986), của Jones và các đồng tác giả; Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984), của Morrison và các đồng tác giả; Adv Immunol 44, 65-92 (1988), của Morrison và Oi; Science 239, 1534-1536 (1988), của Verhoeyen và các đồng tác giả; Molec Immun 31(3), 169-217 (1994), của Padlan; Methods 36, 25-34 (2005) (mô tả ghép SDR (a-CDR)), của Kashmiri và các đồng tác giả; Mol Immunol 28, 489-498 (1991), của Padlan (mô tả “tái tạo bề mặt”); Methods 36, 43-60 (2005) (mô tả “việc xáo

trộn FR"), của Dall'Acqua và các đồng tác giả; và Methods 36, 61-68 (2005) của Osbourn và các đồng tác giả, và Br J Cancer 83, 252-260 (2000) (mô tả phương pháp "chọn lọc được dẫn hướng" để xáo trộn FR), của Klimka và các đồng tác giả. Các kháng thể của người và các vùng biến đổi của người có thể được sản xuất bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Các kháng thể của người nói chung được mô tả trong tài liệu: Curr Opin Pharmacol 5, 368-74 (2001) của van Dijk và van de Winkel, và Curr Opin Immunol 20, 450-459 (2008) của Lonberg. Các vùng biến đổi của người có thể tạo thành một phần của và thu được từ các kháng thể đơn dòng của người được tạo ra bằng phương pháp tế bào lai (xem tài liệu, ví dụ Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Các kháng thể của người và các vùng biến đổi của người cũng có thể được điều chế bằng cách cho một động vật chuyển gen dùng chất sinh miễn dịch, động vật này đã được cải biến để sản sinh các kháng thể nguyên vẹn của người hoặc các kháng thể nguyên vẹn với các vùng biến đổi của người để đáp ứng với kích thích kháng nguyên (xem tài liệu, ví dụ, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005) của Lonberg). Các kháng thể của người và các vùng biến đổi của người có thể được tạo ra bằng cách phân lập trình tự vùng biến đổi dòng Fv được chọn từ các thư viện bộc lộ thể thực khuẩn thu được từ người (xem tài liệu, ví dụ, Methods in Molecular Biology 178, 1-37, của Hoogenboom và các đồng tác giả (Human Press, Totowa, NJ, 2001, O'Brien và các đồng tác giả, hiệu đính); và Nature 348, 552-554 của McCafferty và các đồng tác giả; Nature 352, 624-628 (1991), của Clackson và các đồng tác giả). Các thể thực khuẩn thông thường bộc lộ mảnh kháng thể, hoặc dưới dạng các mảnh mạch đơn Fv (scFv) hoặc dưới dạng các mảnh Fab.

Theo một vài phương án, các phần gắn kết kháng nguyên hữu ích trong sáng chế được xử lý để có ái lực gắn kết tăng cường theo, ví dụ, các phương pháp được bộc lộ trong Đơn đề nghị cấp Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 2004/0132066, được viện dẫn ở đây để tham khảo. Khả năng của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế gắn kết với phần quyết định tính kháng nguyên đặc hiệu có thể được xác định qua thử nghiệm hấp phụ-enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (được phân tích trên hệ máy BIACORE T100) (Liljeblad, và các đồng tác giả, Glyco J 17, 323-329 (2000)), và các thử nghiệm gắn kết truyền thống (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Có thể sử dụng các thử nghiệm cạnh tranh để xác định

một kháng thể, mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc miền biến đổi cạnh tranh với kháng thể tham chiếu gắn kết với một kháng nguyên cụ thể, ví dụ kháng thể cạnh tranh với kháng thể V9 gắn kết với CD3. Theo một vài phương án, kháng thể cạnh tranh này gắn kết với cùng epitop (ví dụ epitop mạch thẳng hoặc cấu dạng) mà được gắn kết bởi kháng thể tham chiếu. Các phương pháp ví dụ được mô tả chi tiết để lập bản đồ epitop mà kháng thể gắn kết với được đề cập trong tài liệu: "Epitope Mapping Protocols," (1996) trong Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ), của Morris. Trong một thử nghiệm cạnh tranh ví dụ, kháng nguyên được làm bất động (ví dụ CD3) được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất mà gắn kết với kháng nguyên (ví dụ kháng thể V9, được mô tả trong Bằng độc quyền sáng chế số US 6,054,297) và kháng thể không được đánh dấu thứ hai sẽ được thử nghiệm về khả năng cạnh của nó với kháng thể thứ nhất để gắn kết với kháng nguyên. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi tế bào lai. Mẫu đối chứng là kháng nguyên được làm bất động ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất, nhưng không có kháng thể không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ trong điều kiện cho phép gắn kết kháng thể thứ nhất với kháng nguyên, loại bỏ kháng thể chưa gắn kết còn dư, và lượng chất đánh dấu kết hợp với kháng nguyên bất động được xác định. Nếu lượng chất đánh dấu kết hợp với kháng nguyên bất động về cơ bản giảm đi trong mẫu thử so với mẫu đối chứng, thì cho thấy là kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất gắn kết với kháng nguyên. Xem tài liệu: Antibodies: A Laboratory Manual chương14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), của Harlow và Lane (1988).

Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được điều chế như được mô tả trong bản mô tả này có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật đã biết, như là sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký trao đổi ion, điện di gel, sắc ký ái lực, sắc ký loại trừ kích cỡ, và kỹ thuật tương tự. Điều kiện thực tế được sử dụng để tinh chế một protein cụ thể sẽ tuỳ thuộc, một phần, vào các yếu tố như là điện tích toàn phần, tính ưa dầu, tính ưa nước, v.v., và sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Để tinh chế bằng sắc ký ái lực, có thể sử dụng kháng thể, phối tử, thụ thể hoặc kháng nguyên mà phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn với. Ví dụ, để tinh chế sắc ký ái lực các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế, có thể sử dụng chất nền với protein A hoặc protein G. Sắc ký ái lực và sắc ký loại trừ kích cỡ Protein A hoặc G lần lượt có thể được sử dụng để phân lập phân tử gắn

kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T về cơ bản như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Độ tinh khiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được xác định bằng phương pháp phân tích bất kỳ đã biết, bao gồm điện di gel, sắc ký lỏng hiệu năng cao, và phương pháp tương tự. Ví dụ, các protein dung hợp chuỗi nặng được biểu hiện như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế được cho thấy là nguyên vẹn và được lắp ghép đúng như chứng tỏ bằng SDS-PAGE (xem, ví dụ Fig. 4). Ba vết được phân tách ở khoảng Mr 25.000, Mr 50.000 và Mr 75.000, tương ứng với trọng lượng phân tử dự đoán của protein dung hợp chuỗi nhẹ, chuỗi nặng và chuỗi nặng/chuỗi nhẹ phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T.

Thử nghiệm

Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được đề cập trong bản mô tả này có thể được xác định, sàng lọc, hoặc xác định đặc tính vật lý/hoá và/hoặc hoạt tính sinh học bằng nhiều loại thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này.

Thử nghiệm ái lực

Ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T đối với thụ thể Fc hoặc kháng nguyên đích có thể được xác định theo các phương pháp nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), sử dụng thiết bị tiêu chuẩn như là thiết bị BIAcore (GE Healthcare), và các thụ thể hoặc các protein đích ví dụ có thể thu được bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Theo cách khác, có thể đánh giá mức gắn kết các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T đối với các thụ thể khác nhau hoặc các kháng nguyên đích bằng cách sử dụng các dòng tế bào biểu hiện thụ thể cụ thể hoặc kháng nguyên đích này, ví dụ bằng đo lưu lượng tế bào (FACS). Phương án minh hoạ cụ thể và nêu ví dụ để xác định ái lực gắn kết được mô tả dưới đây và trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Theo một phương án, K_D được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng máy BIACORE® T100 (GE Healthcare) ở 25°C.

Để phân tích tương tác giữa đoạn-Fc và các thụ thể Fc, thụ thể Fc tái tổ hợp gắn đuôi nhãn-His được bắt giữ bởi kháng thể kháng-Penta His (Qiagen) được làm bất động trên các chip CM5 và các cấu trúc đặc hiệu kép được sử dụng làm các chất phân tích. Tóm lại, các chíp cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hoá (CM5, GE

Healthcare) được hoạt hoá bằng N-etyl-N'-(3-đimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorua (EDC) và N-hydroxysucxinimit (NHS) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng thể kháng-Penta-His được pha loãng bằng dung dịch natri axetat 10 mM, pH 5,0, đến nồng độ 40 µg/ml trước khi tiêm ở tốc độ chảy 5 µl/phút để thu được khoảng 6500 đơn vị đáp ứng (RU) của protein ngẫu hợp. Sau khi tiêm phối tử, tiêm 1 M etanolamin để phong bế các nhóm chưa phản ứng. Sau đó, thụ thể Fc được bắt giữ trong 60 giây ở 4 hoặc 10 nM. Để xác định động học, tiêm dịch pha loãng theo bậc bốn-lần của cấu trúc đặc hiệu kép (trong khoảng từ 500 nM đến 4000 nM) vào HBS-EP (GE Healthcare, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20, pH 7,4) ở 25 °C ở tốc độ chảy 30 µl/phút trong 120 giây.

Để xác định ái lực với kháng nguyên đích này, các cấu trúc đặc hiệu kép được bắt giữ bởi kháng thể đặc hiệu Fab kháng người (GE Healthcare) được làm bất động trên bề mặt chíp cảm biến-CM5 được hoạt hoá như được mô tả đối với kháng thể kháng Penta-His. Lượng protein được ngẫu hợp thành phẩm khoảng 12000 RU. Các cấu trúc đặc hiệu kép được bắt giữ trong 90 giây ở 300 nM. Các kháng nguyên đích được cho qua các mao quản 'flow cell' trong 180 giây ở nồng độ trong khoảng từ 250 đến 1000 nM với tốc độ chảy 30 µl/phút. Theo dõi quá trình phân ly trong 180 giây.

Hiệu chỉnh sự khác biệt chỉ số khúc xạ thô bằng cách trừ mức đáp ứng thu được đối với mao quản 'flow cell' tham chiếu. Mức đáp ứng ở trạng thái ổn định được sử dụng để tính hằng số phân ly K_D bằng cách khớp số liệu vào đường cong không tuyến tính đồ thị đẳng nhiệt gắn kết Langmuir. Tính tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một-một đơn giản (BIACORE® T100 Evaluation Software version 1.1.1) bằng cách khớp số liệu đồng thời đồ thị cảm biến kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly (K_D) cân bằng được tính bằng tỷ số k_{off}/k_{on}. Xem tài liệu, ví dụ, J Mol Biol 293, 865-881 (1999), của Chen và các đồng tác giả.

Thử nghiệm hoạt tính

Hoạt tính sinh học của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế có thể được xác định bằng nhiều thử nghiệm như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Các hoạt tính sinh học, ví dụ có thể bao gồm gây cảm ứng tăng sinh các tế bào T, gây cảm ứng phát tín hiệu ở các tế bào T, gây cảm ứng biểu hiện các chất đánh dấu hoạt hoá ở các tế bào T, gây cảm ứng bài tiết xytokin bởi các tế bào T,

gây cảm ứng phân giải các tế bào đích như là các tế bào khối u, và gây cảm ứng ức chế khối u và/hoặc cải thiện tỷ lệ sống sót.

Thành phần, chế phẩm, và đường dùng

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được đề cập trong bản mô tả này, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp điều trị bất kỳ nêu dưới đây. Theo một phương án, dược phẩm bao gồm phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được đề cập trong bản mô tả này và chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm bao gồm phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được đề cập trong bản mô tả này và ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, như được mô tả dưới đây.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T ở dạng thích hợp để sử dụng *in vivo*, phương pháp này bao gồm (a) thu được phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T theo sáng chế, và (b) bào chế phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T với ít nhất một chất mang dược dụng, do đó chế phẩm của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được bào chế để sử dụng *in vivo*.

Dược phẩm theo sáng chế bao gồm một lượng có hiệu quả điều trị của một hoặc nhiều phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được hoà tan hoặc phân tán trong chất mang dược dụng. Thuật ngữ "dược dụng hoặc dược lý dụng" chỉ các phân tử và chế phẩm nói chung không độc đối với đối tượng tiếp nhận ở mức liều dùng và nồng độ sử dụng, có nghĩa là không gây phản ứng bất lợi, dị ứng hoặc không mong muốn khác khi dùng cho động vật, như là, ví dụ, người, khi thích hợp. Việc bào chế dược phẩm có chứa ít nhất một phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T và tuỳ ý hoạt chất bổ sung khác là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật, theo bản mô tả sáng chế này, như được minh hoạ trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990. Hơn nữa, để sử dụng cho động vật (ví dụ, người), nên hiểu là các chế phẩm đáp ứng tiêu chuẩn về độ vô khuẩn, chí nhiệt tố, tính an toàn nói chung và độ tinh khiết theo quy định của Văn phòng Tiêu chuẩn Sinh phẩm Cục Thuốc và Dược phẩm Mỹ (FDA Office of Biological Standards) hoặc cơ quan có thẩm quyền tương ứng ở các nước khác. Chế phẩm được ưu

tiên là chế phẩm đông khô hoặc dung dịch nước. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "chất mang dược dụng" bao gồm chất bất kỳ và tất cả các dung môi, các chất đệm, các môi trường phân tán, các chất bao, các chất hoạt động bề mặt, các chất chống oxy các hoá, các chất bảo quản (*ví dụ* các chất kháng khuẩn, các chất kháng nấm), các chất đẳng trương, các chất làm chậm quá trình hấp thu, các muối, các chất bảo quản, các chất chống oxy hoá, các protein, các thuốc, các chất làm ổn định thuốc, các polyme, các gel, các chất kết dính, các tá dược, các chất phân rã, các chất làm trơn, các làm ngọt, các chất điều vị, các chất nhuộm màu, các chất tương tự và hỗn hợp của chúng, như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật (xem tài liệu, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Trừ khi chất mang thông thường không tương hợp với hoạt chất, việc sử dụng chất này trong chế phẩm trị liệu hoặc dược phẩm là được dự định.

Chế phẩm có thể bao gồm các loại chất mang khác nhau tuỳ thuộc vào việc chế phẩm này sẽ được sử dụng ở dạng rắn, lỏng hoặc sol khí, và vào việc chế phẩm này có cần thiết phải vô khuẩn để dùng đường tiêm hay không. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế (và chất trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể sử dụng qua đường tĩnh mạch, trong da, trong động mạch, trong phúc mạc, trong thương tổn, trong sọ, trong khớp, trong tiền liệt tuyến, trong lách, trong thận, trong màng phổi, trong khí quản, trong mũi, trong mắt, trong trực tràng, trong khối u, trong bắp cơ, qua niêm mạc, trong màng tim, trong cuống rốn, trong nhãn cầu, qua đường miệng, qua đường ngoài da, qua đường khu trú, bằng cách xông hít, (ví dụ xông sol khí), tiêm, truyền, truyền liên tục, thẩm thấm khu trú trực tiếp vào các tế bào đích, qua ống thông, qua ống thụt rửa, ở dạng chế phẩm kem, lỏng (ví dụ các liposom), hoặc bằng cách khác hoặc cách kết hợp bất kỳ của các cách nêu trên như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật (xem tài liệu, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Sử dụng ngoài đường tiêu hoá, đặc biệt là tiêm tĩnh mạch là hay dùng nhất để sử dụng các phân tử polypeptit như là các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế.

Các chế phẩm ngoài đường tiêu hoá bao gồm các chế phẩm được thiết kế để sử dụng bằng cách tiêm, ví dụ tiêm dưới da, trong da, trong thương tổn, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong bắp cơ, trong nội tuỷ mạc, hoặc trong phúc mạch. Để tiêm, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế có thể được

bào chế trong các dung dịch nước, tốt hơn là trong các dịch đệm tương thích về mặt sinh lý như là dung dịch Hanks', dung dịch Ringer, hoặc nước muối sinh lý. Dung dịch có thể chứa các chất bào chế như là các chất tạo hỗn dịch, làm ổn định và/hoặc gây phân tán. Theo cách khác, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T có thể ở dạng bột để pha hoàn nguyên với chất dẫn thích hợp, ví dụ, nước vô khuẩn không có chí nhiệt tố, trước khi sử dụng. Các dung dịch tiêm vô khuẩn được điều chế bằng cách kết hợp các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế với lượng cần thiết vào dung môi thích hợp với nhiều thành phần khác nêu dưới đây, nếu cần. Có thể đạt được độ vô khuẩn, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô khuẩn. Nói chung, các hệ phân tán được điều chế bằng cách kết hợp nhiều hoạt chất vô khuẩn vào chất dẫn vô khuẩn có chứa môi trường phân tán cơ bản và/hoặc các thành phần khác. Trong trường hợp bột vô khuẩn để pha thành các dung dịch, hỗn dịch hoặc nhũ tương để tiêm vô khuẩn, các phương pháp bào chế được ưu tiên là kỹ thuật làm khô-chân không hoặc đông khô, các kỹ thuật này cho bột có chứa hoạt chất và thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ môi trường lỏng được lọc vô khuẩn trước đó của nó. Môi trường lỏng này được tạo đệm thích hợp nếu cần và chất pha loãng lỏng được làm đẳng trương trước khi tiêm bằng nước muối hoặc glucoza vừa đủ. Chế phẩm cần phải ổn định trong điều kiện sản xuất và bảo quản, và được bảo quản chống lại tác dụng lây nhiễm của vi sinh vật, như là vi khuẩn và nấm. Nên hiểu là nhiễm nội độc tố phải được giữ tối thiểu ở mức an toàn, ví dụ, thấp hơn 0,5 ng/mg protein. Các chất mang dược dụng thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất đệm như là phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hoá bao gồm axit ascorbic và methionin; các chất bảo quản (như là octadecyldimetylbenzyl amoni clorua; hexametoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; phenol, rượu butylic hoặc benzylic; các alkyl paraben như là metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorcinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit phân tử lượng thấp (thấp hơn khoảng 10 gốc); các protein, như là albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như là polyvinylpyrolidon; axit amin như là glyxin, glutamin, asparagin, histiđin, arginin, hoặc lysin; các monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc các dextrin; các chất càng cua như là EDTA; các đường như là sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion đối ứng tạo muối như là natri; các phức hợp kim loại (ví dụ phức protein-Zn); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như là polyetylen glycol (PEG). Hỗn dịch

tiêm nước có thể chứa các hợp chất làm giảm độ nhớt của hỗn dịch, như là natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, dextran, hoặc chất tương tự. Tuỳ ý, hỗn dịch cũng có thể chứa các chất làm ổn định hoặc các chất thích hợp khác làm tăng độ tan của các hợp chất, để cho phép điều chế các dung dịch đậm đặc nồng độ cao. Ngoài ra, các hỗn dịch có chứa các hợp chất có hoạt tính có thể được điều chế dưới dạng hỗn dịch tiêm dầu thích hợp. Các dung môi hoặc chất dẫn ưa dầu thích hợp bao gồm các dầu béo như là dầu vừng, hoặc các este của axit béo tổng hợp, như là etyl oleat hoặc các triglyxerit, hoặc liposom.

Các thành phần hoạt tính có thể đóng vi nang, được bào chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật đồng ngưng tụ hoặc bằng cách trùng hợp bề mặt, ví dụ, các vi nang hydroxymetylxenluloza hoặc gelatin và các vi nang poly-(metylmetacrylat), trong các hệ chuyển vận thuốc dạng keo, (ví dụ, các liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano và nang nano) hoặc nhũ tương kích thước pha phân tán lớn hơn. Các kỹ thuật này được đề cập trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Có thể bào chế các chế phẩm giải phóng kéo dài. Các ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm các chất nền bán thấm là các polyme ưa dầu dạng rắn có chứa polypeptit, mà ở dạng các hệ có hình dạng, ví dụ các màng tấm, hoặc vi nang. Theo các phương án cụ thể, hấp thu kéo dài từ một chế phẩm để tiêm có thể đạt được bằng cách sử dụng trong các chế phẩm này các chất làm chậm hấp thu, như là, ví dụ, nhôm monostearat, gelatin hoặc hỗn hợp của chúng.

Ngoài các chế phẩm mô tả trên đây, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T cũng có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm tác dụng chậm. Các chế phẩm tác dụng kéo dài này có thể được sử dụng bằng cách cấy (ví dụ dưới da hoặc trong bắp cơ) hoặc bằng cách tiêm bắp. Bởi vậy, ví dụ, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T có thể được bào chế với các chất polyme hoặc kỵ dầu thích hợp (ví dụ dưới dạng nhũ tương trong dầu dược dụng) hoặc nhựa trao đổi ion, hoặc dưới dạng các dẫn xuất ít tan, ví dụ, dưới dạng muối ít tan.

Các dược phẩm bao gồm các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế có thể được sản xuất bằng quá trình trộn, hoà tan, nhũ hoá, đóng nang, bẫy hoạt chất hoặc đông khô thông thường. Các dược phẩm có thể được bào chế theo cách thông thường sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất phụ trợ sinh lý dụng tạo thuận lợi cho quá trình chế biến các protein thành các chế

phẩm có thể được sử dụng làm dược phẩm. Việc bào chế đúng cách tuỳ thuộc vào đường dùng được chọn.

Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T có thể được bào chế thành chế phẩm ở dạng axit hoặc bazơ tự do, dạng trung tính hoặc dạng muối. Các muối dược dụng là các muối về cơ bản giữ được hoạt tính sinh học của axit hoặc bazơ tự do. Các muối này bao gồm các muối cộng axit, ví dụ, các muối được tạo thành với các nhóm amino tự do của chế phẩm protein, hoặc các muối được tạo thành với các axit vô cơ, như là ví dụ, các axit clohyđric hoặc phosphoric, hoặc axit hữu cơ như axit axetic, axit oxalic, axit tartric hoặc axit mandelic. Các muối được tạo thành với các nhóm carboxyl tự do cũng có thể thu được từ bazơ vô cơ như là ví dụ, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt hydroxit; hoặc các bazơ hữu cơ như isopropylamin, trimetylamin, histiđin hoặc procain. Các muối dược dụng có xu hướng dễ tan trong dung môi nước và các dung môi proton hơn là dạng bazơ tự do tương ứng.

Phương pháp và chế phẩm trị liệu

Phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được đề cập trong bản mô tả này có thể sử dụng trong các phương pháp trị liệu. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng các chất trị liệu miễn dịch, ví dụ trong điều trị ung thư.

Để sử dụng trong các phương pháp trị liệu, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế sẽ được bào chế, phân liều, và sử dụng theo cách phù hợp với thực hành y học tốt. Các yếu tố cần xem xét trong trường hợp này bao gồm rối loạn cụ thể sẽ điều trị, động vật có vú cụ thể sẽ điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân gây rối loạn bệnh này, vị trí chuyển vận chất hoạt tính, sử dụng, phác đồ dùng, và các yếu tố khác đã biết đối với bác sỹ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế để sử dụng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế để sử dụng nhằm điều trị bệnh. Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế để sử dụng trong phương pháp điều trị. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T như được mô tả trong bản mô tả này để

sử dụng điều trị bệnh ở đối tượng cần điều trị này. Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T để sử dụng trong phương pháp điều trị cho một đối tượng có bệnh bao gồm cho đối tượng này dùng một lượng có hiệu quả điều trị của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T. Theo một vài phương án, bệnh sẽ điều trị là rối loạn tăng sinh. Theo một phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo một vài phương án, phương pháp này còn bao gồm cho đối tượng này dùng một lượng có hiệu quả điều trị ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, chất chống ung thư nếu bệnh sẽ điều trị là bệnh ung thư. Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T như được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng gây cảm ứng phân giải tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u. Theo một vài phương án, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T để sử dụng trong phương pháp gây cảm ứng phân giải tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u, ở đối tượng bao gồm cho đối tượng này dùng một lượng có hiệu quả của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để gây cảm ứng phân giải tế bào đích. "Đối tượng" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế để sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc là nhằm điều trị bệnh ở đối tượng cần điều trị này. Theo một phương án khác, thuốc để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh bao gồm cho một đối tượng có bệnh này dùng một lượng có hiệu quả điều trị của thuốc. Theo một vài phương án, bệnh sẽ điều trị là rối loạn tăng sinh. Theo một phương án cụ thể bệnh là bệnh ung thư. Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm cho đối tượng này dùng một lượng có hiệu quả điều trị của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, chất chống ung thư nếu bệnh sẽ điều trị là bệnh ung thư. Theo một phương án khác, thuốc là để gây cảm ứng phân giải tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u. Theo một phương án khác nữa, thuốc là để sử dụng trong phương pháp gây cảm ứng phân giải tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u, ở đối tượng bao gồm cho đối tượng này dùng một lượng có hiệu quả của thuốc để gây cảm ứng phân giải tế bào đích. "Đối tượng" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm cho một đối tượng có bệnh này dùng một lượng

có hiệu quả điều trị của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế. Theo một phương án, sử dụng cho đối tượng này một chế phẩm, bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế ở dạng dược dụng. Theo một vài phương án, bệnh sẽ điều trị là rối loạn tăng sinh. Theo một phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo một vài phương án, phương pháp này còn bao gồm cho đối tượng này dùng một lượng có hiệu quả điều trị của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, chất chống ung thư nếu bệnh sẽ điều trị là bệnh ung thư. "Đối tượng" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp gây cảm ứng phân giải tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm cho tế bào đích tiếp xúc với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế với sự có mặt của tế bào T, cụ thể là tế bào T gây độc tế bào. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp gây cảm ứng phân giải tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u, ở đối tượng sáng chế. Theo một phương án này, phương pháp này bao gồm cho đối tượng này dùng một lượng có hiệu quả của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T để gây cảm ứng phân giải tế bào đích. Theo một phương án, "đối tượng" là người.

Theo một vài phương án, bệnh sẽ điều trị là rối loạn tăng sinh, cụ thể là bệnh ung thư. Ví dụ không mang tính giới hạn về các bệnh ung thư bao gồm ung thư bàng quang, ung thư não, ung thư đầu và cổ, ung thư tuỵ, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư tử cung, ung thư cổ tử cung, ung thư nội mạc tử cung, ung thư thực quản, ung thư ruột, ung thư ruột kết trực tràng, ung thư trực tràng, ung thư dạ dày, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư máu, ung thư da, caxinoma tế bào vẩy, ung thư xương, và ung thư thận. Các rối loạn tăng sinh tế bào khác có thể được điều trị bằng cách sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở ung thư ở: bụng, xương, vú, hệ tiêu hoá, gan, tuỵ, phúc mạc, tuyến nội tiết (thận, cận giáp, tuyến yên, tinh hoàn, buồng trứng, tuyến ức, tuyến giáp), mắt, đầu và cổ, hệ thần kinh, (trung ương và ngoại biên), hệ mạch bạch huyết, khung xương chậu, da, mô mềm, lách, vùng lồng ngực, và hệ sinh dục niệu. Các bệnh này cũng bao gồm các tình trạng bệnh lý hoặc tổn thương tiền-ung thư và bệnh ung thư di căn. Theo một vài phương án, bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư da, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư ruột kết trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư não,

bệnh ung thư đầu và cổ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ dễ dàng nhận biết là trong nhiều trường hợp, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể không chữa khỏi bệnh, mà chỉ có lợi ích một phần. Theo một vài phương án, thay đổi sinh lý có một vài lợi ích cũng được xem là có lợi về mặt trị liệu. Bởi vậy, theo một vài phương án, một lượng của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T tạo ra thay đổi sinh lý được xem là "lượng có hiệu quả" hoặc "lượng có hiệu quả điều trị". Đối tượng, bệnh nhân, hoặc cá thể cần điều trị thông thường là động vật có vú, cụ thể hơn nữa là người.

Theo một vài phương án, một lượng có hiệu quả của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế được sử dụng cho một tế bào. Theo các phương án khác, một lượng có hiệu quả điều trị của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế được sử dụng cho đối tượng để điều trị bệnh.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế (khi sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác) sẽ tuỳ thuộc vào loại bệnh sẽ điều trị, đường dùng, trọng lượng cơ thể của bệnh nhân, loại phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T, mức độ nghiệm trọng và tiến trình của bệnh này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được sử dụng nhằm mục đích phòng bệnh hay trị bệnh, các can thiệp trị liệu trước đó hoặc dùng đồng thời, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng đối với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, và xem xét cân nhắc của bác sỹ điều trị. Bác sỹ chịu trách nhiệm cho việc sử dụng, trong bất kỳ trường hợp nào, sẽ xác định nồng độ (các) thành phần có hoạt tính trong chế phẩm và (các) liều dùng thích hợp cho đối tượng này. Nhiều phác đồ phân liều bao gồm nhưng không giới hạn ở sử dụng liều duy nhất hoặc nhiều liều vào các thời điểm khác nhau, dùng liều cao, và truyền theo nhịp là được dự định theo sáng chế.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được sử dụng thích hợp cho bệnh nhân ở một thời điểm hoặc qua các đợt điều trị. Tuỳ thuộc vào loại bệnh và mức độ nghiêm trọng của bênh, liều dùng từ 1 µg/kg đến 15 mg/kg (ví dụ 0,1 mg/kg – 10 mg/kg) phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T có thể là liều dùng thử ban đầu để sử dụng cho bệnh nhân, ví dụ, bằng cách sử dụng một lần hoặc nhiều lần riêng rẽ, hoặc bằng cách tiêm truyền liên tục. Liều dùng hàng ngày thông thường sẽ nằm

trong khoảng từ 1 µg/kg đến 100 mg/kg hoặc cao hơn, tuỳ thuộc vào các yếu tố nêu trên. Để sử dụng lặp lại trong vài ngày hoặc trong thời gian kéo dài hơn, tuỳ thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị nói chung sẽ kéo dài cho đến khi có ức chế triệu trứng bệnh mong muốn. Một liều dùng ví dụ của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T sẽ sẽ nằm trong khoảng từ 0,005 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg. Trong các ví dụ không mang tính giới hạn khác, liều dùng có thể từ khoảng 1 microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5 microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 10 microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 50 microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 100 microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 200 microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 350 microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 500 microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 1 miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5 miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 10 miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 50 miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 100 miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 200 miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 350 miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 500 miligam/kg trọng lượng cơ thể, đến khoảng 1000 mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc cao hơn cho mỗi lần dùng, và khoảng liều dùng bất kỳ trong các khoảng này. Trong ví dụ không mang tính giới hạn về khoảng liều dùng trong các khoảng liều dùng nêu trên, khoảng liều dùng từ khoảng 5 mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 100 mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng từ 5 microgam/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 500 miligam/kg trọng lượng cơ thể, v.v., có thể sử dụng, dựa trên các con số nêu trên. Bởi vậy, một hoặc nhiều liều dùng khoảng 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc kết hợp bất kỳ của chúng) có thể được sử dụng cho bệnh nhân. Các liều dùng này có thể được sử dụng cách quãng, ví dụ hàng tuần hoặc ba tuần một lần (ví dụ sao cho bệnh nhân tiếp nhận từ khoảng 2 đến khoảng 20, hoặc ví dụ khoảng 6 liều phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T). Liều tấn công ban đầu cao hơn, tiếp đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được sử dụng. Tuy nhiên, các phác đồ liều khác cũng có thể hữu ích. Tiến triển của phác đồ này được theo dõi dễ dàng bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường.

Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế nói chung sẽ được sử dụng với lượng có hiệu quả để đạt được mục đích dự định. Để sử dụng điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh lý, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế, hoặc dược phẩm của chúng, được sử dụng hoặc ứng dụng với một lượng có hiệu quả điều trị. Việc xác định một lượng có hiệu quả điều

trị là thuộc chuyên môn của người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật, đặc biệt là theo bản mô tả chi tiết này.

Để sử dụng toàn thân, liều có hiệu quả điều trị có thể ước tính bắt đầu từ các thử nghiệm *in vitro*, như là thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Liều dùng sau đó có thể được thiết lập ở mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ trong máu bao gồm IC_{50} như được xác định trong dịch nuôi cấy tế. Thông tin này có thể được sử dụng để xác định chính xác hơn các liều dùng hữu ích ở người.

Cũng có thể ước tính các liều dùng khởi đầu từ các dữ liệu *in vivo*, *ví dụ,* các mô hình động vật bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Người có hiểu biết trung bình thuộc lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng tối ưu hoá việc sử dụng cho người dựa trên dữ liệu trên động vật.

Có thể điều chỉnh liều lượng và khoảng cách dùng liều tuỳ theo từng đối tượng để cung cấp nồng độ trong huyết tương của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T đủ để duy trì tác dụng trị liệu. Liều dùng cho bệnh nhân thông thường để sử dụng bằng cách tiêm nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 đến 50 mg/kg/ngày, thông thường từ khoảng 0,5 đến 1 mg/kg/ngày. Nồng độ trong huyết tương có hiệu quả điều trị có thể đạt được bằng cách sử dụng nhiều liều trong ngày. Có thể đo nồng độ trong huyết tương, ví dụ, bằng HPLC.

Trong các trường hợp sử dụng tại chỗ hoặc hấp thụ chọn lọc, nồng độ có hiệu quả tại chỗ của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T có thể không liên quan đến nồng độ trong huyết tương. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ có thể tối ưu hoá liều dùng tại chỗ có hiệu quả điều trị mà không phải thử nghiệm quá mức.

Liều có hiệu quả điều trị của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được mô tả trong bản mô tả này nói chung sẽ đem lại các lợi ích trị liệu mà không gây độc tính đáng kể. Độc tính và hiệu quả trị liệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T có thể được xác định bằng các quy trình dược phẩm tiêu chuẩn ở dịch nuôi cấy tế bào hoặc động vật thí nghiệm. Các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và nghiên cứu trên động vật có thể được sử dụng để xác định LD_{50} (liều gây chết đối với 50% nhóm nghiên cứu) và ED_{50} (liều có hiệu quả điều trị ở 50% nhóm nghiên cứu). Tỷ lệ liều dùng giữa tác dụng gây độc và tác dụng trị liệu là chỉ số trị liệu,

có thể được biểu thị bằng tỷ số LD_{50}/ED_{50}. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T thể hiện các chỉ số trị liệu lớn được ưu tiên. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế thể hiện chỉ số trị liệu cao. Các dữ liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và nghiên cứu trên động vật có thể được sử dụng để bào chế nhiều mức liều dùng thích hợp để sử dụng ở người. Liều lượng tốt hơn là nằm trong khoảng nồng độ trong máu bao trùm ED_{50} với rất ít hoặc không có độc tính. Liều lượng có thể thay đổi trong khoảng này tuỳ thuộc vào nhiều yếu tố, ví dụ, dạng phân liều sử dụng, đường dùng sử dụng, thể trạng của đối tượng, và yếu tố tương tự. Chế phẩm, đường dùng và liều lượng chính xác có thể được chọn bởi bác sỹ điều trị căn cứ trên thể trạng của bệnh nhân (xem tài liệu, ví dụ: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Chương 1, trang 1, 1975, của Fingl và các đồng tác giả, được viện dẫn ở đây để tham khảo).

Bác sỹ điều trị cho bệnh nhân được điều trị bằng các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế sẽ biết được làm thế nào và khi nào nên ngừng, ngưng hoặc điều chỉnh việc sử dụng do độc tính, rối loạn chức năng cơ quan, và các tình huống tương tự. Ngược lại, bác sỹ cũng sẽ biết cách điều chỉnh liều điều trị lên mức cao hơn nếu đáp ứng trên lâm sàng là không thoả đáng (trừ trường hợp có độc tính). Mức liều được sử dụng để kiểm soát rối loạn bệnh lý quan tâm sẽ thay đổi theo mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý sẽ điều trị này, đường dùng và yếu tố tương tự. Mức độ nghiêm trọng, có thể, ví dụ, được đánh giá một phần bằng các phương pháp đánh giá tiên lượng tiêu chuẩn. Hơn nữa, liều dùng và có lẽ là tần suất liều dùng cũng sẽ thay đổi theo tuổi tác, trọng lượng cơ thể, và đáp ứng của đối tượng bệnh nhân.

Các chất và việc điều trị khác

Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu khác. Ví dụ, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế có thể được sử dụng đồng thời với ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Thuật ngữ "chất trị liệu" bao gồm chất bất kỳ được sử dụng để điều trị một triệu chứng hoặc bệnh ở đối tượng cần điều trị này. Chất trị liệu bổ sung này có thể bao gồm các thành phần hoạt tính bất kỳ thích hợp cho một chỉ định cụ thể sẽ điều trị, tốt hơn là các chất có các hoạt tính bổ sung mà không ảnh hưởng bất lợi lẫn nhau. Theo một vài phương án, chất trị liệu bổ sung là chất điều biến miễn dịch, chất

kìm hãm tế bào, chất ức chế bám dính tế bào, chất gây độc tế bào, chất hoạt hoá chết tế bào theo chương trình, hoặc một chất làm tăng tính mẫn cảm của các tế bào đối với các chất gây cảm ứng chết tế bào theo chương trình. Theo một phương án cụ thể, chất trị liệu bổ sung là chất chống ung thư, ví dụ chất phá vỡ vi quản, chất chống chuyển hoá, chất ức chế topoisomeraza, phân tử cài xen ADN, chất alkyl hoá, trị liệu hormon, chất ức chế kinaza, chất đối kháng thụ thể, chất hoạt hoá chết tế bào khối u theo chương trình, hoặc chất chống sinh mạch.

Các chất khác này là có mặt thích hợp kết hợp với những lượng có hiệu quả cho mục đích dự định. Lượng có hiệu quả của các chất này tuỳ thuộc vào lượng của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T được sử dụng, loại rối loạn hoặc bệnh điều trị, và các yếu tố khác nêu trên. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T nói chung được sử dụng ở cùng các mức liều và với các đường dùng như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc khoảng từ 1 đến 99% các mức liều được mô tả trong bản mô tả này, hoặc ở mức liều bất kỳ và theo đường dùng bất kỳ được xác định trên thực nghiệm hoặc lâm sàng là thích hợp.

Các phác đồ kết hợp nêu trên bao gồm việc sử dụng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều chất trị liệu được bao gồm trong cùng chế phẩm hoặc trong các chế phẩm riêng rẽ), và việc sử dụng riêng rẽ, trong trường hợp này, việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế có thể tiến hành trước, đồng thời, và/hoặc sau khi sử dụng chất trị liệu bổ sung và/hoặc chất phụ trợ. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế cũng có thể sử dụng kết hợp với xạ trị liệu.

Vật phẩm

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến vật phẩm có chứa các chất hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn nêu trên. Vật phẩm bao gồm bao gói và nhãn hoặc hướng dẫn sử dụng hoặc kết hợp với bao gói. Bao gói thích hợp, bao gồm, ví dụ, chai, lọ, xi-lanh, túi dịch truyền tĩnh mạch, v.v. Các bao gói có thể được làm từ nhiều loại vật liệu như là thuỷ tinh hoặc chất dẻo. Bao gói đựng chế phẩm, bản thân chế phẩm này hoặc kết hợp với một chế phẩm khác có hiệu quả để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán trình trạng bệnh lý và có thể có miệng tiếp cận vô khuẩn (ví dụ bao gói có thể là túi dung dịch truyền tĩnh mạch hoặc lọ có nút có thể chọc

bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế. Nhãn hoặc hướng dẫn sử dụng chỉ rõ vật phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý chọn lựa. Hơn nữa, vật phẩm có thể bao gồm (a) bao gói thứ nhất có chứa một chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm này bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T của sáng chế; và (b) bao gói thứ hai có chứa một chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm này còn bao gồm chất trị liệu gây độc tế bào hoặc chất trị liệu khác. Vật phẩm theo phương án này của sáng chế còn có thể bao gồm hướng dẫn sử dụng chỉ rõ là các chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị một tình trạng bệnh cụ thể. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm còn có thể bao gồm bao gói thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm chất đệm dược dụng, như là nước kìm khuẩn để tiêm (BWFI), nước muối được đệm-phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Chế phẩm này còn có thể bao gồm các chất khác mong muốn theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các chất đệm, chất pha loãng, màng lọc, kim tiêm và xi-ranh khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây là ví dụ về các phương pháp và chế phẩm của sáng chế. Cần hiểu là nhiều phương án khác có thể được thực hiện, dựa trên bản mô tả nêu trên.

Phương pháp chung

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các kỹ thuật tiêu chuẩn được sử dụng để xử lý ADN như được mô tả trong tài liệu: Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, của Sambrook và các đồng tác giả. Các chất thử sinh học phân tử được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thông tin chung về trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng miễn dịch của người được cung cấp trong tài liệu: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242, (1991) của Kabat, E.A. và các đồng tác giả.

Xác định trình tự ADN

Xác định các trình tự ADN bằng phương pháp xác định trình tự sợi kép.

Tổng hợp gen

Các đoạn gen mong muốn trong trường hợp cần thiết được tạo ra bằng PCR sử dụng các khuôn mẫu thích hợp hoặc được Geneart AG tổng hợp (Regensburg, Germany) từ các oligonucleotit tổng hợp và các sản phẩm PCR bằng cách tổng hợp gen tự động. Trong các trường hợp, khi không có sẵn trình tự gen chính xác, các đoạn mồi oligonucleotit được thiết kế dựa trên các trình tự từ các trình tự tương đồng nhất và phân lập các gen bằng RT-PCR từ ARN thu được từ mô thích hợp. Các đoạn gen tiếp giáp với các vị trí phân cắt bởi endonucleaza giới hạn duy nhất được tách dòng vào các vectơ tách dòng/xác định trình tự chuẩn. ADN plasmit được tinh chế từ các vi khuẩn được biến nạp và nồng độ được xác định bằng cách đo phổ UV. Trình tự ADN của các mảnh gen được tách dòng phụ được xác nhận bằng cách xác định trình tự ADN. Các đoạn gen được thiết kế với các vị trí giới hạn thích hợp cho phép tách dòng phụ vào các vectơ biểu hiện tương ứng. Tất cả các cấu trúc được thiết kế với trình tự ADN đầu-5' mã hoá peptit dẫn nhằm đích các protein bài tiết ở các tế bào sinh vật có nhân điển hình. Các peptit dẫn ví dụ và trình tự polynucleotit mã hoá chúng được mô tả trong các SEQ ID NO 108-116.

Phân lập các tế bào T pan của người sơ cấp từ các PBMC

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm tỷ trọng Histopaque từ các chế phẩm lympho bào đã làm giàu (bao phủ buffy) thu được từ ngân hàng máu địa phương hoặc từ máu mới lấy từ người cho khoẻ mạnh. Tóm lại, pha loãng máu bằng PBS vô khuẩn và cẩn thận tạo lớp trên gradien Histopaque (Sigma, H8889). Sau khi ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 4500 m/s^2 (450 x g)) ở nhiệt độ trong phòng (tắt nút hãm), phần huyết tương phía trên PBMC có chứa đoạn phân pha được bỏ đi. Các PBMC được chuyển vào các ống nghiệm Falcon 50 ml mới và làm đầy các ống nghiệm bằng PBS đến thể tích 50 ml. Ly tâm hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút ở tốc độ 4000 m/s^2 (400 x g) (bật nút hãm). Dịch nổi được bỏ đi và các viên tròn PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô khuẩn (các bước ly tâm ở 4°C trong 10 phút ở tốc độ 3500 m/s^2 (350 x g)). Các PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và được bảo quản trong môi trường RPMI1640, có chứa 10% FCS và 1% L-alanyl-L-glutamin (Biochrom, K0302) ở 37°C, 5% CO_2 trong tủ ủ cho đến khi bắt đầu thử nghiệm.

Tiến hành làm giàu tế bào T từ các PBMC bằng cách sử dụng bộ kit II phân lập tế bào T Pan (Miltenyi Biotec #130-091-156), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại, các viên tròn tế bào được pha loãng trong 40 µl dịch đệm lạnh cho 10 triệu tế bào (PBS

với 0,5% BSA, 2 mM EDTA, được lọc vô khuẩn) và được ủ với 10 µl hỗn hợp biotin-kháng thể cho 10 triệu tế bào trong 10 phút ở 4°C. Thêm vào 30 µl dịch đệm lạnh và 20 µl hạt từ tính kháng-biotin cho 10 triệu tế bào, và ủ hỗn hợp thêm 15 phút ở 4°C. Các tế bào được rửa bằng cách thêm vào 10-20x thể tích dịch đệm hiện có và bước ly tâm tiếp theo ở tốc độ 3000 m/s^2 (300 x g) trong 10 phút. Tối đa 100 triệu tế bào được tái tạo huyền phù trong 500 µl dịch đệm. Tách từ tính các tế bào pan T của người chưa được đánh dấu bằng cách sử dụng các cột LS (Miltenyi Biotec #130-042-401) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào T thu được được đếm tự động (ViCell) và bảo quản trong môi trường AIM-V ở 37°C, 5% CO_2 trong tủ ủ cho đến khi bắt đầu thử nghiệm (không quá 24 giờ).

Phân lập các tế bào T nguyên vẹn (naive) sơ cấp của người từ các PBMC

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm tỷ trọng Histopaque từ các chế phẩm lympho bào đã làm giàu (bao phủ buffy) thu được từ ngân hàng máu địa phương hoặc từ máu mới lấy từ người cho khoẻ mạnh. Tiến hành làm giàu tế bào T từ các PBMC bằng cách sử dụng bộ kit phân lập tế bào T CD8$^+$ chưa quen thí nghiệm từ Miltenyi Biotec (#130-093-244), theo hướng dẫn của nhà sản xuất, nhưng bỏ qua bước phân lập cuối cùng các tế bào T CD8$^+$ (xem phần mô tả phân lập các tế bào T pan sơ cấp của người).

Phân lập các tế bào pan-T của chuột từ các tế bào lá lách

Phân lập các lá lách từ chuột C57BL/6, chuyển vào ống-C GentleMACS C (Miltenyi Biotech #130-093-237) có chứa đệm MACS (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA) và phân ly bằng GentleMACS Dissociator để thu được huyền phù tế bào đơn nhất theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Huyền phù tế bào được cho qua lọc tách sơ bộ để loại bỏ các tiểu phân mô chưa phân ly còn lại. Sau khi ly tâm ở tốc độ 4000 m/s^2 (400 x g) trong 4 phút ở 4°C, dịch đệm phân giải ACK được thêm vào để phân giải các tế bào hồng cầu (ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng). Rửa các tế bào còn lại bằng dịch đệm MACS hai lần, đếm số lượng, và sử dụng để phân lập các tế bào pan-T của chuột. Tiến hành chọn lọc âm tính (từ tính) bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào Pan-T của Miltenyi Biotec (#130-090-861), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Quần thể tế bào T thu được được đếm tự động (ViCell) và sử dụng ngay cho các thử nghiệm sau đó.

Phân lập các PBMC sơ cấp của khỉ đuôi dài từ máu máu chống đông bằng heparin

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm tỷ trọng từ máu mới lấy từ khỉ đuôi dài khoẻ mạnh cho máu, như sau: Máu chống đông bằng heparin được pha loãng 1:3 bằng PBS vô khuẩn, và môi trường Lymphoprep (Axon Lab #1114545) được pha loãng đến 90% bằng PBS vô khuẩn. Hai thể tích máu đã pha loãng được cho phủ lên trên một thể tích gradien tỷ trọng được pha loãng và phân đoạn PBMC được tách bằng cách ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 5200 m/s^2 (520 x g), không hãm, ở nhiệt độ trong phòng. Dải PBMC được chuyển vào ống nghiệm Falcon 50 ml mới và được rửa bằng PBS vô khuẩn bằng cách ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 4000 m/s^2 (400 x g) ở 4°C. Tiến hành ly tâm một lần tốc độ thấp để loại bỏ tiểu cầu (15 phút ở tốc độ 1500 m/s^2 (150 x g), 4°C), và quần thể PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và sử dụng ngay cho các thử nghiệm sau đó.

Các tế bào đích

Để đánh giá các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép nhằm đích-MCSP, sử dụng các dòng tế bào khối u sau đây: dòng tế bào u melanin của người WM266-4 (ATCC #CRL-1676), thu được từ vị trí di căn u melanin ác tính và biểu hiện các mức cao MCSP của người; dòng tế bào u melanin của người MV-3 (quà tặng từ The Radboud University Nijmegen Medical Centre), biểu hiện mức trung bình của MCSP của người; dòng tế bào u melanin ác tính của người A375 (khối u sơ cấp) (ECACC #88113005) biểu hiện các mức cao của MCSP; dòng tế bào caxinoma ruột kết của người HCT-116 (ATCC #CCL-247) không biểu hiện MCSP; và dòng tế bào ruột kết ung thư tuyến của người Cáp-ca LS180 (ECACC #87021202) không biểu hiện MCSP.

Để đánh giá các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép nhằm đích-CEA, sử dụng các dòng tế bào khối u sau: dòng tế bào ung thư dạ dày của người MKN45 (DSMZ #ACC 409), biểu hiện các mức rất cao CEA của người; dòng tế bào ung thư tuyến tuyến tuỵ của người HPAF-II (quà tặng của Roche Nutley), biểu hiện các mức cao của CEA của người; dòng tế bào ung thư tuyến tuyến tuỵ sơ cấp của người BxPC-3 (ECACC #93120816) biểu hiện mức trung bình của CEA của người; dòng tế bào ung thư tuyến ruột kết của nữ người Cáp-ca LS-174T (ECACC #87060401), biểu hiện mức trung bình CEA của người; dòng tế bào ung thư tuyến tuyến tuỵ của người ASPC-1 (ECACC #96020930) biểu hiện mức thấp của CEA của người; dòng tế bào caxinôma tuyến tuỵ biểu mô của người Panc-1 (ATCC #CRL-1469), biểu hiện các mức thấp (rất thấp) CEA

của người; dòng tế bào caxinoma ruột kết của người HCT-116 (ATCC #CCL-247) không biểu hiện CEA; dòng tế bào biểu mô nền phế nang ung thư tuyến A549-huCEA của người đã được chuyển nhiễm ổn định để biểu hiện CEA của người; và dòng tế bào caxinôma ruột kết của chuột MC38-huCEA, được xử lý để biểu hiện ổn định CEA của người.

Ngoài ra, dòng tế bào ung thư bạch cầu tế bào T của người, Jurkat (ATCC #TIB-152), được sử dụng đánh giá mức gắn kết của các cấu trúc đặc hiệu kép khác nhau với CD3 của người trên các tế bào.

Ví dụ 1

Làm trưởng thành ái lực của kháng thể kháng-MCSP M4-3 / ML2

Tiến hành làm trưởng thành ái lực thông qua quy trình gây đột biến định hướng-oligonucleotit. Cho quy trình này, biến thể chuỗi nặng M4-3, và biến thể chuỗi nhẹ ML2 được tách dòng vào vectơ phagemid, tương tự như các vectơ được Hoogenboom mô tả, (Hoogenboom và các đồng tác giả, Nucleic Acids Res. 1991, 19, 4133–4137). Các gốc ngẫu nhiên được xác định bằng cách trước tiên tạo ra mô hình 3D của kháng thể đó bằng cách tạo mô hình tương đồng cổ điển và sau đó xác định các gốc có thể tiếp cận dung môi của các vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các oligonucleotit chọn ngẫu nhiên dựa trên tổng hợp trinucleotit như thể hiện trong Bảng 1 được mua từ Ella Biotech (Munich, Đức). Tạo ra ba thư viện nhỏ độc lập bằng PCR cổ điển, và bao gồm chọn ngẫu nhiên trong CDR-H1 cùng với CDR-H2, hoặc CDR-L1 cùng với CDR-L2. CDR-L3 được chọn ngẫu nhiên theo cách riêng biệt. Các mảnh ADN của các thư viện đó được tách dòng vào phagemid bằng cách thuỷ phân giới hạn và nối mạch, và tiếp đó đục lỗ bằng điện vào vi khuẩn TG1.

Chọn lọc thư viện

Các biến thể kháng thể được tạo ra nêu trên được biểu hiện theo kiểu đơn giá từ các hạt thể thực khuẩn dạng sợi dưới dạng thể dung hợp với sản phẩm gen III của M13 được bao gói bên trong mỗi hạt. Sau đó, các biến thể được biểu hiện-thể thực khuẩn được sàng lọc về hoạt tính sinh học của chúng (nghĩa là: ái lực gắn kết) và các biến thể ứng cử có một hoặc nhiều hoạt tính được cải thiện, được sử dụng để phát triển tiếp. Các phương

pháp tạo ra các thư viện thể hiện thể thực khuẩn có thể được tìm thấy trong tài liệu: J. Mol. Biol. (2004) 340, 1073–1093, của Lee và các đồng tác giả.

Tiến hành chọn lọc tất cả các thư viện làm trưởng thành ái lực trong dung dịch theo quy trình sau: 1. gắn kết ~ 1012 các hạt phagemid của mỗi thư viện làm trưởng thành ái lực với 100 nM hu-MCSP (miền D3)-avi-his được biotinyl hoá (SEQ ID NO: 118) trong 0,5 giờ trong thể tích tổng cộng 1 ml, 2. bắt giữ hu-MCSP(miền D3)-avi-his được biotinyl hoá và cụ thể là các hạt thể thực khuẩn đã gắn kết bằng cách bổ sung thêm $5,4 \times 10^7$ hạt từ tính được bao phủ bằng- streptavidin trong 10 phút, 3. rửa các hạt bằng cách sử dụng 5-10x 1 ml PBS/Tween-20 và 5-10x 1 ml PBS, 4. rửa giải các hạt thể thực khuẩn bằng cách thêm 1 ml 100 mM TEA (trietylamin) trong 10 phút và trung hoà bằng cách thêm vào 500 µl 1M Tris/HCl pH 7,4 và 5. tái lây nhiễm vi khuẩn E. coli TG1 đang sinh trưởng theo số mũ, lây nhiễm thể thực khuẩn VCSM13 hỗ trợ và tiếp đó kết tủa PEG/NaCl các hạt phagemid để sử dụng trong các vòng chọn lọc tiếp theo. Tiến hành chọn lọc từ 3 đến 5 vòng bằng cách sử dụng nồng độ kháng nguyên hằng định hoặc giảm dần (từ 10^{-7} M đến 2×10^{-9} M). Trong vòng 2, tiến hành bắt giữ các phức hợp kháng nguyên-thể thực khuẩn bằng cách sử dụng các đĩa neutravidin thay vì các hạt streptavidin. Xác định các chất gắn kết đặc hiện bằng ELISA như sau: 100 µl 10 nM hu-MCSP(miền D3)-avi-his được biotinyl hoá /giếng được phủ trên các đĩa neutravidin. Các dịch nổi vi khuẩn có chứa-Fab được thêm vào và phát hiện các Fab gắn kết qua nhãn-Flag bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng-Flag/HRP. Các dòng dương tính-ELISA được biểu hiện qua vi khuẩn dưới dạng các mảnh Fab hoà tan theo kiểu 96-giếng và dịch nổi được thử nghiệm sàng lọc động học bằng cách phân tích SPR sử dụng ProteOn XPR36 (BioRad). Các dòng tế bào biểu hiện Fab với hằng số ái lực cao nhất được xác định và xác định trình tự các phagemid tương ứng.

Bảng 1 (luôn luôn loại trừ Cys và Met. Lys được loại trừ trong các trường hợp oligonucleotit là đoạn mồi ngược)

Vị trí	**Chọn ngẫu nhiên**
Chuỗi nặng	
CDR1	

Ser31	S (40%), còn lại (60%, 4% mỗi axit amin)
Gly32	G (40%), còn lại (60%, 4% mỗi axit amin),
Tyr33	Y (40%), còn lại (60%, 4% mỗi axit amin)
Tyr34	Y (40%), còn lại (60%, 4% mỗi axit amin)
CDR2	
Tyr50	Y 40%, (F, W, L, A, I, 30%, 6% mỗi axit amin), còn lại (30%, 2,5% mỗi axit amin)
Thr52	T (60%), còn lại (40%, 2,5% mỗi axit amin)
Tyr53	Y (40%), còn lại (60%, 3,8% mỗi axit amin)
Asp54	D (40%), còn lại (60%, 3,8% mỗi axit amin)
Ser56	S (40%), còn lại (60%, 3,8% mỗi axit amin)
Chuỗi nhẹ	
CDR1	
Gln27	Q (40%), (E, D, N, S, T, R, 40%, 6,7% mỗi axit amin), còn lại (tổng cộng 20%, 2,2% mỗi axit amin)
Gly28	G (40%), (N, T, S, Q, Y, D, E, 40%, 5,7% mỗi axit amin), còn lại (20%, 2,5% mỗi axit amin)
Asn31	N (40%), (S, T, G, Q, Y, D, E, R, 50%, 6,3% mỗi axit amin), còn lại (10%, 1,4% mỗi axit amin)
Tyr32	Y (40%), (W, S, R, 30%, 10% mỗi axit amin), còn lại (30%, 2,3%

	mỗi axit amin)
CDR2	
Tyr50	Y (70%), (E, R, K, A, Q, T, S, D, G, W, F, 30%, 2,7% mỗi axit amin)
Thr51	T (50%), (S, A, G, N, Q, V, 30%, 5% mỗi axit amin), còn lại (20%, 2% mỗi axit amin)
Ser52	S (50%), còn lại (50%, 1% mỗi axit amin)
Ser53	S (40%), (N, T, Q, Y, D, E, I, 40%, 5,7% mỗi axit amin), còn lại (20%, 2,2% mỗi axit amin)
CDR3	
Tyr91	Y (50%), còn lại (50%, 3,1% mỗi axit amin)
Ser92	S (50%), (N, Q, T, A, G 25%, 5% mỗi axit amin), còn lại (25%, 2,3% mỗi axit amin)
Lys93	K (50%), S (5%), T (5%), N (5%), còn lại (35%, 2,7% mỗi axit amin)
Leu94	L (50%), (Y, F, S, I, A, V, 30%, 5% each), còn lại (20%, 2% mỗi axit amin)
Pro95	P (50%), (S, A, 20%, 10% mỗi axit amin), còn lại (30%, 2,1% mỗi axit amin)
Trp96	W 50%, (Y, R, L, 15%, 5% mỗi axit amin), còn lại (35%, 2,5% mỗi axit amin)

Fig. 2 thể hiện sắp thẳng mạch các dòng kháng-MCSP được làm trưởng thành ái lực so với dòng gốc chưa trưởng thành (M4-3 ML2). Tiến hành chọn ngẫu nhiên chuỗi nặng chỉ ở CDR1 và 2. Tiến hành chọn ngẫu nhiên chuỗi nhẹ ở CDR1 và 2, và một cách độc lập ở CDR3.

Trong quá trình chọn lọc, có một vài đột biến ở các khung như F71Y trong dòng tế bào G3 hoặc Y87H trong dòng tế bào E10.

Sản xuất và tinh chế IgG_1 của người

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các biến thể được làm trưởng thành ái lực được tách dòng phụ trong khung với chuỗi nặng ổn định hoặc chuỗi nhẹ ổn định được cài xen trước vào vectơ biểu hiện động vật có vú tiếp nhận tương ứng. Điều khiển việc biểu hiện kháng thể bằng đoạn khởi đầu MPSV và mang trình tự tín hiệu polyA tổng hợp ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, mỗi vectơ có chứa trình tự EBV OriP.

Sản xuất phân tử này bằng cách đồng-chuyển nhiễm các tế bào HEK293-EBNA với các vectơ biểu hiện động vật có vú bằng cách sử dụng polyetylenimin (PEI). Các tế bào được chuyển nhiễm với các vectơ biểu hiện tương ứng ở tỷ lệ 1:1. Để chuyển nhiễm các tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy ở dạng huyền phù không chứa huyết thanh trong môi trường nuôi cấy CD CHO. Để sản xuất trong bình lắc 500 ml, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được nhân giống 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2 (210 x g), dịch nổi được thay bằng 20 ml môi trường CD CHO đã được ủ ấm trước đó. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20 ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng là 200 µg ADN. Sau khi thêm vào 540 µl dung dịch PEI, hỗn hợp này được tạo xoáy trong 15 giây và sau đó ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào được trộn với ADN/dung dịch PEI, chuyển vào bình lắc 500 ml và ủ trong 3 giờ ở 37°C trong tủ ủ với không khí 5% CO_2. Sau thời gian ủ, thêm vào 160 ml môi trường F17 và các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, thêm vào 1 mM axit valproic và 7% Feed 1 (Lonza). Sau 7 ngày gom dịch nổi nuôi cấy để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100 m/s^2 (210 x g), dung dịch này được lọc vô khuẩn (màng lọc 0,22 µm) và thêm vào natri azit với nồng độ cuối cùng 0,01% trọng lượng/thể tích, và giữ ở 4°C.

Protein đã bài tiết được tinh chế từ các dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực sử dụng Protein A. Dịch nổi được nạp vào cột HP HiTrap Protein A HP (CV=5 mL, GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 40 ml dung dịch natri phosphat 20 mM, natri xitrat 20 mM, natri clorua 0,5 M, pH 7,5. Protein chưa gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa với ít nhất 10 thể tích cột 20 mM natri phosphat, 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 7,5. Protein đích được rửa giải trong gradien hơn 20 thể tích cột từ 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 7,5 đến 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 2,5. Dung dịch protein được trung hoà bằng cách thêm vào 1/10 0,5 M natri phosphat, pH 8. Cô đặc protein đích và lọc trước khi nạp vào cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 20 mM histidin, 140 mM dung dịch natri clorua pH 6,0.

Nồng độ protein của các mẫu protein được tinh chế được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280 nm, bằng cách sử dụng hệ số tắt mol được tính dựa trên trình tự axit amin. Độ tinh khiết và trọng lượng phân tử của các phân tử được phân tích bằng CE-SDS khi có mặt và khi không có mặt chất khử. Hệ Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 2 µg mẫu được sử dụng để phân tích. Hàm lượng kết tụ của các mẫu kháng thể được phân tích bằng cách sử dụng cột phân tích loại trừ theo kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) trong 25 mM K_2HPO_4, 125 mM NaCl, 200 mM L-arginin monohydroclorua, 0,02 % (trọng lượng/thể tích) NaN_3, pH 6,7 dịch đệm chạy ở 25°C.

Bảng 2. Sản xuất và tinh chế các IgG kháng-MCSP đã làm trưởng thành ái lực

Cấu trúc	Hiệu suất [mg/l]	Phân tử lượng cao [%]	Phân tử lượng thấp [%]	Monome [%]
M4-3(C1) ML2(G3)	43,9	0	0	100
M4-3(C1) ML2(E10)	59,5	0	0	100
M4-3(C1) ML2(C5)	68,9	0	0,8	99,2

Xác định ái lực

Phân tích ProteOn

K_D được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng máy ProteOn XPR36 (BioRad) ở 25°C với kháng thể bắt giữ đặc hiệu mảnh F(ab')2 kháng người (Jackson ImmunoResearch #109-005-006) được làm bất động bằng cách ngẫu hợp amin trên các chíp CM5 và sau đó bắt giữ Fab từ dịch nổi vi khuẩn hoặc từ chế phẩm Fab đã tinh chế. Tóm lại, các chíp cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hoá (CM5, GE Healthcare) được hoạt hoá bằng N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorua (EDC) và N-hydroxysucxinimit (NHS) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng thể bắt giữ đặc hiệu mảnh F(ab')2 kháng người được pha loãng bằng 10 mM natri axetat, pH 5,0 ở 50 µg/ml trước khi tiêm ở tốc độ chảy 10 µl/phút để đạt được khoảng tối đa 10.000 đơn vị đáp ứng (RU) của kháng thể bắt giữ đã ngẫu hợp. Sau khi tiêm kháng thể bắt giữ, tiêm 1 M etanolamin để phong bế nhóm chưa phản ứng. Để xác định động học, các Fab từ dịch nổi vi khuẩn hoặc các Fab đã tinh chế được tiêm ở tốc độ chảy 10 µl/phút trong 300 giây và để phân ly 300 giây để làm ổn định mức đường nền bắt giữ. Nồng độ bắt giữ nằm trong khoảng 100-500 RU. Trong bước tiếp theo, chất phân tích MCSP(miền D3)-avi-his của người được tiêm với nồng độ duy nhất hoặc với loạt nồng độ theo bậc (tuỳ thuộc vào ái lực dòng tế bào trong khoảng từ 100 nM đến 250 pM) được pha loãng trong HBS-EP+ (GE Healthcare, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20, pH 7,4) ở 25°C ở tốc độ chảy 50 µl/phút. Bề mặt chíp cảm biến được tái tạo bằng cách tiêm glyxin pH 1,5 trong 30 giây ở 90 µl/phút tiếp đó là tiêm NaOH trong 20 giây ở cùng tốc độ chảy này. Tính toán tốc độ kết hợp (k_{on}) và phân ly (k_{off}) bằng cách sử dụng mô hình gắn kết một-với-một Langmuir (phần mềm đánh giá ProteOn XPR36 hoặc phần mềm Scrubber (BioLogic)) bằng cách đồng thời khớp số liệu các đồ thị cảm biến kết hợp và phân ly. Tính hằng số phân ly (K_D) theo tỷ lệ k_{off}/k_{on}. Sử dụng số liệu này để xác định ái lực gắn kết của các biến thể được làm trưởng thành ái lực để so sánh với kháng thể gốc. Bảng 3a thể hiện các số liệu được tạo ra từ các thử nghiệm này.

G3, E10, C5 đối với chuỗi nhẹ, và D6, A7, B7, B8, C1 đối với chuỗi nặng được chọn để chuyển đổi thành kiểu IgG_1 của người. Do CDR1 và 2 của chuỗi nhẹ được chọn ngẫu nhiên độc lập với CDR3, các CDR thu được được kết hợp trong quá trình chuyển đổi IgG.

Theo kiểu IgG xác định lại các ái lực đối với kháng nguyên MCSP của người (SEQ ID NO: 118), ngoài ái lực đối với thể tương đồng của khỉ đuôi dài (SEQ ID NO: 117).

Phương pháp này được sử dụng chính xác như được mô tả đối với các mảnh Fab, sử dụng IgG được tinh chế từ quá trình sản xuất ở động vật có vú.

Bảng 3a. Các dòng tế bào được làm trưởng thành ái lực MCSP: số liệu Proteon

Biến thể	MCSP của người Fab K_D	MCSP của người IgG K_D	MCSP của khỉ IgG K_D	MCSP của người IgG K_D	MCSP của khỉ IgG K_D
	Số liệu ái lực theo Proteon			Ái lực gắn kết so sánh – so với kháng thể gốc (lần)	
M4-3/ML2 gốc	$5*10^{-9}$	$2*10^{-9}$	$2*10^{-9}$		
M4-3/ML2(G3)	$4*10^{-10}$	$3*10^{-10}$	$6*10^{-10}$	6,7	3,3
M4-3/ML2(E10)	$7*10^{-10}$	$1*10^{-9}$	$2*10^{-9}$	2,0	1,0
M4-3/ML2(E10/G3)		$4*10^{-10}$	$9*10^{-10}$	5,0	2,2
M4-3/ML2(C5)	$7*10^{-10}$	$4*10^{-10}$	$1*10^{-9}$	5,0	2,0
M4-3/ML2(C5/G3)		$7*10^{-10}$	$1*10^{-9}$	2,9	2,0

M4-3(D6)/ML2	$2*10^{-9}$	$4*10^{-10}$	$1*10^{-9}$	5,0	2,0
M4-3(A7)/ML2	$2*10^{-11}$	$8*10^{-10}$	$1*10^{-9}$	2,5	2,0
M4-3(B7)/ML2		$5*10^{-10}$	$7*10^{-10}$	4,0	2,9
M4-3(B8)/ML2	$3*10^{-10}$	$9*10^{-10}$	$1*10^{-9}$	2,2	2,0
M4-3(C1)/ML2	$6*10^{-10}$	$9*10^{-10}$	$8*10^{-10}$	2,2	2,5
M4-3(C1)/ML2(G3)		$7*10^{-11}$	$2*10^{-10}$	28,6	10,0
M4-3(C1)/ML2(E10)		$5*10^{-10}$	$6*10^{-10}$	4,0	3,3
M4-3(A7)/ML2(G3)		$7*10^{-11}$	$2*10^{-10}$	28,6	10,0
M4-3(A7)/ML2(E10)		$3*10^{-10}$	$7*10^{-10}$	6,7	2,9
M4-3(C1)/ML2(C5)		$2*10^{-10}$	$3*10^{-10}$	10,0	6,7
M4-3(A7)/ML2(C5)		$7*10^{-11}$	$2*10^{-10}$	28,6	10,0

Xác định ái lực bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng Biacore T200

Tiến hành các thí nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) để xác định ái lực và tính phàm của các IgG được làm trưởng thành ái lực trên Biacore T200 ở 25°C với HBS-EP làm dịch đệm chạy (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% Chất hoạt động bề mặt P20, Biacore, Freiburg/Đức).

Để phân tích tính phàm của tương tác của các IgG kháng-MCSP khác nhau đối với D3 MCSP của người và khỉ đuôi dài ngẫu hợp trực tiếp khoảng 9.500 đơn vị cộng hưởng (RU) của kháng thể His kháng-Penta (Qiagen) được tiến hành trên chíp CM5 ở pH 5,0 sử dụng bộ kit ngẫu hợp amin chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). Các kháng nguyên được bắt giữ trong 60 giây ở 30 nM với 10 µl/phút. Các IgG được cho chảy qua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,0064 đến 100 nM với tốc độ chảy 30 µl/phút qua các mao quản 'flow cell' trong 280 giây. Quá trình phân ly được theo dõi trong 180 giây. Hiệu chỉnh sự khác biệt chỉ số khúc xạ bằng cách trừ đi mức đáp ứng thu được trên mao quản 'flow cell' tham chiếu. Trong trường hợp, các IgG được chảy qua bề mặt với kháng thể His kháng-Penta được làm bất động, nhưng trên đó đã tiêm HBS-EP thay vì D3 MCSP của người hoặc khỉ đuôi dài.

Để xác định ái lực, bắt giữ các IgG trên bề mặt chíp cảm biến CM5 với Fc kháng người được làm bất động. IgG bắt giữ được ngẫu hợp với bề mặt chíp cảm biến bằng cách làm bất động trực tiếp khoảng 9.500 đơn vị cộng hưởng (RU) ở pH 5,0 bằng cách sử dụng bột kit ngẫu hợp amin chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). Các IgG được bắt giữ trong 25 giây ở 10 nM với tốc độ 30 µl/phút. D3 MCSP của người và khỉ đuôi dài được cho chảy qua với nồng độ nằm trong khoảng từ 2 đến 500 nM với tốc độ chảy 30 µl/phút qua các mao quản 'flow cell' trong 120 giây. Theo dõi quá trình phân ly trong 60 giây. Quá trình kết hợp và phân ly đối với nồng độ 166 và 500 nM lần lượt được theo dõi trong 1200 giây và 600 giây. Hiệu chỉnh các khác biệt về chỉ số khúc xạ thô bằng cách trừ đi mức đáp ứng thu được trên mao quản 'flow cell' tham chiếu. Trong trường hợp này, các kháng nguyên được cho chảy qua bề mặt với kháng thể Fc kháng-người được làm bất động nhưng trên đó đã tiêm HBS-EP thay vì các IgG kháng-MCSP.

Thu được các hằng số động học bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Thuỵ điển), để khớp số liệu các phương trình tốc độ đối với gắn kết Langmuir 1:1 bằng cách lấy tích phân số liệu.

Ái lực cao hơn đối với D3 MCSP của người và khỉ đuôi dài được khẳng định bằng các chỉ số đo cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng Biacore T200. Ngoài ra, chỉ số đo tính phàm thể hiện tăng gấp đến 3-lần mức gắn kết hoá trị hai (Bảng 3b).

Bảng 3b. Ái lực và tính phàm của các IgG kháng MCSP đối với D3 MCSP của người và D3 MCSP khỉ đuôi dài.

K_D theo nM T = 25°C	D3 MCSP của người		D3 MCSP của khỉ đuôi dài	
	Ái lực	Tính phàm	Ái lực	Tính phàm
M4-3(C1) ML2(G3)	1,8	0,0045	1,4	0,0038
M4-3(C1) ML2(E10)	4,6	0,0063	3,8	0,0044
M4-3(C1) ML2(C5)	1,8	0,0046	1,3	0,0044
M4-3 ML2 (gốc)	8,6	0,0090	11,4	0,0123

Ví dụ 2

Điều chế TCB MCSP (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo) có chứa M4-3(C1) ML2(G3) làm kháng thể kháng MCSP và CH2527 được làm tương thích với người làm kháng thể kháng CD3

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tách dòng phụ trong khung với chuỗi nặng ổn định hoặc chuỗi nhẹ ổn định được cài xen trước vào vectơ biểu hiện động vật có vú tiếp nhận tương ứng. Quá trình biểu hiện kháng thể được điều khiển bởi đoạn khởi đầu MPSV và mang trình tự tín hiệu polyA tổng hợp ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, mỗi vectơ có chứa trình tự EBV OriP.

Phân tử này được sản sinh bởi các tế bào HEK293-EBNA đồng chuyển nhiễm với các vectơ biểu hiện động vật có vú sử dụng polyetylenimin (PEI). Các tế bào được chuyển nhiễm với các vectơ biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:2:1:1 ("vectơ chuỗi nặng Fc(lỗ)": "vectơ chuỗi nhẹ": "vectơ chuỗi nhẹ Crossfab": "vectơ chuỗi nặng Fc(nốt phồng)-FabCrossfab").

Để chuyển nhiễm các tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy ở dạng huyền phù không chứa huyết thanh trong môi trường nuôi cấy CD CHO. Để sản xuất trong bình phản ứng lắc 500 ml 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được gây giống 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2 (210 x g), dịch nổi được thay bằng 20 ml môi trường CD CHO đã được ủ ấm trước đó. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20 ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng là 200 µg ADN. Sau khi thêm vào 540 µl dung dịch PEI hỗn hợp được tạo xoáy trong 15 giây và sau đó ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào được trộn với ADN/dung dịch PEI, chuyển vào bình lắc 500 ml và ủ trong 3 giờ ở 37°C trong tủ ủ với không khí 5% CO_2. Sau thời gian ủ, thêm vào 160 ml môi trường F17 và tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm 1 mM axit valproic và 7% Feed 1 (Lonza) được thêm vào. Sau 7 ngày gom dịch nổi nuôi cấy để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100 m/s^2 (210 x g), dung dịch này được lọc vô khuẩn (màng lọc 0,22 µm) và natri azit với nồng độ cuối cùng 0,01% trọng lượng/thể tích được thêm vào, và giữ ở 4°C.

Protein đã bài tiết được tinh chế từ các dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực sử dụng Protein A. Dịch nổi được nạp vào cột HiTrap Protein A HP (CV=5 mL, GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 40 ml 20 mM natri phosphat, 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 7,5. Protein chưa gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa với ít nhất 10 thể tích cột 20 mM natri phosphat, 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 7,5. Protein đích được rửa giải trong gradien hơn 20 thể tích cột từ 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 7,5 to 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 2,5. Dung dịch protein được trung hoà bằng cách thêm vào 1/10 natri phosphat 0,5 M, pH 8. Cô đặc protein đích và lọc trước khi nạp vào cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 20 mM histidin, 140 mM dung dịch natri clorua pH 6,0.

Nồng độ protein các mẫu protein đã tinh chế được xác định bằng cách xác định mật độ quang (OD) ở 280 nm, bằng cách sử dụng hệ số tắt mol được tính dựa trên trình tự axit amin.

Độ tinh khiết và trọng lượng phân tử của phân tử được phân tích bằng CE-SDS khi có mặt và khi không có mặt chất khử. Hệ thống Caliper (Caliper lifescience) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 2 µg mẫu được sử dụng để phân tích.

Hàm lượng kết tụ của các mẫu kháng thể được phân tích bằng cách sử dụng cột phân tích loại trừ theo kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) trong 25 mM K_2HPO_4, 125 mM NaCl, 200 mM L-arginin monohydroclorua, 0,02% (trọng lượng/thể tích) NaN_3, pH 6,7 dịch đệm chạy ở 25°C.

Bảng 4a. Tóm tắt về sản xuất và tinh chế TCB MCSP

Cấu trúc	Hiệu giá [mg/l]	Hiệu suất [mg/l]	Kết tu sau bước tinh chế thứ nhất [%]	Phân tử lượng cao [%]	Phân tử lượng thấp [%]	Monome [%]
MCSP TCB	157	0,32	32	3,3	0	96,7

Fig. 3 thể hiện hình vẽ giản lược của phân tử MCSP TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo).

Fig. 4 và Bảng 4b thể hiện phân tích CE-SDS của phân tử MCSP TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo) (các SEQ ID NO: 12, 53, 54 và 55).

Bảng 4b. Phân tích CE-SDS của MCSP TCB

	Pic	kDa	Mạch tương ứng
MCSP TCB không khử (A)	1	206,47	
MCSP TCB có khử (B)	1	29,15	Chuỗi nhẹ ML2 (C1)
	2	37,39	Chuỗi nhẹ huCH2527
	3	66,07	Fc(lỗ)
	4	94,52	Fc(nốt phồng)

Ví dụ 3

Điều chế CEA TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo) có chứa CH1A1A 98/99 2F1 làm kháng thể kháng CEA và CH2527 được làm tương thích với người làm kháng thể kháng CD3

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tách dòng phụ trong khung với chuỗi nặng ổn định hoặc chuỗi nhẹ ổn định được cài xen trước vào vectơ biểu hiện động vật có vú tiếp nhận tương ứng. Quá trình biểu hiện kháng thể được điều khiển bởi đoạn khởi đầu MPSV và mang trình tự tín hiệu polyA tổng hợp ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, mỗi vectơ có chứa trình tự EBV OriP.

Phân tử được sản sinh bởi các tế bào HEK293 EBNA đồng chuyển nhiễm với các vectơ biểu hiện động vật có vú sử dụng polyetylenimin (PEI). Các tế bào được chuyển nhiễm với các vectơ biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:2:1:1 ("vectơ chuỗi nặng Fc(lỗ)": "vectơ chuỗi nhẹ": "vectơ chuỗi nhẹ Crossfab": "vectơ chuỗi nặng Fc(nốt phồng)-FabCrossfab").

Để chuyển nhiễm các tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy ở dạng huyền phù không chứa huyết thanh trong môi trường nuôi cấy CD CHO. Để sản xuất trong bình phản ứng lắc 500 ml 400 triệu HEK293 EBNA các tế bào được gây giống 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2 (210 x g), dịch nổi được thay bằng 20 ml môi trường CD CHO đã được ủ ấm trước đó. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20 ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng là 200 µg ADN. Sau khi thêm vào 540 µl dung dịch PEI hỗn hợp được tạo xoáy trong 15 giây và sau đó ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào được trộn với ADN/dung dịch PEI, chuyển vào bình lắc 500 ml và ủ ấm trong 3 giờ ở 37°C trong tủ ủ với không khí 5% CO_2. Sau thời gian ủ, thêm vào 160 ml môi trường F17 và tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm 1 mM axit valproic và 7% Feed 1 (Lonza) được thêm vào. Sau 7 ngày, gom dịch nổi nuôi cấy để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100 m/s^2 (210 x g), dung dịch này được lọc vô khuẩn (màng lọc 0,22 µm) và natri azit với nồng độ cuối cùng 0,01% trọng lượng/thể tích được thêm vào, và giữ ở 4°C.

Protein đã bài tiết được tinh chế từ các dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực sử dụng Protein A. Dịch nổi được nạp vào cột HiTrap Protein A HP (CV=5 mL, GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 40 ml 20 mM natri phosphat, 20 mM natri xitrat, 0,5

M natri clorua, pH 7,5. Protein chưa gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa với ít nhất 10 thể tích cột 20 mM natri phosphat, 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 7,5. Protein đích được rửa giải trong gradien hơn 20 thể tích cột từ 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 7,5 đến 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 2,5. Dung dịch protein được trung hoà bằng cách thêm vào 1/10 natri phosphat 0,5 M, pH 8. Cô đặc protein đích và lọc trước khi nạp vào cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 20 mM histidin, 140 mM dung dịch natri clorua pH 6,0.

Nồng độ protein các mẫu protein được tinh chế được xác định bằng cách xác định mật độ quang (OD) ở 280 nm, bằng cách sử dụng hệ số tắt mol được tính dựa trên trình tự axit amin.

Độ tinh khiết và trọng lượng phân tử của phân tử được phân tích bằng CE-SDS khi có mặt và khi không có mặt chất khử. Hệ thống Caliper (Caliper lifescience) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 2 µg mẫu được sử dụng để phân tích.

Hàm lượng kết tụ của các mẫu kháng thể được phân tích bằng cách sử dụng cột phân tích loại trừ theo kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) trong 25 mM K_2HPO_4, 125 mM NaCl, 200 mM L-arginin monohydroclorua, 0,02% (trọng lượng/thể tích) NaN_3, pH 6,7 dịch đệm chạy ở 25°C.

Bảng 5. Tóm tắt về sản xuất và tinh chế CEA TCB

Cấu trúc	Hiệu giá [mg/l]	Hiệu suất [mg/l]	Kết tụ sau bước tinh chế thứ nhất [%]	Phân tử lượng cao [%]	Phân tử lượng thấp [%]	Monome [%]
CEA TCB	66	0,31	21,5	8,1	4,4	87,5

Fig. 5 thể hiện hình vẽ giản lược của phân tử CEA TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo).

Fig. 6 và Bảng 6 thể hiện phân tích CE-SDS của phân tử CEA TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo) (các SEQ ID NO: 22, 56, 57 và 58).

Bảng 6. Phân tích CE-SDS của CEA TCB

	Pic	kDa	Mạch tương ứng
CEA TCB không khử (A)	1	205,67	Phân tử chính xác
CEA TCB có khử (B)	1	28,23	Chuỗi nhẹ CH1A1A 98/99 x 2F1
	2	36,31	Chuỗi nhẹ CH2527
	3	63,48	Fc(lỗ)
	4	90,9	Fc(nốt phồng)

Theo phương pháp tinh chế khác, CEA TCB được bắt giữ từ dịch nổi lên men được gom lại và làm trong bằng ái lực sắc ký Protein A (MabSelect SuRe). Dịch rửa giải Protein A tiếp đó được chạy sắc ký trao đổi cation (Poros 50 HS) và phân đoạn và phân tích sau đó bằng SE-HPLC và điện di mao quản. Các phân đoạn có chứa sản phẩm được gộp lại và chạy sắc ký tương tác kỵ nước (Butyl-Sepharose 4FF) ở nhiệt độ trong phòng theo cách gắn kết-rửa giải. Dịch rửa giải thu được tiếp đó được phân loại và phân tích bằng SE-HPLC và điện di mao quản. Các phân đoạn có chứa sản phẩm được gộp lại và sắc ký trao đổi anion (Q-Sepharose FF) theo phương thức chảy qua. Chất thu được sử dụng phương pháp tinh chế này có hàm lượng monome >98%.

Ví dụ 4

Gắn kết MCSP TCB với các tế bào biểu hiện-MCSP và CD3

Gắn kết MCSP TCB được thử nghiệm trên dòng tế bào u melanin ác tính của người biểu hiện-MCSP (A375) và dòng tế bào lympho T được làm bất tử biểu hiện-CD3 (Jurkat). Tóm lại, các tế bào được thu gom, đếm số lượng, kiểm tra khả năng sống còn và được tái tạo huyền phù ở 2 x 10^6 tế bào/ml trong dịch đệm FACS (100 µl PBS 0,1% BSA). 100 µl huyền phù tế bào (có chứa 0,2 x 10^6 tế bào) được ủ ấm trong đĩa 96-giếng đáy-tròn trong 30 phút ở 4°C với nồng độ tăng dần của MCSP TCB (2,6 pM-200 nM), được rửa hai lần bằng PBS lạnh 0,1% BSA, được ủ lại thêm 30 phút ở 4°C với kháng thể

thứ cấp đặc hiệu mảnh Fcγ của IgG ở dê kháng người mảnh AffiniPure F(ab')2 được tiếp hợp-PE (Jackson Immuno Research Lab PE #109-116-170), được rửa hai lần bằng PBS 0,1% BSA lạnh và phân tích ngay bằng FACS sử dụng FACS CantoII (Software FACS Diva) bằng các tế bào âm tính-DAPI sống. Thu được đường cong gắn kết bằng cách sử dụng GraphPadPrism5 (Fig. 7A, gắn kết với các tế bào A375, EC_{50} = 3381 pM; Fig. 7B, gắn kết với các tế bào Jurkat).

Ví dụ 5

Giết tế bào T được gây cảm ứng bởi kháng thể MCSP TCB

Giết tế bào T qua trung gian kháng thể MCSP TCB được đánh giá sử dụng panen các dòng tế bào khối u biểu hiện các nồng độ khác nhau của MCSP (A375 = MCSP mức cao, MV-3 = MSCP mức trung bình, HCT-116 = MCSP mức thấp, LS180 = MCSP âm tính). Tóm lại, các tế bào đích được thu gom với Trypsin/EDTA, rửa, và dàn mỏng ở mật độ 25 000 tế bào/giếng sử dụng các đĩa 96-giếng đáy phẳng. Các tế bào để để bám dính qua đêm. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm tỷ trọng Histopaque các chế phẩm lympho bào đã làm giàu (bao phủ buffy) thu được từ người cho khoẻ mạnh. Máu mới pha loãng bằng PBS vô khuẩn và được phủ lên trên gradien Histopaque (Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (tốc độ 4500 m/s^2 (450 x g), 30 phút, nhiệt độ trong phòng), phần huyết tương bên trên đoạn phân pha có chứa-PBMC được bỏ đi và các PBMC được chuyển vào ống nghiệm Falcon mới tiếp đó được cho thêm 50 ml PBS. Ly tâm hỗn hợp (tốc độ 4000 m/s^2 (400 x g), 10 phút, nhiệt độ trong phòng), dịch nổi được bỏ đi và viên tròn PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô khuẩn (các bước ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2 (350 x g), 10 phút). Quần thể PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và bảo quản trong môi trường RPMI1640 có chứa 10% FCS và 1% L-alanyl-L-glutamin (Biochrom, K0302) ở 37°C, 5% CO_2 trong tủ ủ tế bào cho đến khi sử dụng tiếp (không quá 24 giờ). Đối với thử nghiệm giết tế bào này, kháng thể được thêm vào ở các nồng độ được chỉ định (khoảng từ 1 pM đến 10 nM, lặp lại 3 lần). Các PBMC được thêm vào các tế bào đích ở tỷ lệ cuối cùng giữa tế bào hiệu ứng so với tế bào đích (E:T) là 10:1. Giết tế bào đích được đánh giá sau 24 giờ ủ ở 37°C, 5% CO_2 bằng cách định lượng LDH được giải phóng vào các dịch nổi tế bào bằng các tế bào chết theo chương trình/hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Phân giải tối đa các tế bào đích (= 100%) đạt được bằng cách ủ các tế bào đích với 1%

Triton X-100. Phân giải tối thiểu (= 0%) chỉ các tế bào đích được ủ đồng thời với các tế bào hiệu ứng mà không có cấu trúc đặc hiệu kép. Kết quả cho thấy là MCSP TCB gây cảm ứng giết đặc hiệu-tế bào đích và mạnh các dòng tế bào đích dương tính-MCSP mà không giết các dòng tế bào âm tính-MCSP (Fig. 8, A-D). Các giá trị EC_{50} liên quan đến các thử nghiệm giết tế bào, được tính toán bằng cách sử dụng GraphPadPrism5 được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Các giá trị EC_{50} (pM) để giết qua trung gian tế bào T các tế bào khối u biểu hiện-MCSP được gây cảm ứng bởi kháng thể MCSP TCB.

Dòng tế bào	**Số bản sao thụ thể MCSP**	**EC_{50} [pM]**
A375	387 058	12,3
MV-3	260 000	9,4
HCT-116	36770	3,7
LS180	Âm tính	Không xác định

Ví dụ 6

Điều tiết tăng CD25 và CD69 trên các tế bào hiệu ứng $CD8^+$ và $CD4^+$ sau khi giết bởi tế bào T các tế bào khối u biểu hiện-MCSP được gây cảm ứng bởi kháng thể MCSP TCB

Hoạt hoá các tế bào T $CD8^+$ và $CD4^+$ sau khi giết bởi tế bào T các tế bào khối u MV-3 biểu hiện-MCSP qua trung gian kháng thể MCSP TCB được đánh giá bằng cách phân tích FACS sử dụng các kháng thể nhận biết các chất đánh dấu hoạt hoá tế bào T CD25 (chất đánh dấu hoạt hoá muộn) và CD69 (chất đánh dấu hoạt hoá sớm). Kháng thể và các điều kiện thử nghiệm giết tế bào này về cơ bản như nêu trên (Ví dụ 5), sử dụng cùng khoảng nồng độ kháng thể (từ 1 pM đến 10 nM, lặp lại 3 lần), tỷ lệ E:T là 10:1 và thời gian ủ 24 giờ.

Sau khi ủ, các PBMC được chuyển vào đĩa 96 giếng đáy tròn, được ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2 (350 x g) trong 5 phút và được rửa hai lần bằng PBS có chứa 0,1% BSA. Nhuộm màu bề mặt đối với CD8 (CD8 kháng người FITC, BD # 555634), CD4 (CD4 kháng người PECy7, BD # 557852), CD69 (CD69 kháng người PE, Biolegend #310906) và CD25 (CD25 kháng người APC, BD #555434) được tiến hành theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào được rửa hai lần bằng 150 µl/giếng PBS có chứa 0,1% BSA và cố định trong 15 phút ở 4°C sử dụng 100 µl/giếng dịch đệm cố định (BD #554655). Sau khi

ly tâm, các mẫu được tái tạo huyền phù trong 200 µl/giếng PBS 0,1% BSA có chứa DAPI để loại trừ các tế bào đã chết để xác định FACS. Các mẫu được phân tích trên BD FACS Fortessa. Kết quả cho thấy là MCSP TCB gây cảm ứng điều hoà tăng chất đánh dấu hoạt hoá đặc hiệu đích và mạnh (CD25, CD69) trên các tế bào T $CD8^+$ (Fig. 9 A, B) và các tế bào T $CD4^+$ (Fig. 9 C, D) sau khi giết.

Ví dụ 7

Bài tiết xytokin bởi các tế bào hiệu ứng của người sau khi giết bởi tế bào T các tế bào khối u biểu hiện-MCSP được gây cảm ứng bởi kháng thể MCSP TCB

Bài tiết xytokin bởi các PBMC của người sau khi giết bởi tế bào T các tế bào khối u MV-3 biểu hiện-MCSP được gây cảm ứng bởi kháng thể MCSP TCB được đánh giá bằng cách phân tích FACS các dịch nổi tế bào sau thử nghiệm giết tế bào.

Cùng kháng thể này được sử dụng và tiến hành thử nghiệm giết như nêu trên (Ví dụ 5 và 6), sử dụng tỷ lệ E:T là 10:1 và thời gian ủ 24 giờ.

Khi kết thúc thời gian ủ, đĩa được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 3500 m/s^2 (350 x g), dịch nổi được chuyển vào đĩa 96-giếng mới và được bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích tiếp. Phát hiện Granzyme B, TNFα, IFN-γ, IL-2, IL-4 và IL-10 được bài tiết vào các dịch nổi tế bào sử dụng bộ protein Flex hoà tan của người BD CBA, theo hướng dẫn của nhà sản xuất trên FACS CantoII. Sử dụng các bộ kit sau đây: Bộ Flex Granzyme B của người BD CBA #BD 560304; Bộ Flex TNF của người BD CBA #BD 558273; Bộ Flex IFN-γ của người BD CBA #BD 558269; Bộ Flex IL-2 của người BD CBA #BD 558270; Bộ Flex IL-4 của người BD CBA #BD 558272; Bộ Flex IL-10 của người BD CBA #BD 558274.

Kết quả cho thấy là MCSP TCB gây cảm ứng bài tiết IL-2, IFN-γ, TNFα, Granzyme B và IL-10 (mà không phải là IL-4) trong quá trình giết tế bào (Fig. 10, A-F).

Tóm lại, các ví dụ này cho thấy kháng thể đặc hiệu kép MCSP CD3:

- Gắn kết tốt với các tế bào A375 dương tính-MCSP
- Gây cảm ứng giết đặc hiệu-tế bào đích và mạnh các dòng tế bào đích dương tính-MCSP, và không giết các dòng tế bào âm tính-MCSP

- Gây cảm ứng điều hoà tăng chất đánh dấu hoạt hoá (CD25, CD69) đặc hiệu đích và mạnh trên các tế bào T $CD8^+$ và $CD4^+$ sau khi giết
- Gây cảm ứng bài tiết IL-2, IFN-γ, TNFα, Granzyme B và IL-10 (không phải là IL-4) trong quá trình giết.

Ví dụ 8

Gắn kết CEA TCB với các tế bào biểu hiện-CEA và -CD3

Gắn kết CEA TCB được thử nghiệm trên các tế bào ung thư tuyến phổi biểu hiện-CEA được chuyển nhiễm (A549-huCEA) và các dòng lympho bào T của khỉ đuôi dài và người được làm bất tử biểu hiện-CD3 (tương ứng là Jurkat và HSC-F). TCB không được nhắm đích (các SEQ ID NO: 59, 60, 61 và 62; xem ví dụ 24) được sử dụng làm đối chứng. Tóm lại, các tế bào được thu gom, đếm số lượng, kiểm tra khả năng sống còn và được tái tạo huyền phù ở 2 x 10^6 tế bào/ml trong dịch đệm FACS (100 µl PBS 0.1% BSA). 100 µl huyền phù tế bào (có chứa 0,2 x 10^6 tế bào) được ủ ấm trong đĩa 96-giếng đáy-tròn trong 30 phút ở 4°C với nồng độ tăng dần của CEA TCB (từ 61 pM đến 1000 nM), được rửa hai lần bằng PBS 0,1% BSA lạnh, được ủ lại thêm 30 phút ở 4°C với kháng thể thứ cấp đặc hiệu mảnh F(ab')2 của IgG ở dê kháng người Mảnh F(ab')2 AffiniPure được tiếp hợp-FITC (Jackson Immuno Research Lab FITC #109-096-097), được rửa hai lần bằng PBS 0,1% BSA lạnh và phân tích ngay bằng FACS sử dụng FACS CantoII hoặc Fortessa (Software FACS Diva) bằng cách tạo cổng đóng mở các tế bào âm tính-PI, sống. Thu được các đường cong gắn kết sử dụng GraphPadPrism5 (Fig. 11A, gắn kết với các tế bào A549 (EC_{50} 6,6 nM); Fig. 11B, gắn kết với tế bào Jurkat; Fig. 11C, gắn kết với các tế bào HSC-F).

Ví dụ 9

Giết qua trung gian-tế bào T các tế bào đích khối u biểu hiện-CEA được gây cảm ứng bởi kháng thể CEA TCB

Giết qua trung gian-tế bào T các tế bào đích được gây cảm ứng bởi kháng thể CEA TCB được đánh giá trên các tế bào khối u của người HPAFII (CEA mức cao), BxPC-3 (CEA mức trung bình) và ASPC-1 (CEA mức thấp). HCT-116 (dòng tế bào khối u âm tính CEA) và TCB không được nhắm đích được sử dụng làm các đối chứng âm tính. Các PBMC của người được sử dụng làm các tế bào hiệu ứng và phát hiện giết tế bào 24

giờ và 48 giờ sau khi ủ với kháng thể đặc hiệu kép. Tóm lại, các tế bào đích được thu gom với Trypsin/EDTA, rửa, và dàn mỏng ở mật độ 25 000 tế bào/giếng sử dụng các đĩa 96-giếng đáy phẳng. Các tế bào được để bám dính qua đêm. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm tỷ trọng Histopaque các chế phẩm lympho bào đã làm giàu (bao phủ buffy) thu được từ người cho khoẻ mạnh. Máu mới pha loãng bằng PBS vô khuẩn và được phủ lên trên Građien Histopaque (Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (ở tốc độ 4500 m/s^2 (450 x g), 30 phút, nhiệt độ trong phòng), phần huyết tương phía trên đoạn phân pha có chứa-PBMC được bỏ đi và các PBMC được chuyển vào ống nghiệm Falcon mới, tiếp đó được cho thêm 50 ml PBS. Ly tâm hỗn hợp (ở tốc độ 4000 m/s^2 (400 x g), 10 phút, nhiệt độ trong phòng), dịch nổi được bỏ đi và viên tròn PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô khuẩn (các bước ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2 (350 x g), 10 phút). Quần thể PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và giữ trong môi trường RPMI1640 có chứa 10% FCS và 1% L-alanyl-L-glutamin (Biochrom, K0302) trong tủ ủ tế bào (37°C, 5% CO_2) cho đến khi sử dụng tiếp (không quá 24 giờ). Đối với thử nghiệm giết tế bào này, các kháng thể được thêm vào ở các nồng độ được chỉ định (trong khoảng từ 6 pM đến 100 nM lặp lại 3 lần). Các PBMC được thêm vào các tế bào đích ở tỷ lệ E:T cuối cùng là 10:1. Giết tế bào đích được đánh giá sau 24 giờ và 48 giờ ủ bằng cách định lượng LDH (lactat dehydrogenaza) được giải phóng vào các dịch nổi tế bào bằng các tế bào chết theo chương trình/hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Phân giải tối đa các tế bào đích (= 100%) đạt được bằng cách ủ các tế bào đích bằng 1% Triton X-100. Phân giải tối thiểu (= 0%) chỉ các tế bào đích được ủ đồng thời với các tế bào hiệu ứng mà không có kháng thể đặc hiệu kép. Kết quả cho thấy là CEA TCB gây cảm ứng giết đặc hiệu-tế bào đích và mạnh các tế bào đích dương tính-CEA (Fig. 12, A-H). Các giá trị EC_{50} liên quan đến các thử nghiệm giết tế bào, được tính sử dụng GraphPadPrism5 được trình bày trong Bảng 8.

Bảng 8. Số bản sao thụ thể CEA và các giá trị EC_{50} (pM) đối với việc giết qua trung gian tế bào T tế bào khối u biểu hiện-CEA được gây cảm ứng bởi kháng thể CEA TCB.

Dòng tế bào	Số bản sao thụ thể CEA	EC50 [pM] 48 giờ
HPAFII	120 000 – 205	667

	000	
BxPC-3	41 000	3785
ASPC1	3500 - 8000	846

Ví dụ 10

Hoạt hoá và tăng sinh tế bào T 5 ngày sau khi giết qua trung gian CEA TCB các tế bào đích khối u biểu hiện-CEA

Phát hiện hoạt hoá và tăng sinh tế bào T 5 ngày sau khi giết qua trung gian CEA TCB các tế bào đích khối u biểu hiện-CEA được đánh giá trên các tế bào HPAFII (CEA mức cao), BxPC-3 (CEA mức trung bình) và ASPC-1 (CEA mức thấp). HCT-116 (dòng tế bào khối u âm tính CEA) và TCB không được nhắm đích được sử dụng làm các đối chứng âm tính. Điều kiện thí nghiệm cho thử nghiệm tăng sinh này tương tự như các điều kiện mô tả trong Ví dụ 9, nhưng chỉ có 10000 các tế bào đích được dàn mỏng /giếng của đĩa 96 giếng đáy phẳng. Để đánh giá tăng sinh tế bào T, các PBMC mới được phân lập được đánh dấu sử dụng CFSE (Sigma #21888). Tóm lại, dung dịch gốc CFSE được pha loãng để thu được dung dịch xử lý 100 µM. 90 x 10^6 PBMC các tế bào được tái tạo huyền phù trong 90 ml PBS được ủ ấm trước và bổ sung với 90 µl dung dịch xử lý CFSE. Các tế bào được trộn ngay sau đó và ủ ấm 15 phút ở 37°C. 10 ml FCS đã ủ ấm trước được thêm vào các tế bào để ngừng phản ứng. Các tế bào được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 4000m/s^2 (400 x g), được tái tạo huyền phù trong 50 ml môi trường và ủ ấm trong 30 phút ở 37°C. Sau khi ủ, các tế bào được rửa một lần bằng môi trường ấm, đếm số lượng, được tái tạo huyền phù trong môi trường và thêm vào các tế bào đích đối với thử nghiệm giết tế bào này và tiếp đó xác định mức tăng sinh và hoạt hoá tế bào ở tỷ lệ E:T là 10:1. Tăng sinh được đánh giá 5 ngày sau khi giết trên các tế bào dương tính với CD4 và CD8 bằng cách định lượng dịch pha loãng chất nhuộm màu CFSE. Mức biểu hiện CD25 được đánh giá trên cùng phân nhóm tế bào T này sử dụng kháng thể CD25 kháng người. Tóm lại, sau khi ly tâm (tốc độ 4000 m/s^2 (400 x g) trong 4 phút), các tế bào được tái tạo huyền phù, rửa bằng dịch đệm FACS và được ủ với 25 µl hỗn hợp kháng thể CD4/CD8/CD25 được pha loãng trong 30 phút ở 4°C (CD4 #317418 kháng người APC/Cy7, CD8 #301014 kháng người APC, CD25 #302612 kháng người PE/Cy7). Các

tế bào tiếp đó được rửa ba lần để loại bỏ kháng thể chưa gắn kết, và cuối cùng được tái tạo huyền phù trong 200 µl dịch đệm FACS có chứa propidi iôđua(PI) để loại trừ các tế bào đã chết để xác định FACS. Độ huỳnh quang được xác định sử dụng BD FACS CantoII. Kết quả cho thấy là CEA TCB gây cảm ứng tăng sinh đặc hiệu đích và mạnh các tế bào T $CD8^+$ và $CD4^+$ (Fig. 13, A-D) cũng như mức hoạt hoá của chúng được phát hiện bởi điều hoà tăng chất đánh dấu hoạt hoá CD25 (Fig. 13, E-H).

Ví dụ 11

Bài tiết xytokin bởi các tế bào hiệu ứng của người sau khi giết qua trung gian-tế bào T các tế bào khối u biểu hiện-CEA được gây cảm ứng bởi CEA TCB

Bài tiết xytokin bởi các PBMC của người sau khi giết qua trung gian-tế bào T các tế bào khối u MKN45 biểu hiện-CEA được gây cảm ứng bởi CEA TCB được đánh giá bằng cách phân tích FACS (bộ kit CBA) các dịch nổi tế bào 48 giờ sau khi giết.

Điều kiện thí nghiệm là giống với các điều kiện mô tả trong Ví dụ 9. Khi kết thúc thời gian ủ, đĩa được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 3500 m/s^2 (350 x g), dịch nổi được chuyển vào đĩa 96-giếng mới và được bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích tiếp. (A) IFN-γ, (B) TNFα, (C) Granzyme B, (D) IL-2, (E) IL-6 và (F) IL-10 được bài tiết vào các dịch nổi tế bào được phát hiện sử dụng Bộ protein Flex hoà tan của người BD CBA, theo hướng dẫn của nhà sản xuất trên FACS CantoII. Sử dụng các bộ kit sau đây: Bộ Flex IL-2 BD của người BD CBA #BD 558270; Bộ Flex Granzyme B BD của người BD CBA #BD 560304; bộ Flex TNF của người BD CBA #BD 558273; Bộ Flex IFN-γ của người BD CBA #BD 558269; Bộ Flex IL-4 của người BD CBA #BD 558272; Bộ Flex IL-10 của người BD CBA #BD 558274.

Kết quả cho thấy là quá trình giết qua trung gian CEA TCB (không phải là quá trình giết qua trung gian mẫu đối chứng TCB không được nhắm đích) gây cảm ứng bài tiết IFN-γ, TNFα, Granzyme B, IL-2, IL-6 và IL-10 (Fig. 14, A-F).

Ví dụ 12

Giết qua trung gian-tế bào T các tế bào đích với sự có mặt của các nồng độ tăng dần của shed CEA (sCEA)

Giết qua trung gian-tế bào T các tế bào đích khối u biểu hiện-CEA (LS180) được gây cảm ứng bởi kháng thể CEA TCB với sự có mặt của các nồng độ tăng dần của shed

CEA (sCEA 2,5 ng/ml-5 µg/ml) được đánh giá. Các PBMC của người được sử dụng làm các tế bào hiệu ứng và phát hiện giết tế bào 24 giờ và 48 giờ sau khi ủ với kháng thể đặc hiệu kép và sCEA. Tóm lại, các tế bào đích được thu gom với Trypsin/EDTA, rửa, và dàn mỏng ở mật độ 25000 tế bào/giếng sử dụng các đĩa 96-giếng đáy phẳng. Các tế bào để bám dính qua đêm. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm tỷ trọng Histopaque các chế phẩm lympho bào đã làm giàu (bao phủ buffy) thu được từ người cho khoẻ mạnh. Máu mới pha loãng bằng PBS vô khuẩn và được phủ lên trên Gradien Histopaque (Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (tốc độ 4500 m/s^2 (450 x g), 30 phút, nhiệt độ trong phòng), phần huyết tương phía trên đoạn phân pha có chứa-PBMC được bỏ đi và các PBMC được chuyển vào ống nghiệm Falcon mới tiếp đó được cho thêm 50 ml PBS. Ly tâm hỗn hợp (ở tốc độ 4000 m/s^2 (400 x g), 10 phút, nhiệt độ trong phòng), dịch nổi được bỏ đi và viên tròn PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô khuẩn (các bước ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2 (350 x g), 10 phút). Quần thể PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và giữ trong môi trường RPMI1640 có chứa 10% FCS và 1% L-alanyl-L-glutamin (Biochrom, K0302) trong tủ ủ tế bào (37°C, 5% CO_2) cho đến khi sử dụng tiếp (không quá 24 giờ). Đối với thử nghiệm giết tế bào này, kháng thể CEA TCB được sử dụng ở nồng độ cố định 1 nM và sCEA được pha thêm vào dịch thí nghiệm ở nồng độ trong khoảng từ 2,5 ng đến 5 µg/ml. Các PBMC được thêm vào các tế bào đích ở tỷ lệ E:T cuối cùng là 10:1. Giết tế bào đích được đánh giá sau 24 giờ và 48 giờ ủ bằng cách định lượng LDH (lactat dehydrogenaza) được giải phóng vào các dịch nổi tế bào bằng các tế bào chết theo chương trình/hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Phân giải tối đa các tế bào đích (= 100%) đạt được bằng cách ủ các tế bào đích với 1% Triton X-100. Phân giải tối thiểu (= 0%) chỉ các tế bào đích được ủ đồng thời với các tế bào hiệu ứng mà không có kháng thể đặc hiệu kép. Mức giết tế bào qua trung gian CEA TCB khi không có sCEA được đặt ở mức 100% và mức giết tế bào thu được với sự có mặt của các nồng độ tăng dần của sCEA được chuẩn hoá theo mức này. Kết quả cho thấy sCEA chỉ có tác động thứ yếu lên quá trình giết qua trung gian CEA TCB các tế bào đích biểu hiện CEA (Fig. 15 A, B). Không phát hiện thấy có tác động lên quá trình giết của tế bào T ở nồng độ lên đến 0,2 µg/ml sCEA. Các nồng độ sCEA > 0,2 µg/ml chỉ có tác động thứ yếu lên mức giết tế bào tổng thể (giảm trong khoảng từ 10 đến 50%).

Ví dụ 13

Giết qua trung gian-tế bào T các tế bào đích sử dụng các PBMC của người và khỉ đuôi dài làm các tế bào hiệu ứng

Giết qua trung gian-tế bào T các tế bào A549 (ung thư tuyến phổi) biểu hiện quá mức CEA của người (A549-hCEA), được đánh giá 21 giờ và 40 giờ sau khi ủ với kháng thể CEA TCB và các PBMC của người hoặc các PBMC của khỉ đuôi dài làm các tế bào hiệu ứng được đánh giá. Tóm lại, các tế bào đích được thu gom với Trypsin/EDTA, rửa, và dàn mỏng ở mật độ 25000 các tế bào/giếng sử dụng các đĩa 96-giếng đáy phẳng. Các tế bào được để bám dính trong vài giờ. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm tỷ trọng Histopaque các chế phẩm lympho bào đã làm giàu (bao phủ buffy) thu được từ người cho khoẻ mạnh hoặc khỉ đuôi dài khoẻ mạnh. Cho mẫu của khỉ, gradien tỷ trọng 90% Histopaque-PBS được sử dụng. Máu mới pha loãng bằng PBS vô khuẩn và được phủ lên trên Gradien Histopaque (Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (ở tốc độ 4500 m/s^2 (450 x g), 30 phút, nhiệt độ trong phòng đối với các PBMC của người, ở tốc độ 5200 m/s^2 (520 x g), 30 phút, nhiệt độ trong phòng đối với các PBMC của khỉ đuôi dài), phần huyết tương phía trên đoạn phân pha có chứa-PBMC được bỏ đi và các PBMC được chuyển vào ống nghiệm Falcon mới tiếp đó được cho thêm 50 ml PBS. Ly tâm hỗn hợp (ở tốc độ 4000 m/s^2 (400 x g), 10 phút, nhiệt độ trong phòng), dịch nổi được bỏ đi và viên tròn PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô khuẩn (các bước ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2 (350 x g), 10 phút). Để điều chế các PBMC của khỉ đuôi dài, tiến hành bước ly tâm tốc độ thấp bổ sung ở tốc độ 1500 m/s^2 (150 x g) trong 15 phút. Quần thể PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và giữ trong môi trường RPMI1640 có chứa 10% FCS và 1% L-alanyl-L-glutamin (Biochrom, K0302) trong tủ ủ tế bào (37°C, 5% CO_2) cho đến khi sử dụng tiếp (tối đa 4 giờ). Đối với thử nghiệm giết tế bào này, các kháng thể được thêm vào ở các nồng độ được chỉ định (trong khoảng từ 6 pM đến 100 nM lặp lại 3 lần). Các PBMC được thêm vào các tế bào đích ở tỷ lệ E:T cuối cùng là 10:1. Giết tế bào đích được đánh giá sau 21 giờ và 40 giờ ủ bằng cách định lượng LDH (lactat dehydrogenaza) được giải phóng vào các dịch nổi tế bào bằng các tế bào chết theo chương trình/hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Phân giải tối đa các tế bào đích (= 100%) đạt được bằng cách ủ các tế bào đích với 1% Triton X-100. Phân giải tối thiểu (= 0%) chỉ các tế bào đích được ủ đồng thời với các tế bào hiệu ứng mà không có kháng thể đặc hiệu kép. Kết quả cho thấy là CEA TCB điều tiết giết đặc hiệu đích các tế bào đích dương tính-CEA sử dụng các tế bào hiệu ứng

(PBMC) của người (Fig. 16, A, C) và khỉ đuôi dài (Fig. 16, B, D). Các giá trị EC_{50} liên quan đến mức giết sau 40 giờ, được tính toán sử dụng GraphPadPrism5 là 306 pM đối với các PBMC của người và 102 pM đối với các PBMC của khỉ đuôi dài.

Ví dụ 14

Giết qua trung gian-tế bào T dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người biểu hiện-CEA được gây cảm ứng bởi kháng thể CEA TCB

Giết qua trung gian-tế bào T các dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng của người biểu hiện-CEA 48 giờ sau khi ủ với các PBMC của người và kháng thể CEA TCB ở 0,8 nM, 4 nM và 20 nM được đánh giá. Tóm lại, các PBMC được phân lập từ các nón bạch cầu thu được từ cùng những người cho khoẻ mạnh duy nhất. Các tế bào được pha loãng với PBS (1:10) và tạo lớp trên Lymphoprep trong các ống nghiệm Falcon 50 mL. Sau khi ly tâm (1800 vòng/phút trong 25 phút), lớp PBMC được rút từ mặt phân lớp và rửa 4 lần bằng PBS. Đếm số lượng các PBMC, làm đông lạnh trong 10% DMSO trong FCS trong các điều kiện làm đông lạnh tốc độ có kiểm soát ở nồng độ 40 x 10^6 tế bào/mL và bảo quản trong nitơ lỏng cho đến khi sử dụng tiếp. Cho thử nghiệm giết của tế bào T, các tế bào khối u được dàn mỏng trực tiếp vào các đĩa 96 giếng từ các dịch gốc đông lạnh. Các tế bào được làm ấm nhanh chóng và chuyển ngay vào môi trường đã được ủ ấm trước, được ly tâm, và được tái tạo huyền phù trong môi trường hoàn chỉnh (DMEM, Iscoves hoặc RPMI-1640, đều có bổ sung với 10% FCS và 1% penixilin/streptomyxin) và dàn mỏng ở tỷ lệ 2,5 x 10^4 tế bào/giếng. Các đĩa tiếp đó được ủ ấm ở 37°C trong tủ ủ 10% CO_2 được làm ẩm và môi trường được thay mới ngày hôm sau bằng 100 µL RPMI 2% FCS với 1% glutamin và 50 µL CEA TCB (nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 6,4 đến 20000 pM, các bước chuẩn độ 1:5, trong các giếng lặp lại cho mỗi điều kiện thử). Các PBMC mới làm tan băng được sử dụng cho thử nghiệm (làm tan chảy từ các ống đông lạnh trong 2 giờ trước khi bắt đầu thử nghiệm) và 50 µL (3 x 10^5) được thêm vào mỗi giếng để đạt được tỷ lệ tế bào hiệu ứng: tế bào đích (E:T) là 10:1. Triton X100 (50 µL 4%) được thêm vào 150 µL tế bào đích để thu được các giá trị giải phóng tối đa. Các đĩa được ủ ấm ở 37°C trong 48 giờ và hoạt tính giết tế bào được xác định bằng cách sử dụng bộ kit phát hiện độc tính gây độc tế bào Lactoza Dehydrogenaza (Roche) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tỷ lệ % mức phân giải tế bào đặc hiệu được tính toán như sau: [mức giải phóng của mẫu - mức giải phóng tức thì] / [mức giải phóng tối đa - mức

giải phóng tức thì] x 100. Fig. 17, A-C thể hiện mối tương quan giữa mức biểu hiện CEA (số lượng bản sao thụ thể được định lượng sử dụng QIFIKIT, xem bên dưới) và % giết tế bào đối với 31 dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng (thể hiện trên trục x). Fig. 17, D thể hiện mối tương quan giữa mức biểu hiện CEA và % mức phân giải đặc hiệu ở 20 nM CEA TCB (hệ số tương quan Spearman = 0,7289, $p < 0,0001$, $n = 31$), cho thấy các tế bào khối u thể hiện số bản sao thụ thể CEA mức cao (>50 000) được phân giải có hiệu quả bởi CEA TCB trong khi đó cụm các tế bào thể hiện số lượng bản sao thụ thể CEA mức thấp (<10 000) không được phân giải bởi CEA TCB trong cùng điều kiện thí nghiệm. Fig. 17, E thể hiện mối tương quan giữa mức biểu hiện CEA và EC_{50} của CEA TCB. Mặc dù mối tương quan này không có ý nghĩa thống kê (mức tương quan Spearman = -0,3994, $p = 0,1006$, $R^2 = 0,1358$) đồ thị cho thấy rõ ràng là kiểu hiệu lực của CEA TCB tốt hơn (có nghĩa là các giá trị EC_{50} thấp hơn) trên các dòng tế bào khối u biểu hiện số bản sao thụ thể CEA mức cao.

Để phân tích mức biểu hiện bề mặt CEA trên các dòng tế bào ung thư, Qifikit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) được sử dụng để hiệu chỉnh các tín hiệu huỳnh quang và xác định số lượng các vị trí gắn kết/tế bào. Các tế bào được ủ trên đá trong 30 phút với kháng thể đơn dòng CEA CAM5 ở chuột kháng người (0,5µg cho 5 x 105 tế bào, dòng tế bào: CI-P83-1, sc-23928, Santa Cruz), được rửa hai lần bằng PBS1X-BSA 0,1% tiếp đó là ủ 45 phút với kháng thể ở dê kháng chuột được tiếp hợp-isothixoyanat huỳnh quang đa dòng được cung cấp kèm theo Qifikit. Loại trừ các tế bào chết khỏi dịch phân tích sử dụng nhuộm màu 4',6-điamiđino-2-phenylindol (DAPI). Phân tích các mẫu trên máy phân tích CyAn™ ADP (Beckman Coulter). Thu được kết quả cường độ huỳnh quang (MFI) trung bình sau khi phân tích dữ liệu sử dụng phần mềm Summit 4.3. Sử dụng các kết quả MFI này để xác định số lượng tương đối các vị trí gắn kết kháng thể trên các dòng tế bào (gọi là số lượng bản sao CEA theo kết quả thu được) sử dụng phương trình thu được từ đường cong hiệu chỉnh (các hạt hiệu chỉnh Qifikit).

Dòng tế bào ung thư ruột kết-trực tràng được sử dụng cho các thử nghiệm giết của tế bào T và định lượng biểu hiện bề mặt CEA được nhân giống từ các ống trữ lạnh. Phương pháp này được sử dụng để duy trì các dịch gốc đông lạnh như được mô tả trong tài liệu: Br J Cancer 103, 340-346, (2010) của Bracht và các đồng tác giả).

Ví dụ 15

Hiệu lực kháng khối u in vivo của CEA TCB ở caxinoma ruột kết của người LS174T-fluc2 được đồng ghép với PBMC của người (tỷ lệ E:T là 5:1)

Chuột NOG (NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull) (n=12) được tiêm dưới da $1x10^6$ tế bào LS174T-fluc2 được trộn trước với PBMC của người với thể tích tổng cộng 100 µl trong PBS, tỷ lệ E:T là 5:1. Các tế bào LS174T-fluc2 đã được xử lý để biểu hiện luciferaza, việc xử lý này cho phép theo dõi tiến triển của khối u bằng độ sinh phát quang (BLI) theo cách không xâm nhập và độ nhạy cao. Để đánh giá tác dụng điều trị sớm và muộn, các con chuột được tiêm trong tĩnh mạch hai lần 0,5 hoặc 2,5 mg/kg CEA TCB bắt đầu vào ngày 1 (điều trị sớm) hoặc ngày 7 (điều trị muộn) sau khi đồng ghép dưới da tế bào khối u/PBMC. Để làm đối chứng, một nhóm chuột được tiêm tĩnh mạch hai lần/tuần 2,5 mg/kg TCB đối chứng có cùng kiểu như CEA TCB (trong trường hợp này MCSP TCB được dùng làm đối chứng không được nhắm đích do các tế bào LS174T-fluc2 không biểu hiện MCSP), và một nhóm đối chứng phụ khác chỉ dùng PBS (chất dẫn) bắt đầu vào ngày 1. Thể tích khối u được xác định một lần/tuần thước cặp kỹ thuật số. Ngoài ra, các con chuột được tiêm trong phúc mạc một tuần một lần bằng D-Luciferin và độ phát quang sinh học của các tế bào khối u sống được xác định bằng IVIS Spectrum (Perkin Elmer). Xử lý điều trị cho đến 19 ngày sau khi chủng nhiễm tế bào khối u, tương ứng với ngày kết thúc thử nghiệm. Các kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Fig. 18 A-D. Kết quả thể hiện giá trị trung bình và SEM từ 12 chuột với thể tích khối u được đo bằng thước cặp (A và C) và bằng độ sinh phát quang (thông lượng tổng cộng, B và D) ở các nhóm nghiên cứu khác nhau ((A, B) điều trị sớm, (C, D) điều trị muộn).

Ví dụ 16

Hiệu lực kháng khối u in vivo của CEA TCB ở caxinoma ruột kết của người LS174T-fluc2 được đồng ghép với PBMC của người (tỷ lệ E:T là 1:1)

Các con chuột NOG (NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull) (n=10) được tiêm dưới da 1×10^6 tế bào LS174T-fluc2 (xem Ví dụ 15) được trộn trước với PBMC của người với thể tích tổng cộng 100 µl trong PBS, tỷ lệ E:T là 1:1. Để đánh giá tác dụng điều trị sớm và muộn, các con chuột được tiêm hai lần/tuần 2,5 mg/kg CEA TCB bắt đầu vào ngày 1 (điều trị sớm) hoặc ngày 7 (điều trị muộn) sau khi chủng nhiễm tế bào khối u. Để làm đối chứng, một nhóm chuột được tiêm trong tĩnh mạch hai lần/tuần 2,5 mg/kg MCSP TCB (cũng xem Ví dụ 15), và một nhóm đối chứng phụ khác chỉ dùng PBS (chất dẫn) bắt đầu vào

ngày 1. Thể tích khối u được xác định một lần/tuần bằng thước cặp kỹ thuật số. Ngoài ra, các con chuột được tiêm trong phúc mạc một tuần một lần bằng D-Luciferin và độ phát quang sinh học của các tế bào khối u sống được xác định bằng IVIS Spectrum (Perkin Elmer). Xử lý điều trị cho đến 23 ngày sau khi chủng nhiễm tế bào khối u, tương ứng với ngày kết thúc thử nghiệm. Các kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Fig. 19. Kết quả thể hiện giá trị trung bình và SEM của thể tích khối u được đo bằng thước cặp (A) cũng như bằng độ sinh phát quang (B) ở các nhóm nghiên cứu khác nhau (n=10).

Ví dụ 17

Hiệu lực in vivo của CEA TCB được làm giống chuột ở mô hình khối u đúng vị trí Panco2-huCEA ở chuột chuyển gen huCD3ε/huCEA có khả năng cạnh tranh miễn dịch

Chuột chuyển gen huCD3ε/huCEA (n=10) được tiêm trong tuỵ 2 x 10^5 tế bào Panco2-huCEA với thể tích tộng cộng là 10 µl trong PBS. Vì các tế bào chuột không biểu hiện CEA, dòng tế bào caxinôma tuỵ của chuột Panco2 được xử lý để biểu hiện quá mức CEA của người làm kháng nguyên đích đối với CEA TCB. Các con chuột được tiêm tĩnh mạch hai lần/tuần với 0,5 mg/kg CEA TCB được làm giống chuột hoặc PBS cho nhóm đối chứng (chất dẫn) và theo dõi khả năng sống sót. Các con chuột được theo dõi hàng ngày các triệu chứng lâm sàng và phát hiện tác dụng bất lợi. Các tiêu chí đánh giá chuột không có khả năng sống sót là ốm biểu hiện rõ rệt: lông bẩn xơ xác, lưng cong, vấn đề khi thở, vận động kém. Kết quả là tỷ lệ sống sót tổng thể được thể hiện trong Fig. 20. Kết quả thể hiện tỷ lệ phần trăm chuột sống sót/thời điểm. So sánh mức ý nghĩa thống kê kết quả nhóm điều trị so với nhóm đối chứng PBS bằng cách sử dụng kiểm định t Student cặp đôi (p=0,078).

Ví dụ 18

Ái lực của CEA TCB với CEA và CD3 theo phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)

Tiến hành thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) trên Biacore T100 ở 25°C với HBS-EP làm dịch đệm chạy (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% chất hoạt động bề mặt P20, Biacore, Freiburg/Đức).

Để đo ái lực, CEA TCB được bắt giữ trên bề mặt chíp cảm biến CM5 với Fab kháng người được làm bất động (GE Healthcare #28-9583-25). IgG bắt giữ được ngẫu hợp với bề mặt chíp cảm biến này bằng cách làm bất động trực tiếp khoảng 10.000 đơn vị

cộng hưởng (RU) ở pH 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ngẫu hợp amin chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức).

Để phân tích sự tương tác với CD3ε stalk-Fc (nốt phồng)-Avi/CD3δ-stalk-Fc(lỗ) của người (tương ứng với các SEQ ID NO 120 và 121), CEA TCB được bắt giữ trong 30 giây ở 50 nM với 10 µl/phút. CD3ε/CD3δ được cho chảy qua ở nồng độ trong khoảng từ 0,68 đến 500 nM với tốc độ chảy 30 µl/phút qua các mao quản 'flow cell' trong 360 giây. Theo dõi quá trình phân ly trong 360 giây.

Giá trị K_D của tương tác giữa CEA TCB và NABA-avi-his của người kháng nguyên đích khối u tái tổ hợp (có chứa miền B3 của CEA của người (CEACAM5) xung quanh là miền N, A1 và A2 của CEACAM1 của người với nhãn avi 6his đầu tận cùng C; xem SEQ ID NO: 119) được xác định bằng cách bẫy phân tử TCB trong 40 giây ở 10 µl/phút. Kháng nguyên được cho chảy qua mao quản 'flow cell' trong 240 giây ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,68 đến 500 nM ở tốc độ chảy 30 µl/phút. Sự phân ly được xác định trong 240 giây.

Các khác biệt về chỉ số khúc xạ thô được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi mức đáp ứng thu được ở mao quản 'flow cell' tham chiếu. Trong trường hợp này, các kháng nguyên được cho chảy qua bề mặt với kháng thể Fab kháng người được làm bất động nhưng trên đó đã tiêm HBS-EP thay cho CEA.

Thu được các hằng số động học bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Thuỵ điển), để khớp số liệu các phương trình tốc độ đối với gắn kết Langmuir 1:1 bằng cách lấy tích phân số liệu. Thời gian bán thải ($t_{1/2}$) của tương tác được tính toán sử dụng công thức sau: $t_{1/2} = \ln 2/k_{off}$.

CEA TCB gắn kết với đích khối u và CD3ε/CD3δ trong khoảng nồng độ nM với các giá trị K_D bằng 62 nM đối với NABA của người và 75,3 nM đối với CD3ε/CD3δ của người. Thời gian bán thải của gắn kết hoá trị một với NABA là 5,3 phút, thời gian bán thải của gắn kết với CD3ε/CD3δ là 5,7 phút. Các giá trị động học được tóm tắt trong Bảng 9.

Bảng 9. Ái lực của CEA TCB với NABA của người và CD3ε/CD3δ của người (T=25°C)

Kháng nguyên	**TCB**	**k_{on} [1/Ms]**	**k_{off} [1/giây]**	**$t_{1/2}$ [phút]**	**K_D [nM]**
NABA của người	CEA TCB	$3,49 \times 10^4$	$2,18 \times 10^{-3}$	5,3	62,4
CD3ε/CD3δ của người	CEA TCB	$2,69 \times 10^4$	$2,03 \times 10^{-3}$	5,7	75,3

Ví dụ 19

Ái lực của MSCP TCB với MCSP và CD3 theo phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)

Tiến hành thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) trên Biacore T100 ở 25°C với HBS-EP làm dịch đệm chạy (0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% chất hoạt động bề mặt P20, Biacore, Freiburg/Đức).

Để đo ái lực MCSP TCB được bắt giữ trên bề mặt chíp cảm biến CM5 với Fab kháng người được làm bất động (GE Healthcare #28-9583-25). IgG bắt giữ được ngẫu hợp với bề mặt chíp cảm biến này bằng cách làm bất động trực tiếp khoảng 7.500 đơn vị cộng hưởng (RU) ở pH 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ngẫu hợp amin chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). MCSP TCB được bắt giữ trong 60 giây ở 30 nM với tốc độ 10 µl/phút. D3 MCSP của người và khỉ đuôi dài (tương ứng xem các SEQ ID NO 118 và 117) được cho chảy qua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,024 đến 50 nM với tốc độ chảy 30 µl/phút qua các mao quản 'flow cell' trong 90 giây. Khoảng nồng độ đối với stalk-Fc (nốt phồng)-Avi/CD3δ-stalk-Fc(lỗ) của người và khỉ đuôi dài CD3ε là từ 1,17 đến 600 nM. Do tương tác với MCSP D3 của chuột (SEQ ID NO: 122) được cho là ở mức yếu khoảng nồng độ đối với kháng nguyên này được chọn nằm trong khoảng từ 3,9 đến 500 nM. Theo dõi sự phân ly của tất cả các tương tác trong 120 giây. Các khác biệt về chỉ số khúc xạ thô được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi mức đáp ứng thu được ở mao quản 'flow cell' tham chiếu. Trong trường hợp này, các kháng nguyên được cho chảy qua bề mặt với

kháng thể Fab kháng người được làm bất động nhưng trên đó đã được tiêm HBS-EP thay vì MCSP TCB.

Thu được các hằng số động học bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Thuỵ điển), để khớp số liệu các phương trình tốc độ đối với gắn kết Langmuir 1:1 bằng cách lấy tích phân số liệu. Tương tác của MCSP TCB với MCSP D3 của chuột được xác định ở trạng thái ổn định. Thời gian bán thải ($t_{1/2}$) của tương tác được tính toán sử dụng công thức sau: $t_{1/2} = \ln 2/k_{off}$.

MCSP TCB gắn kết với đích khối u ở khoảng nồng độ pM với các giá trị K_D bằng 0,15 nM đối với kháng nguyên của người và 0,12 nM đối với kháng nguyên của khỉ đuôi dài. CD3ε/CD3δ tái tổ hợp được gắn kết bởi MCSP TCB với giá trị K_D là 78 nM (của người) và 104 nM (của khỉ đuôi dài). Thời gian bán thải của gắn kết hoá trị một tối đa đến 260 phút đối với đích khối u và 2,9 phút đối với CD3e/CD3d. Khi làm trưởng thành ái lực, kháng thể MCSP thu được khả năng gắn kết nhất định với MCSP D3 của chuột tái tổ hợp. Giá trị K_D cho tương tác này là trong khoảng nồng độ mM (1,6 mM). Các giá trị động học được tóm tắt trong Bảng 10.

Bảng 10. Ái lực của MCSP TCB với MCSP D3 của người, khỉ đuôi dài và chuột và CD3ε/CD3δ của người và khỉ đuôi dài (T=25°C)

	k_{on} [1/Ms]	**k_{off} [1/giây]**	**$t_{1/2}$ [phút]**	**K_D [nM]**
MCSP D3 của người	$3,89 \times 10^5$	$5,63 \times 10^{-5}$	205	0,15
MCSP D3 của khỉ đuôi dài	$3,70 \times 10^5$	$4,39 \times 10^{-5}$	263	0,12
MCSP D3 của chuột	Không xác định	Không xác định	Không xác định	1570*
CD3ε/CD3δ của người	$4,99 \times 10^4$	$3,92 \times 10^{-3}$	2,9	78,7
CD3ε/CD3δ của khỉ đuôi dài	$4,61 \times 10^4$	$4,78 \times 10^{-3}$	2,4	104

*được xác định bằng cách đo ở trạng thái ổn định

Ví dụ 20

Độ ổn định nhiệt của CEA TCB

Độ ổn định nhiệt của CEA TCB được theo dõi bằng chỉ số tán xạ ánh sáng động lực học (DLS). 30 µg mẫu protein đã lọc với nồng độ protein 0,5 mg/ml được đo 2 lần lặp lại trên thiết bị đọc đĩa Dynapro (Wyatt Technology Corporation; MỸ). Nhiệt độ được tăng dần từ 25 đến 75°C ở mức 0,05°C/phút, lấy kết quả bán kính và cường độ tán xạ toàn phần.

Kết quả được thể hiện trong Fig. 21. Nhiệt độ kết tụ của CEA TCB được xác định ở 55°C.

Ví dụ 21

Độ ổn định nhiệt của MCSP TCB

Độ ổn định nhiệt của MCSP TCB được theo dõi bằng chỉ số tán xạ ánh sáng động lực học (DLS). 30 µg mẫu protein đã lọc với nồng độ protein 0,5 mg/ml được đo 2 lần lặp lại trên thiết bị đọc đĩa Dynapro (Wyatt Technology Corporation; Mỹ). Nhiệt độ được tăng dần từ 25 đến 75°C ở mức 0,05°C/phút, lấy kết quả bán kính và cường độ tán xạ toàn phần.

Kết quả được thể hiện trong Fig. 22. Nhiệt độ kết tụ của MCSP TCB được xác định ở 55°C.

Ví dụ 22

Giết qua trung gian-tế bào T các tế bào đích khối u biểu hiện-MCSP được gây cảm ứng bởi các kháng thể MCSP TCB và MCSP 1+1 CrossMab

Giết qua trung gian-tế bào T các tế bào đích được gây cảm ứng bởi các kháng thể MCSP TCB và MCSP 1+1 CrossMab TCB (kháng thể đặc hiệu kép hoạt hoá tế bào T có cùng các trình tự CD3 và gắn kết MCSP như MCSP TCB, với kiểu phân tử được thể hiện trong Fig. 1D) được đánh giá trên các tế bào đích khối u A375 (MCSP mức cao), MV-3 (MCSP mức trung bình) và HCT-116 (MCSP mức thấp). LS180 (dòng tế bào khối u âm tính MCSP) được sử dụng làm đối chứng âm tính. Đánh giá giết tế bào khối u 24 giờ và 48 giờ sau khi ủ các tế bào đích với các kháng thể và các tế bào hiệu ứng (các PBMC của người). Tóm lại, các tế bào đích được thu gom bằng Trypsin/EDTA, rửa, và dàn mỏng ở

mật độ 25000 tế bào/giếng sử dụng các đĩa 96-giếng đáy phẳng. Các tế bào để để bám dính qua đêm. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm tỷ trọng Histopaque các chế phẩm lympho bào đã làm giàu (bao phủ buffy) thu được từ người cho khoẻ mạnh. Máu mới pha loãng bằng PBS vô khuẩn và được phủ lên trên gradien Histopaque (Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (ở tốc độ 4500 m/s^2 (450 x g), 30 phút, nhiệt độ trong phòng), phần huyết tương phía trên đoạn phân pha có chứa-PBMC được bỏ đi và các PBMC được chuyển vào ống nghiệm Falcon mới tiếp đó được cho thêm 50 ml PBS. Ly tâm hỗn hợp (ở tốc độ 4000 m/s^2 (400 x g), 10 phút, nhiệt độ trong phòng), dịch nổi được bỏ đi và viên tròn PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô khuẩn (các bước ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2 (350 x g), 10 phút). Quần thể PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và giữ trong môi trường RPMI1640 có chứa 10% FCS và 1% L-alanyl-L-glutamin (Biochrom, K0302) trong tủ ủ tế bào (37°C, 5% CO_2) cho đến khi sử dụng tiếp (không quá 24 giờ). Đối với thử nghiệm giết tế bào này, các kháng thể được thêm vào ở các nồng độ được chỉ định (khoảng từ 0,01 pM đến 10 nM lặp lại 3 lần). Các PBMC được thêm vào các tế bào đích ở tỷ lệ E:T cuối cùng là 10:1. Giết tế bào đích được đánh giá sau 24 giờ và 48 giờ ủ bằng cách định lượng LDH (lactat dehydrogenaza) được giải phóng vào các dịch nổi tế bào bằng các tế bào chết theo chương trình/hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Phân giải tối đa các tế bào đích (= 100%) đạt được bằng cách ủ các tế bào đích bằng 1% Triton X-100. Phân giải tối thiểu (= 0%) chỉ các tế bào đích được ủ đồng thời với các tế bào hiệu ứng mà không có kháng thể đặc hiệu kép. Kết quả cho thấy là kháng thể MCSP TCB có tác dụng mạnh hơn MCSP 1+1 CrossMab TCB do nó gây cảm ứng giết các tế bào đích dương tính-MCSP mạnh hơn ở cả hai thời điểm và trên tất cả các tế bào đích khối u (Fig. 23 A-H). Các giá trị EC_{50} liên quan đến các thử nghiệm giết tế bào, được tính toán sử dụng GraphPadPrism5, được trình bày trong Bảng 11.

Bảng 11. Số bản sao thụ thể MCSP và các giá trị EC_{50} (pM) đối với giết qua trung gian tế bào T các tế bào khối u biểu hiện-MCSP được gây cảm ứng bởi kháng thể MCSP TCB

Dòng tế bào	**Số bản sao thụ thể MCSP**	**EC50 [pM] 24 giờ**	**EC50 [pM] 48 giờ**
A375	387 058	0,1	không được

			xác định
MV-3	260 000	1,0	0,7
HCT-116	36770	~ 6,2e-008	~ 0,09
LS180	âm tính	~ 764	không được xác định

Ví dụ 23

Điều tiết tăng CD25 và CD69 trên các tế bào hiệu ứng $CD8^+$ và $CD4^+$ sau khi giết qua trung gian-tế bào T các tế bào khối u biểu hiện-MCSP được gây cảm ứng bởi các kháng thể MCSP TCB và MCSP 1+1 CrossMab

Hoạt hoá các tế bào T $CD8^+$ và $CD4^+$ sau khi giết bởi tế bào T các tế bào khối u biểu hiện-MCSP (A375 và MV-3) qua trung gian các kháng thể MCSP TCB và MCSP 1+1 CrossMab được đánh giá bằng cách phân tích FACS sử dụng các kháng thể nhận biết chất đánh dấu hoạt hoá tế bào T CD25 (chất đánh dấu hoạt hoá muộn) và CD69 (chất đánh dấu hoạt hoá sớm). Kháng thể và các điều kiện thử nghiệm giết này về cơ bản như nêu trên (Ví dụ 22), sử dụng cùng khoảng nồng độ kháng thể (từ 0,01 pM đến 10 nM, lặp lại 3 lần), tỷ lệ E:T là 10:1 và thời gian ủ 48 giờ.

Sau khi ủ, các PBMC được chuyển vào đĩa 96 giếng đáy tròn, được ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2 (350 x g) trong 5 phút và được rửa hai lần bằng PBS có chứa 0,1% BSA. Nhuộm màu bề mặt đối với CD8 (CD8 kháng người FITC, BD #555634), CD4 (CD4 kháng người PECy7, BD #557852), CD69 (CD69 kháng người PE, Biolegend #310906) và CD25 (CD25 kháng người APC, BD #555434) được tiến hành theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào được rửa hai lần bằng 150 µl/giếng PBS có chứa 0,1% BSA và cố định trong 15 phút ở 4°C sử dụng 100 µl/giếng dịch đệm cố định (BD #554655). Sau khi ly tâm, các mẫu được tái tạo huyền phù trong 200 µl/giếng PBS 0,1% BSA có chứa DAPI để loại trừ các tế bào đã chết để xác định FACS. Các mẫu được phân tích trên BD FACS Fortessa. Kết quả cho thấy là MCSP TCB gây cảm ứng điều hoà tăng chất đánh dấu hoạt hoá đặc hiệu đích và mạnh (CD25, CD69) trên các tế bào T CD8+ (Fig. 24 A, B (các tế bào A375) và E, F (các tế bào MV-3)) và các tế bào T $CD4^+$ (Fig. 24 C, D (các tế

bào A375) và G, H (các tế bào MV-3)) sau khi giết. Đối với các kết quả giết tế bào này, mức hoạt hoá các tế bào T mạnh hơn với MCSP TCB so với MCSP 1+1 CrossMab.

Ví dụ 24

Điều chế DP47 GS TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo = "TCB không được nhắm đích") có chứa DP47 GS làm kháng thể không gắn kết và CH2527 được làm tương thích với người làm kháng thể kháng CD3

"TCB không được nhắm đích" được sử dụng để làm đối chứng trong các thử nghiệm trên. Kháng thể đặc hiệu kép tiếp hợp CD3ε nhưng không gắn kết với kháng nguyên khác bất kỳ và do đó không thể liên kết ngang các tế bào T với các tế bào đích bất kỳ (và sau đó không thể gây cảm ứng giết tế bào). Do đó, nó được sử dụng làm đối chứng âm tính trong các thử nghiệm để theo dõi sự hoạt hoá tế bào T không đặc hiệu bất kỳ.

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tách dòng phụ trong khung với chuỗi nặng ổn định hoặc chuỗi nhẹ ổn định được cài xen trước vào vectơ biểu hiện động vật có vú tiếp nhận tương ứng. Quá trình biểu hiện kháng thể được điều khiển bởi đoạn khởi đầu MPSV và mang trình tự tín hiệu polyA tổng hợp ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra mỗi vectơ có chứa trình tự EBV OriP.

Phân tử được sản sinh bởi các tế bào HEK293 EBNA đồng chuyển nhiễm với các vectơ biểu hiện động vật có vú sử dụng polyetylenimin (PEI). Các tế bào được chuyển nhiễm với các vectơ biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:2:1:1 ("vectơ chuỗi nặng Fc(lỗ)": "vectơ chuỗi nhẹ": "vectơ chuỗi nhẹ Crossfab": "vectơ chuỗi nặng Fc (nốt phồng)-FabCrossfab").

Để chuyển nhiễm các tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy ở dạng huyền phù không chứa huyết thanh trong môi trường nuôi cấy CD CHO. Để sản xuất trong bình phản ứng lắc 500 ml 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được gây giống 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở 2100 m/s^2 (210 x g), dịch nổi được thay thế bằng 20 ml môi trường CD CHO đã được ủ ấm trước đó. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20 ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng là 200 µg ADN. Sau khi thêm vào 540 µl dung dịch PEI hỗn hợp được tạo xoáy trong 15 giây và sau đó ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào được trộn với

ADN/dung dịch PEI, chuyển vào bình lắc 500 ml và ủ trong 3 giờ ở 37°C trong tủ ủ với không khí 5% CO_2. Sau thời gian ủ, thêm vào 160 ml môi trường F17 và tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm 1 mM axit valproic và 7% Feed 1 (Lonza) được thêm vào. Sau 7 ngày, gom dịch nổi nuôi cấy để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100 m/s^2 (210 x g), dung dịch này được lọc vô khuẩn (màng lọc 0,22 µm) và natri azit với nồng độ cuối cùng 0,01% trọng lượng/thể tích được thêm vào, và giữ ở 4°C.

Protein đã bài tiết này được tinh chế từ các dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực sử dụng Protein A. Dịch nổi được nạp vào cột HiTrap Protein A HP (CV=5 mL, GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 40 ml 20 mM natri phosphat, 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 7,5. Protein chưa gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa với ít nhất 10 thể tích cột 20 mM natri phosphat, 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 7,5. Protein đích được rửa giải trong gradien hơn 20 thể tích cột từ 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 7,5 vào 20 mM natri xitrat, 0,5 M natri clorua, pH 2,5. Dung dịch protein được trung hoà bằng cách thêm vào 1/10 dung dịch natri phosphat 0,5 M, pH 8. Cô đặc protein đích và lọc trước khi nạp vào cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) được làm cân bằng bằng 20 mM histidin, 140 mM dung dịch natri clorua pH 6,0.

Nồng độ protein của các mẫu protein được tinh chế được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280 nm, bằng cách sử dụng hệ số tắt mol được tính dựa trên trình tự axit amin.

Độ tinh khiết và trọng lượng phân tử của các phân tử được phân tích bằng CE-SDS khi có mặt và khi không có mặt chất khử. Hệ thống Caliper (Caliper lifescience) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 2 µg mẫu được sử dụng để phân tích.

Hàm lượng kết tụ của các mẫu kháng thể được phân tích bằng cách sử dụng cột phân tích loại trừ theo kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) trong 25 mM K_2HPO_4, 125 mM NaCl, 200 mM L-arginin monohydroclorua, 0,02% (trọng lượng/thể tích) NaN_3, pH 6,7 dịch đệm chạy ở 25°C.

Bảng 12. Tóm tắt về sản xuất và tinh chế DP47 GS TCB

Cấu trúc	Hiệu giá [mg/l]	Hiệu suất [mg/l]	Kết tụ sau bước tinh chế thứ nhất [%]	Phân tử lượng cao [%]	Phân tử lượng thấp [%]	Monome [%]
DP47 GS TCB	103,7	8,04	8	2,3	6,9	91,8

Fig. 25 và Bảng 13 thể hiện kết quả phân tích CE-SDS của DP47 GS TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch đảo) có chứa DP47 GS làm kháng thể không gắn kết và CH2527 được làm tương thích với người làm kháng thể kháng-CD3. (các SEQ ID NO: 59, 60, 61 và 62).

Bảng 13. Phân tích CE-SDS của DP47 GS TCB

	Đỉnh	kDa	Mạch tương ứng
DP47 GS TCB không khử (A)	1	165,22	Phân tử thiếu 2 chuỗi nhẹ
	2	181,35	Phân tử thiếu 1 chuỗi nhẹ
	3	190,58	Phân tử đúng không được glycosyl hoá qua liên kết-N
	4	198,98	Phân tử đúng
DP47 GS TCB có khử (B)	1	27,86	DP47 GS chuỗi nhẹ
	2	35,74	huCH2527 chuỗi nhẹ
	3	63,57	Fc(lỗ)
	4	93,02	Fc(nốt phồng)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) phân tử gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm vùng xác định bổ trợ (CDR) 1 chuỗi nặng SEQ ID NO: 4, CDR 2 chuỗi nặng SEQ ID NO: 5, CDR 3 chuỗi nặng SEQ ID NO: 6, CDR 1 chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 8, CDR 2 chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 9 và CDR 3 chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 10, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo, trong đó các vùng cố định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị;

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba, mỗi gốc là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm CDR 1 chuỗi nặng SEQ ID NO: 24, CDR 2 chuỗi nặng SEQ ID NO: 25, CDR 3 chuỗi nặng SEQ ID NO: 26, CDR 1 chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 28, CDR 2 chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 29 và CDR3 chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 30;

(iii) miền Fc bao gồm cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng gắn kết ổn định,

trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất của miền Fc, và trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc.

2. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 1, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7.

3. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 1 hoặc 2, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba, mỗi gốc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

4. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo, trong đó các vùng cố định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị và bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, và trong đó mỗi vùng của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba là phân tử Fab thường bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

5. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó miền Fc là IgG, đặc biệt là IgG_1, miền Fc.

6. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó miền Fc là miền Fc ở người.

7. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp giữa cấu trúc dưới phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc.

8. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 7, trong đó trong miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có kích cỡ mạch bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra một nốt phồng bên trong miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất mà có thể ăn khớp vào vị trí trong khoang trống thuộc miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có kích cỡ mạch bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra khoang trống thuộc miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ hai trong đó nốt phồng thuộc miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất có thể khớp vào.

9. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó trong miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ nhất của miền Fc gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong miền CH3 của cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V); và trong đó tùy ý là

(a) trong cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc ngoài ra gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc loxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A); và/hoặc

(b) trong cấu trúc dưới phân tử thứ nhất của miền Fc ngoài ra gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein (S354C), và trong cấu trúc dưới phân tử thứ hai của miền Fc ngoài ra gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C) (đánh số EU theo Kabat).

10. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó miền Fc bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin mà làm giảm gắn kết với thụ thể Fc, cụ thể là thụ thể Fcγ, và/hoặc chức năng hiệu ứng, cụ thể là độc tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

11. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 10, trong đó một hoặc nhiều sự thay thế axit amin là ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm L234, L235, và P329 (đánh số EU theo Kabat).

12. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó mỗi cấu trúc dưới phân tử của miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số EU theo Kabat).

13. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba, miền Fc, và tùy ý là một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit.

14. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, bao gồm trình tự polypeptit tương đồng ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 22, trình tự polypeptit tương đồng ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 56, trình tự polypeptit tương đồng ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 57, và

trình tự polypeptit tương đồng ít nhất bằng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 58.

15. Polynucleotit phân lập được hoặc các polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.

16. Tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit hoặc nhiều polynucleotit theo điểm 15.

17. Phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 và CEA, bao gồm các bước a) nuôi cấy tế bào vật chủ theo điểm 16 trong điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và b) thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T.

18. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 17.

19. Dược phẩm bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14 hoặc 18 và chất mang dược dụng.

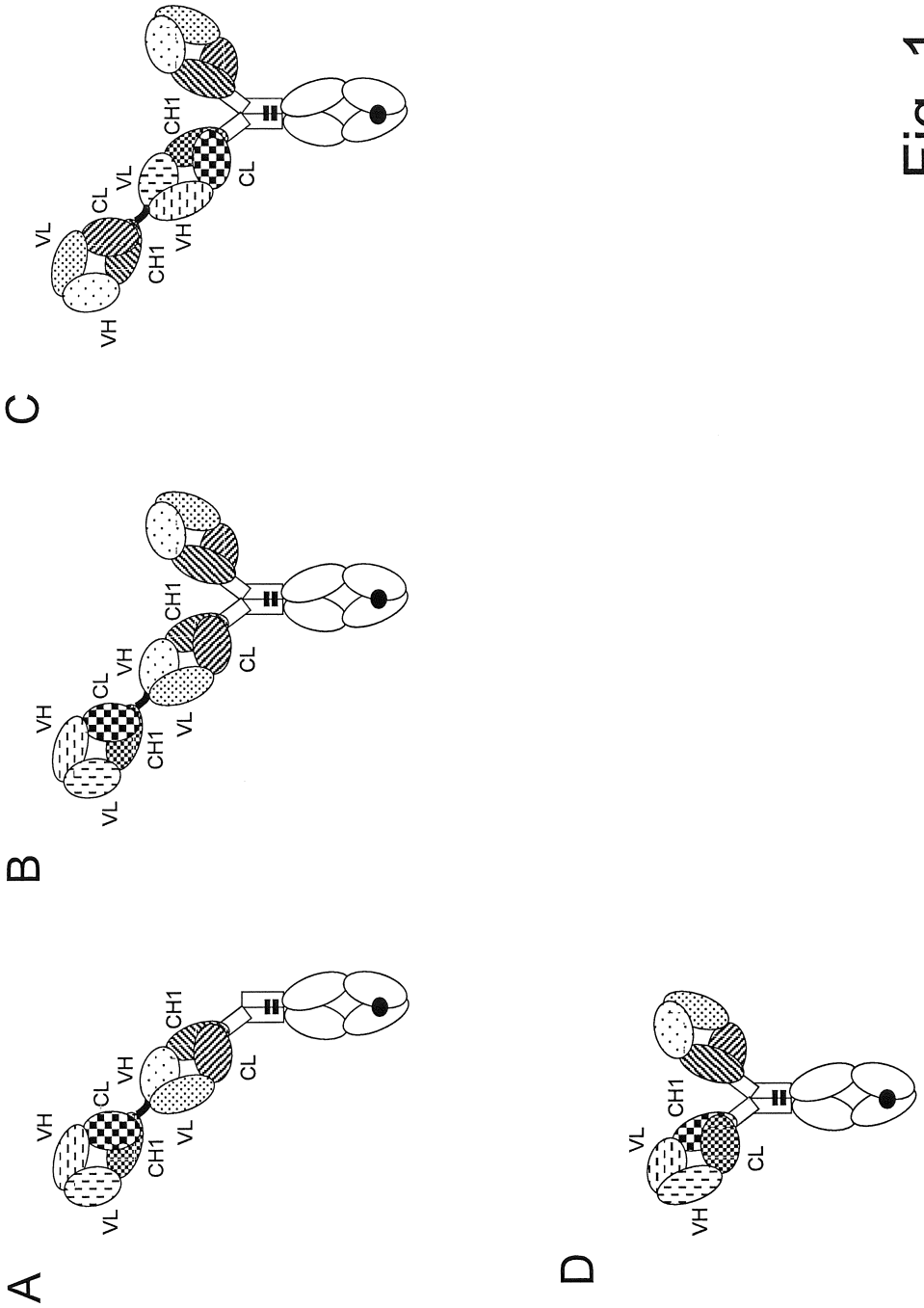

A
VH
CL
VH
CH1
VL
CL
VL
B
VH
CL
VH
CH1
VL
CL
VL
C
VL
CL
VL
CH1
VH
CL
VH
D
VL
CH1
CL
VH

Fig. 1

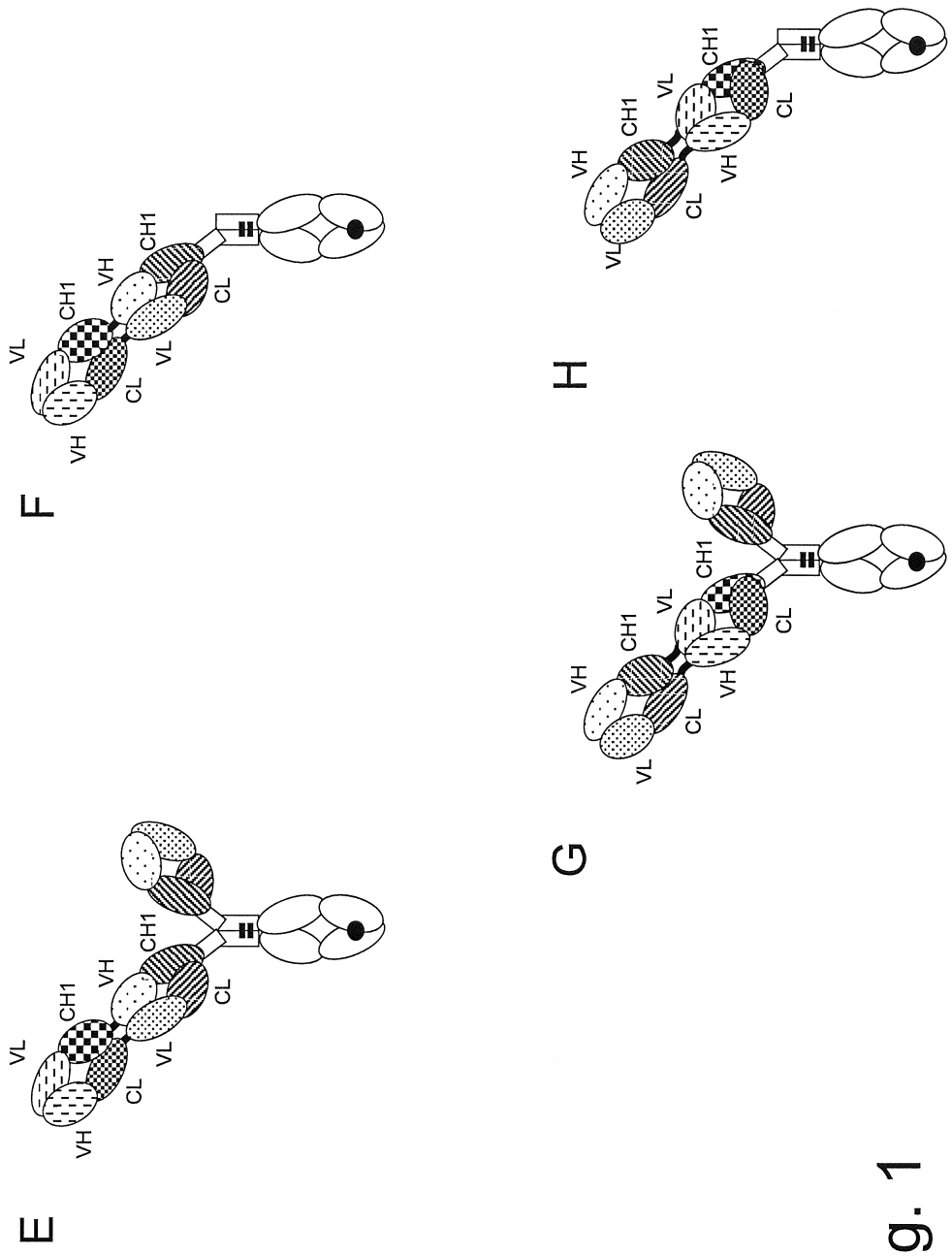

E
VL
CH1
VH
CH1
VL
CL
VH
CL
F
VL
CH1
VH
CH1
VL
CL
VH
CL
G
VH
CH1
VL
CH1
VH
CL
VL
CL
H
VH
CH1
VL
CH1
VH
CL
VL
CL

Fig. 1

```
HC gốc                1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITSGYYWNWIRQHPGKGLEWIGYITYDGSNNYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCADFDYWGQGTLVTVSS
D6 (SEQ ID NO 34)   1 ..........................................F..K.....................................................................
A7 (SEQ ID NO 36)   1 ..........................D.......................F..R.....................................................................
B7 (SEQ ID NO 39)   1 ..................................................F..I.....................................................................
B8 (SEQ ID NO 41)   1 ..................................................F..R.....................................................................
C1 (SEQ ID NO 13)   1 ..................................................F.......................................................................

LC gốc                1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLPWTFGQGTKVEIK
G3 (SEQ ID NO 17)   1 ..........................................................Y.....................A.....................
E10 (SEQ ID NO 43)  1 ..........................Y..G.....................................................H.....................
E10-G3 (SEQ ID NO 46) 1 ..........................Y..G.....................................................H.....A.....................
C5 (SEQ ID NO 47)   1 ..........................R..E.....................G.....................................E.....................
C5-G3 (SEQ ID NO 51)  1 ..........................R..E.....................G.....................................A.....................
```

Fig. 2

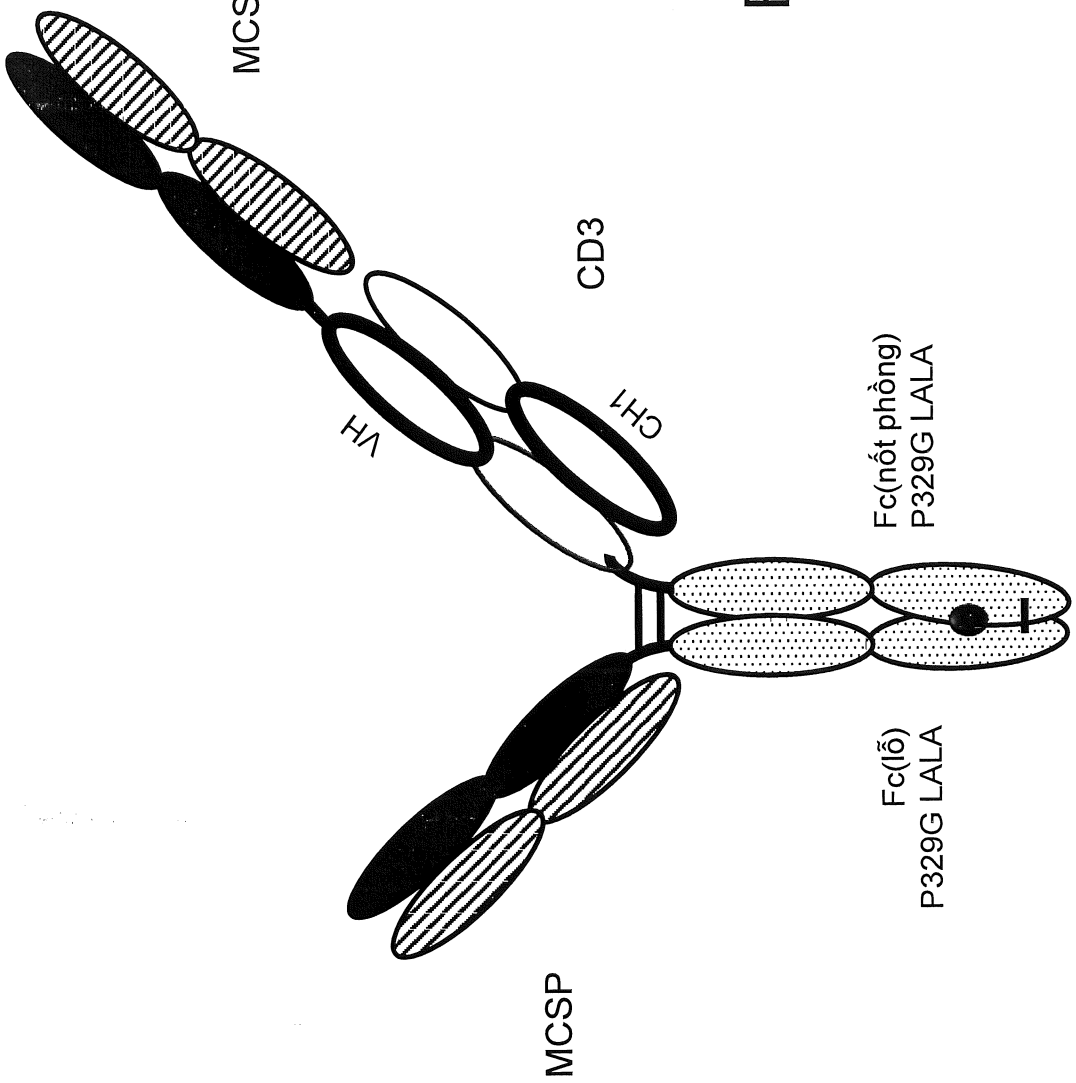


Fig. 3

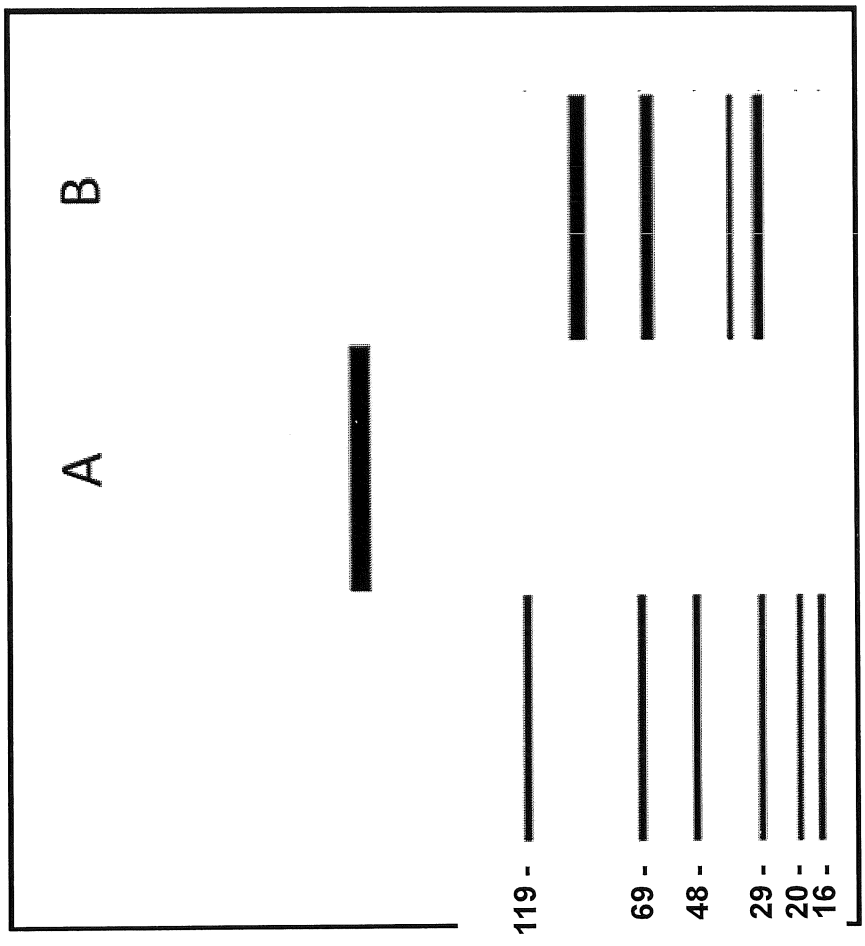


Fig. 4

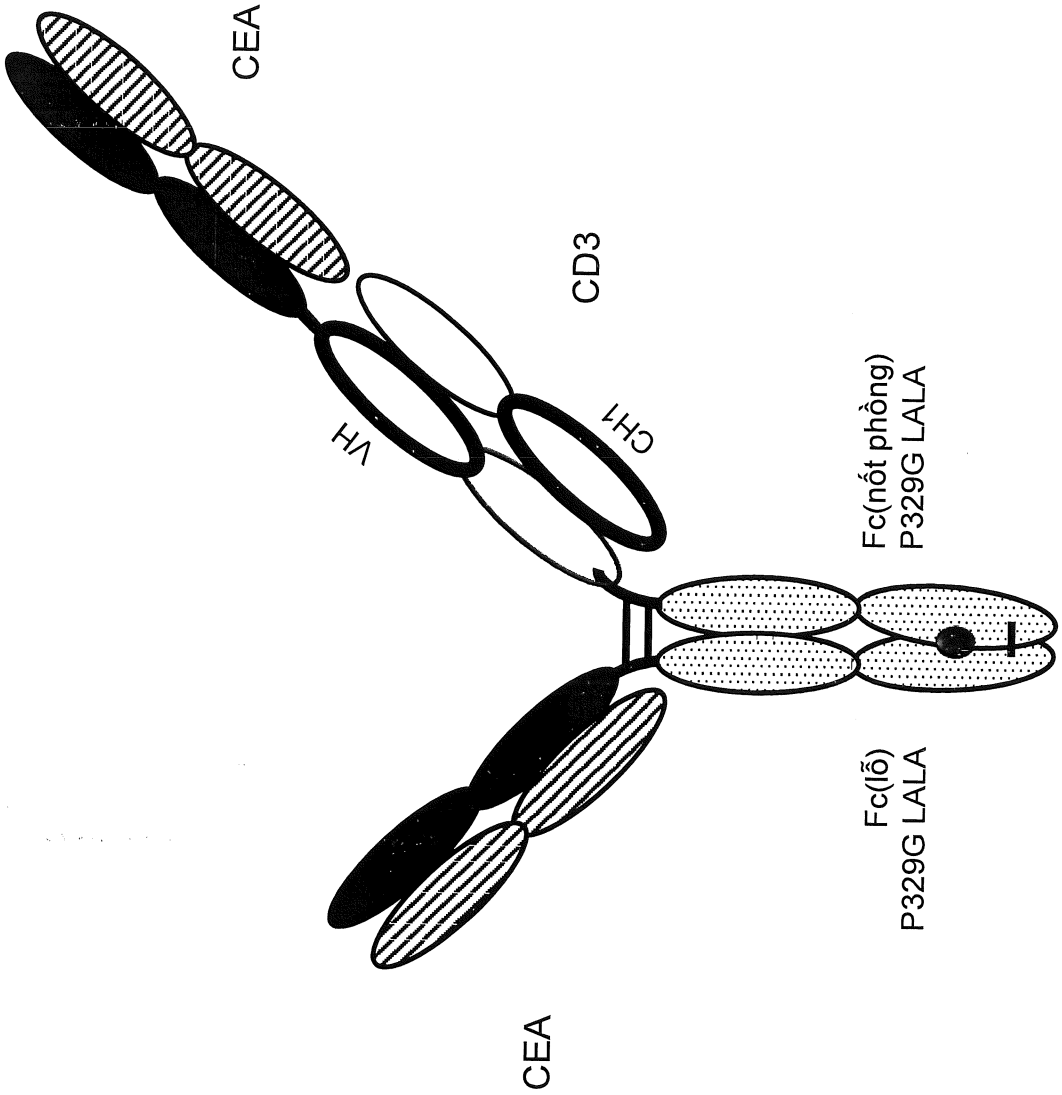


Fig. 5

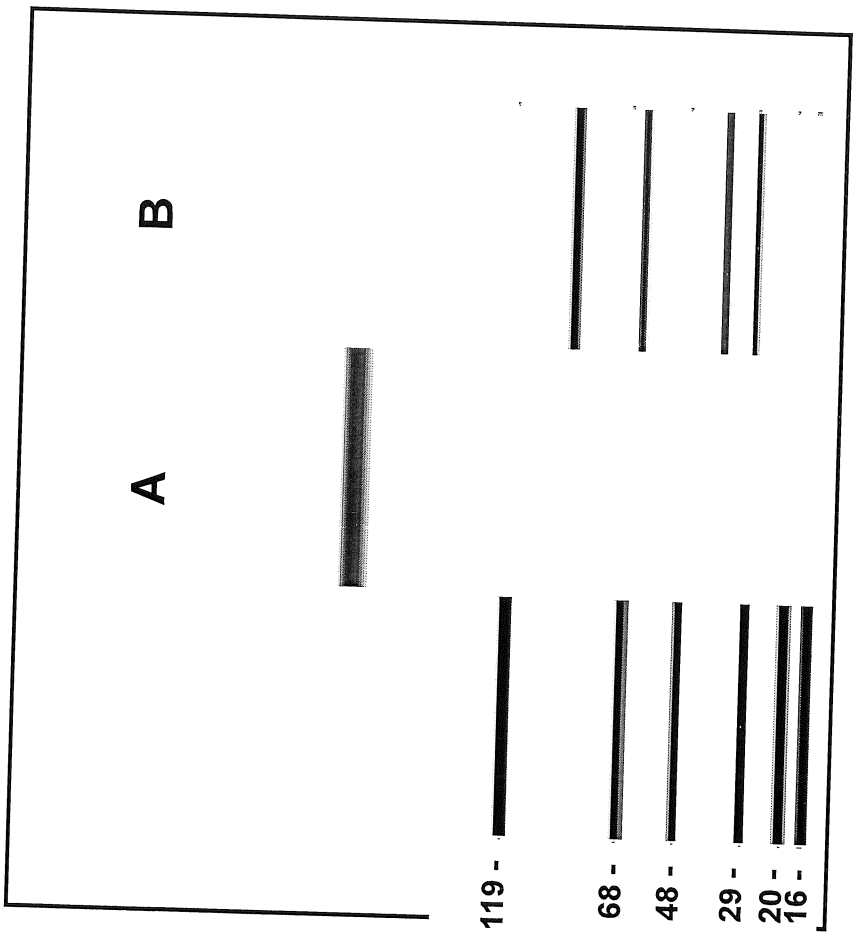


Fig. 6

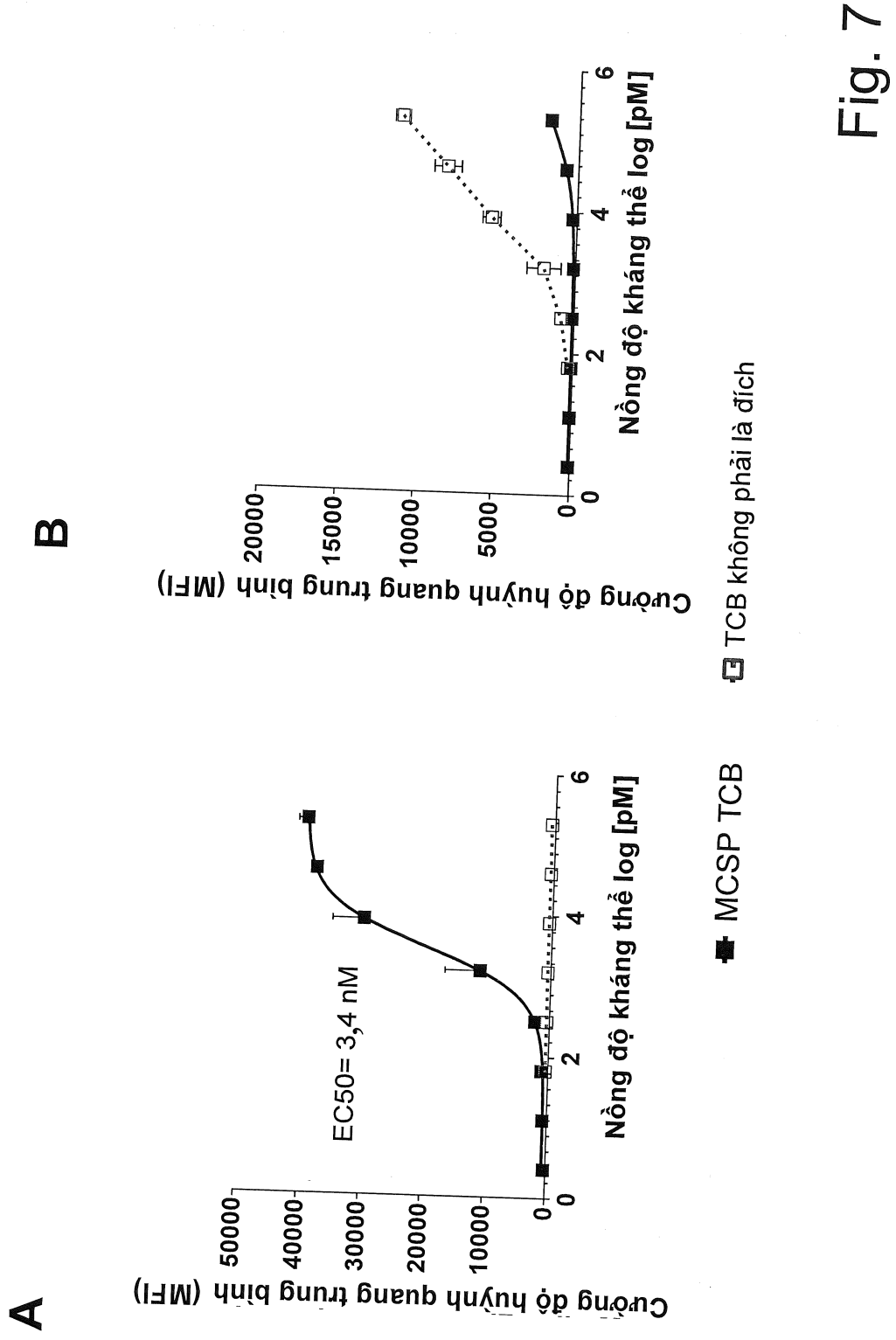

A
Cường độ huỳnh quang trung bình (MFI)
50000
40000
30000
20000
10000
0
EC50= 3,4 nM
0
2
4
6
Nồng độ kháng thể log [pM]
MCSP TCB
B
Cường độ huỳnh quang trung bình (MFI)
20000
15000
10000
5000
0
0
2
4
6
Nồng độ kháng thể log [pM]
TCB không phải là đích

Fig. 7

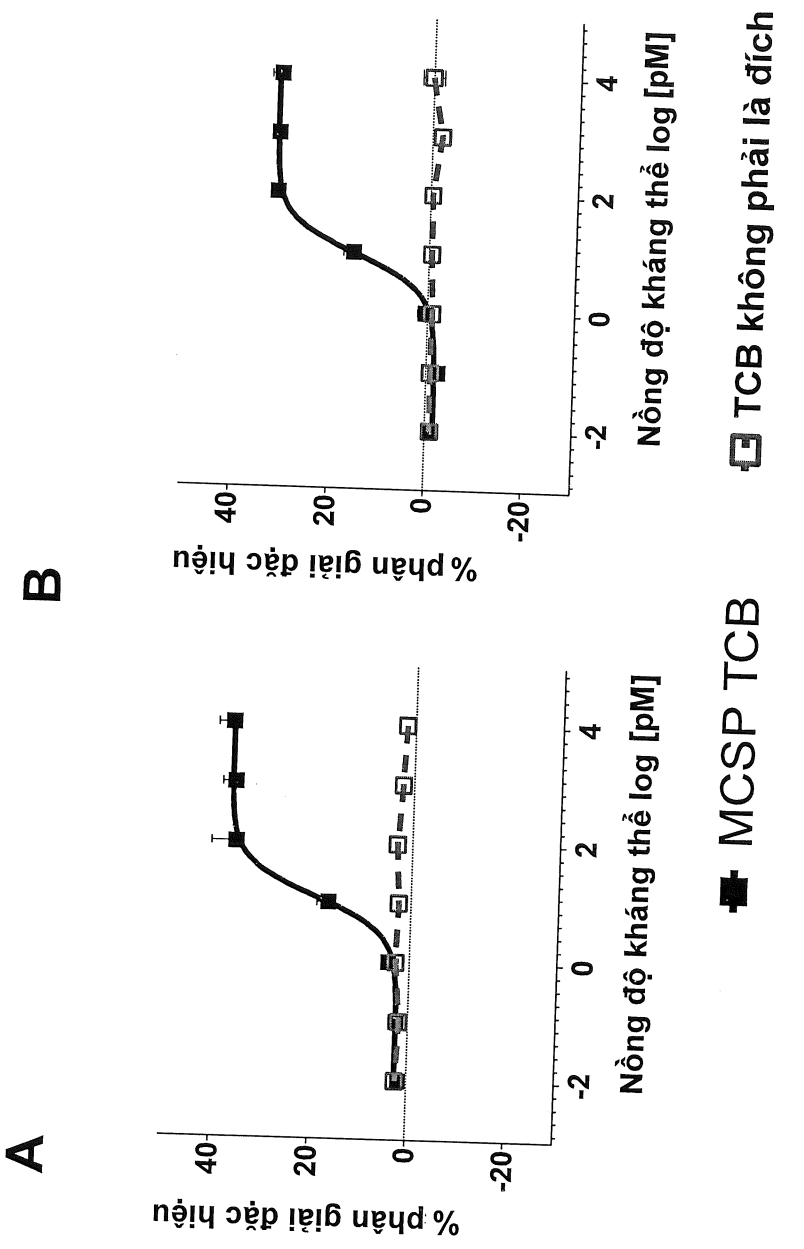

A
% phân giải đặc hiệu
40
20
0
-20
-2
0
2
4
Nồng độ kháng thể log [pM]
B
% phân giải đặc hiệu
40
20
0
-20
-2
0
2
4
Nồng độ kháng thể log [pM]
MCSP TCB
TCB không phải là đích

Fig. 8

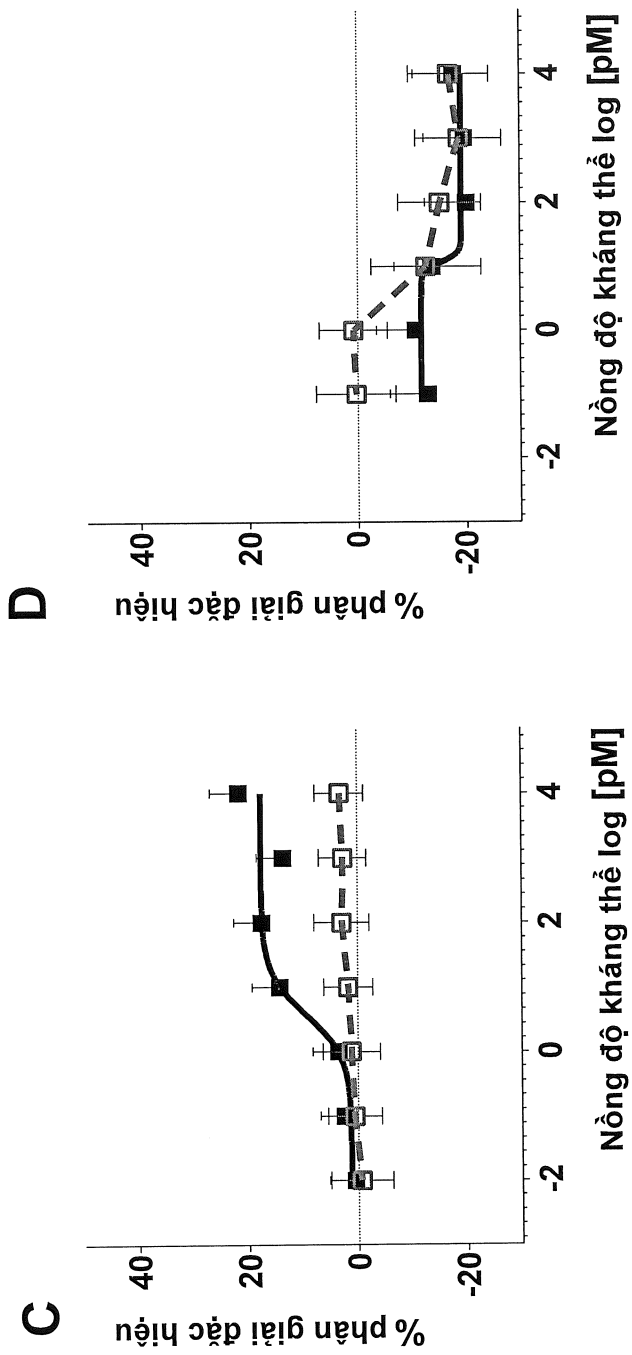

C
% phân giải đặc hiệu
40
20
0
-20
-2
0
2
4
Nồng độ kháng thể log [pM]
D
% phân giải đặc hiệu
40
20
0
-20
-2
0
2
4
Nồng độ kháng thể log [pM]
MCSP TCB
TCB không phải là đích

Fig. 8

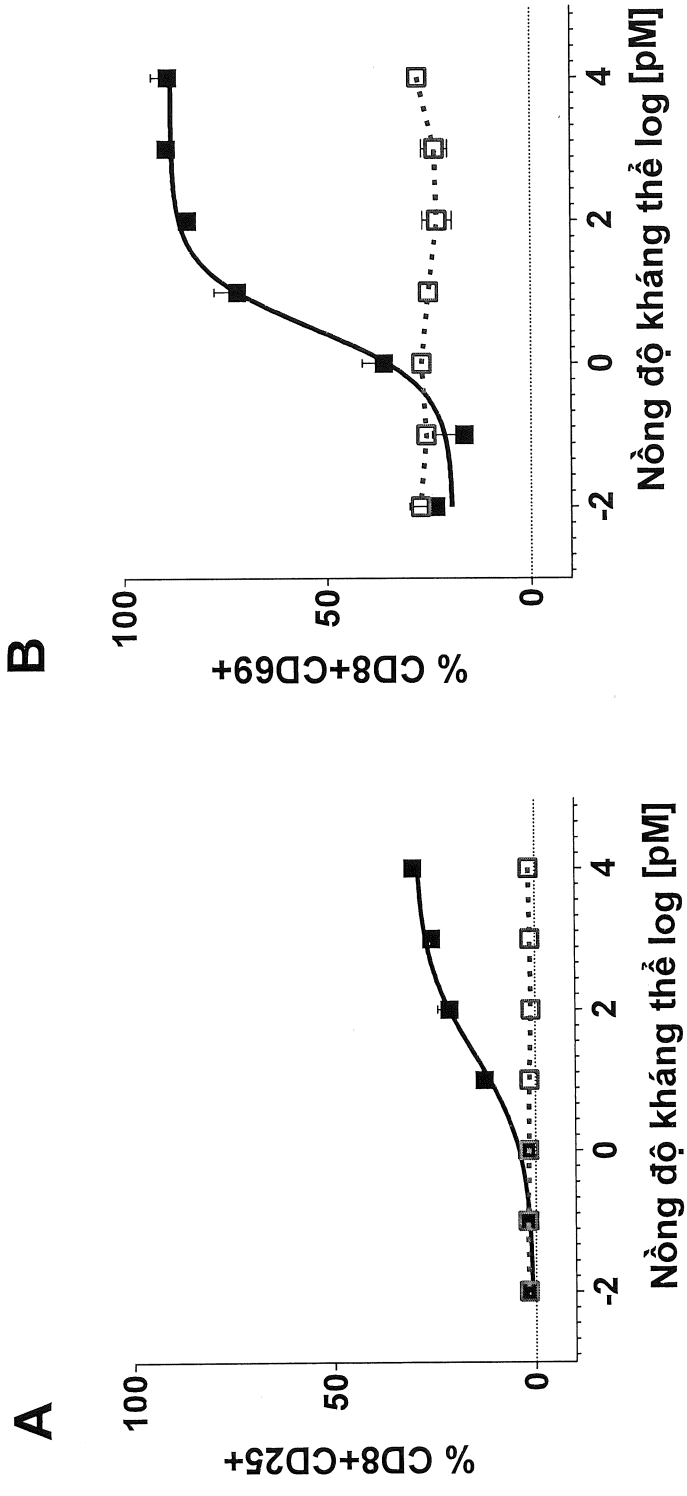

A
% CD8+CD25+
100
50
0
-2
0
2
4
Nồng độ kháng thể log [pM]
B
% CD8+CD69+
100
50
0
-2
0
2
4
Nồng độ kháng thể log [pM]
MCSP TCB
TCB không phải là đích

Fig. 9

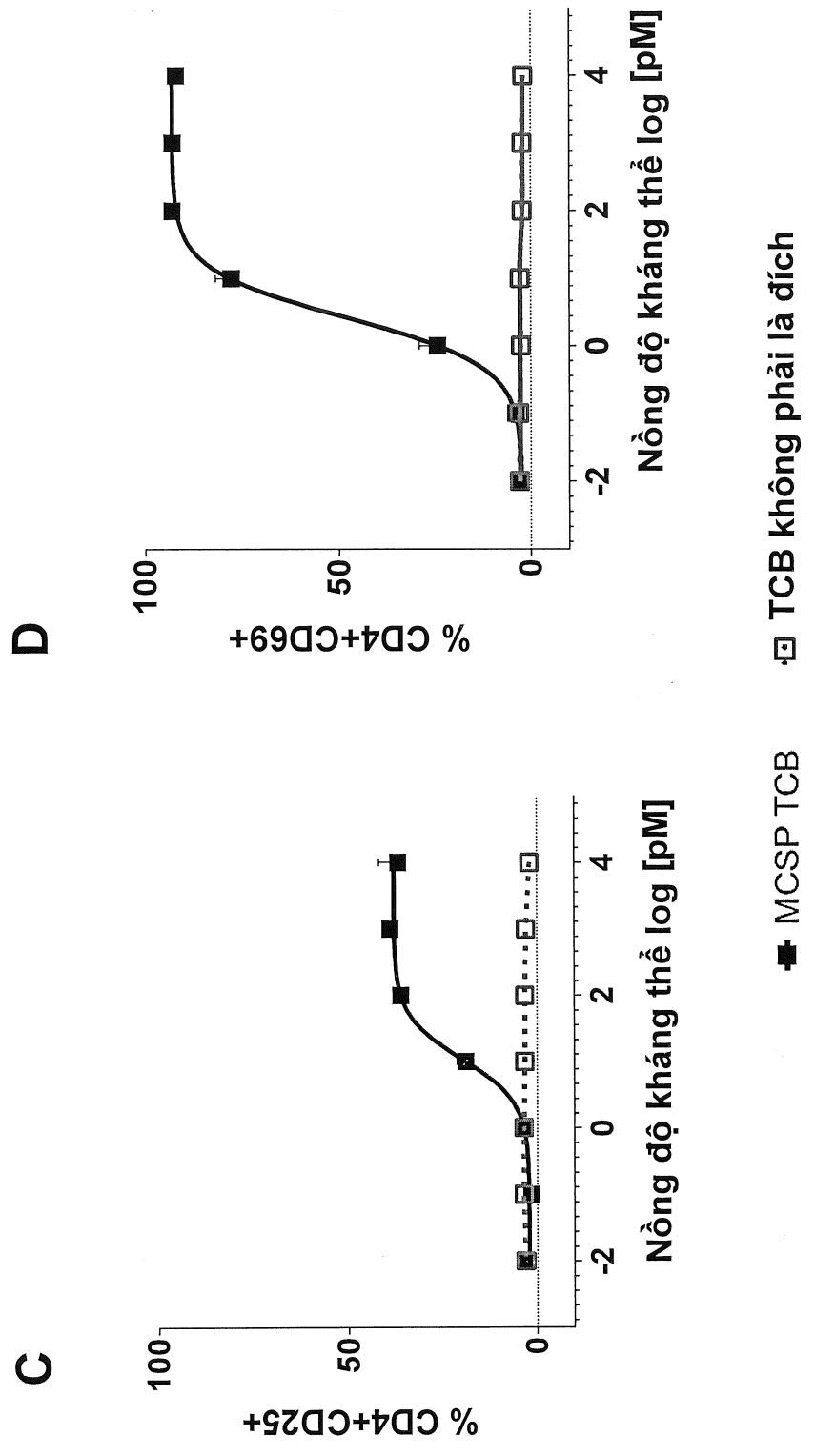

C
% CD4+CD25+
100
50
0
-2
0
2
4
Nồng độ kháng thể log [pM]
D
% CD4+CD69+
100
50
0
-2
0
2
4
Nồng độ kháng thể log [pM]
MCSP TCB
TCB không phải là đích

Fig. 9

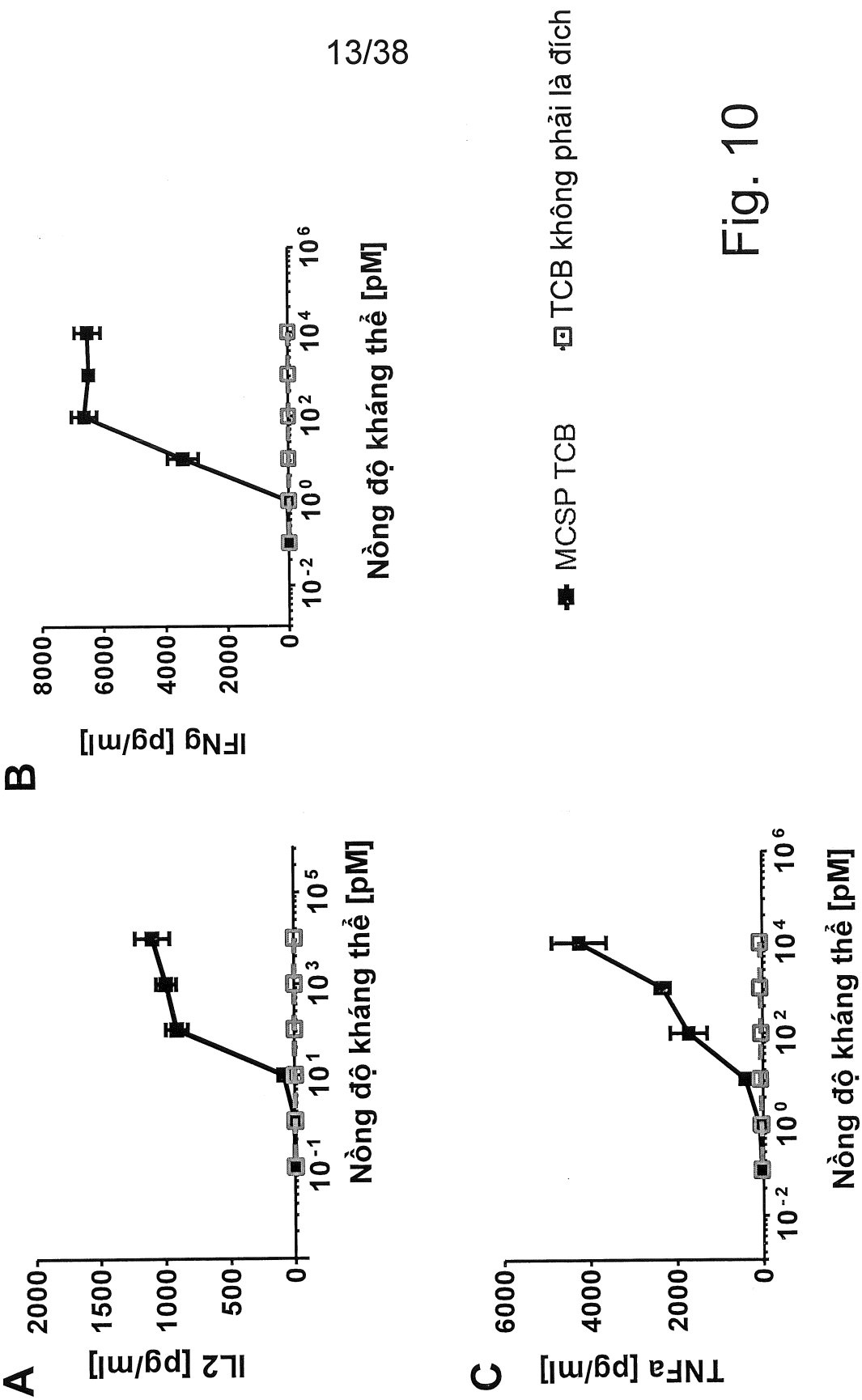

A
IL2 [pg/ml]
2000
1500
1000
500
0
10^{-1}
10^{1}
10^{3}
10^{5}
Nồng độ kháng thể [pM]
B
IFNg [pg/ml]
8000
6000
4000
2000
0
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
10^{6}
Nồng độ kháng thể [pM]
MCSP TCB
TCB không phải là đích
C
TNFa [pg/ml]
6000
4000
2000
0
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
10^{6}
Nồng độ kháng thể [pM]

Fig. 10

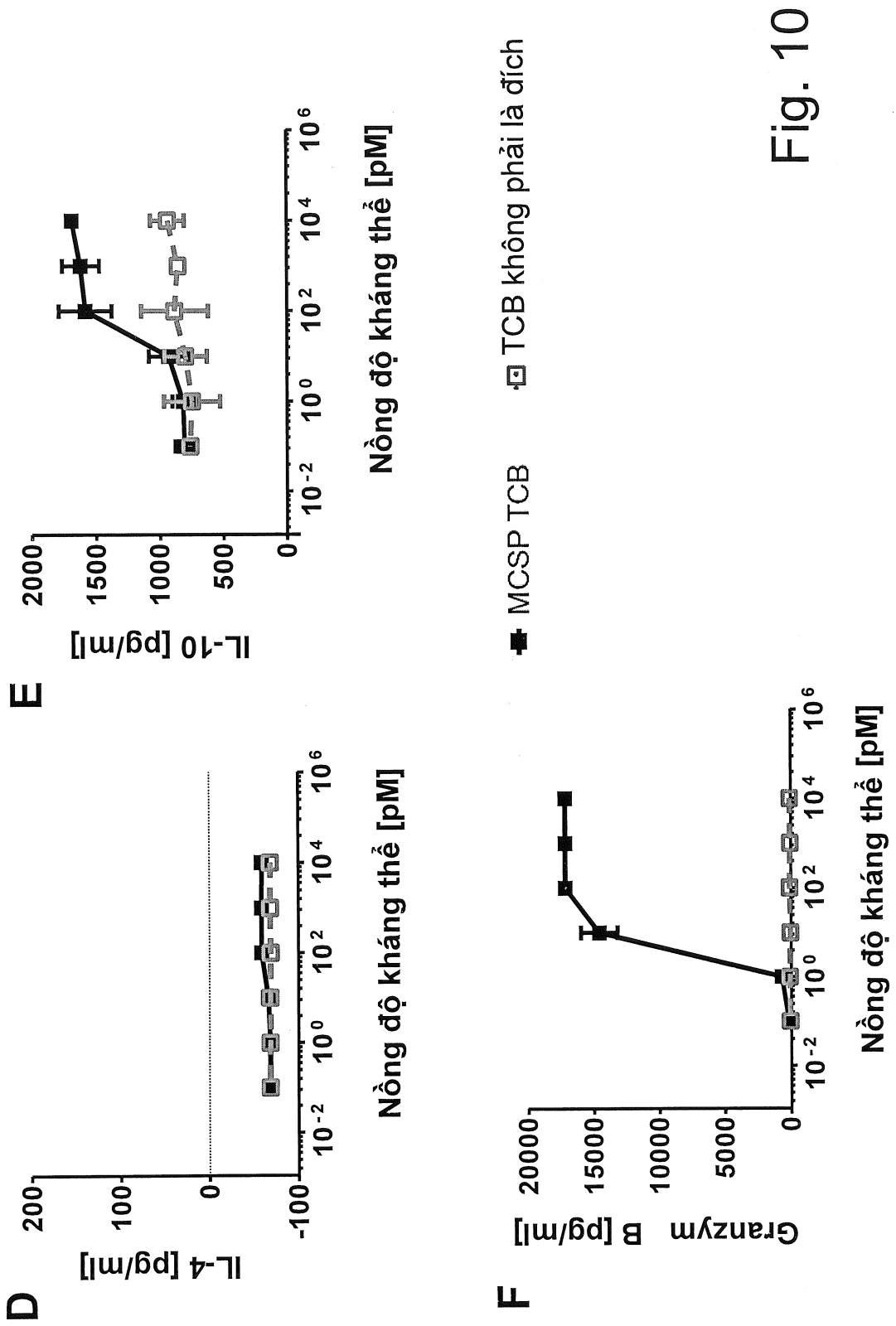

D
IL-4 [pg/ml]
200
100
0
-100
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
10^{6}
Nồng độ kháng thể [pM]
E
IL-10 [pg/ml]
2000
1500
1000
500
0
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
10^{6}
Nồng độ kháng thể [pM]
MCSP TCB
TCB không phải là đích
F
Granzym B [pg/ml]
20000
15000
10000
5000
0
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
10^{6}
Nồng độ kháng thể [pM]

Fig. 10

Fig. 11

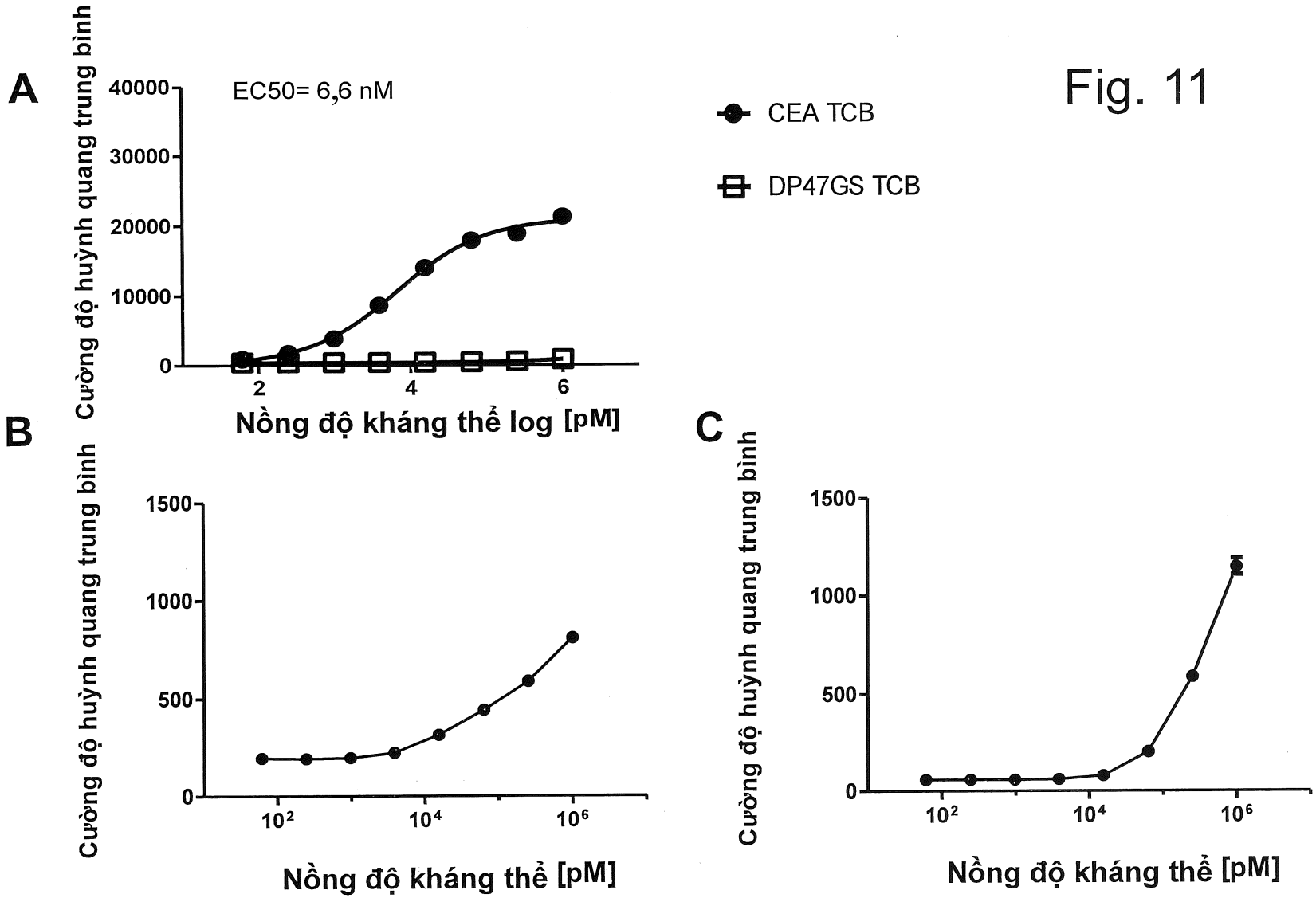

A
EC50= 6,6 nM
CEA TCB
DP47GS TCB
Cường độ huỳnh quang trung bình
40000
30000
20000
10000
0
2
4
6
Nồng độ kháng thể log [pM]
B
Cường độ huỳnh quang trung bình
1500
1000
500
0
10²
10⁴
10⁶
Nồng độ kháng thể [pM]
C
Cường độ huỳnh quang trung bình
1500
1000
500
0
10²
10⁴
10⁶
Nồng độ kháng thể [pM]

Fig. 12

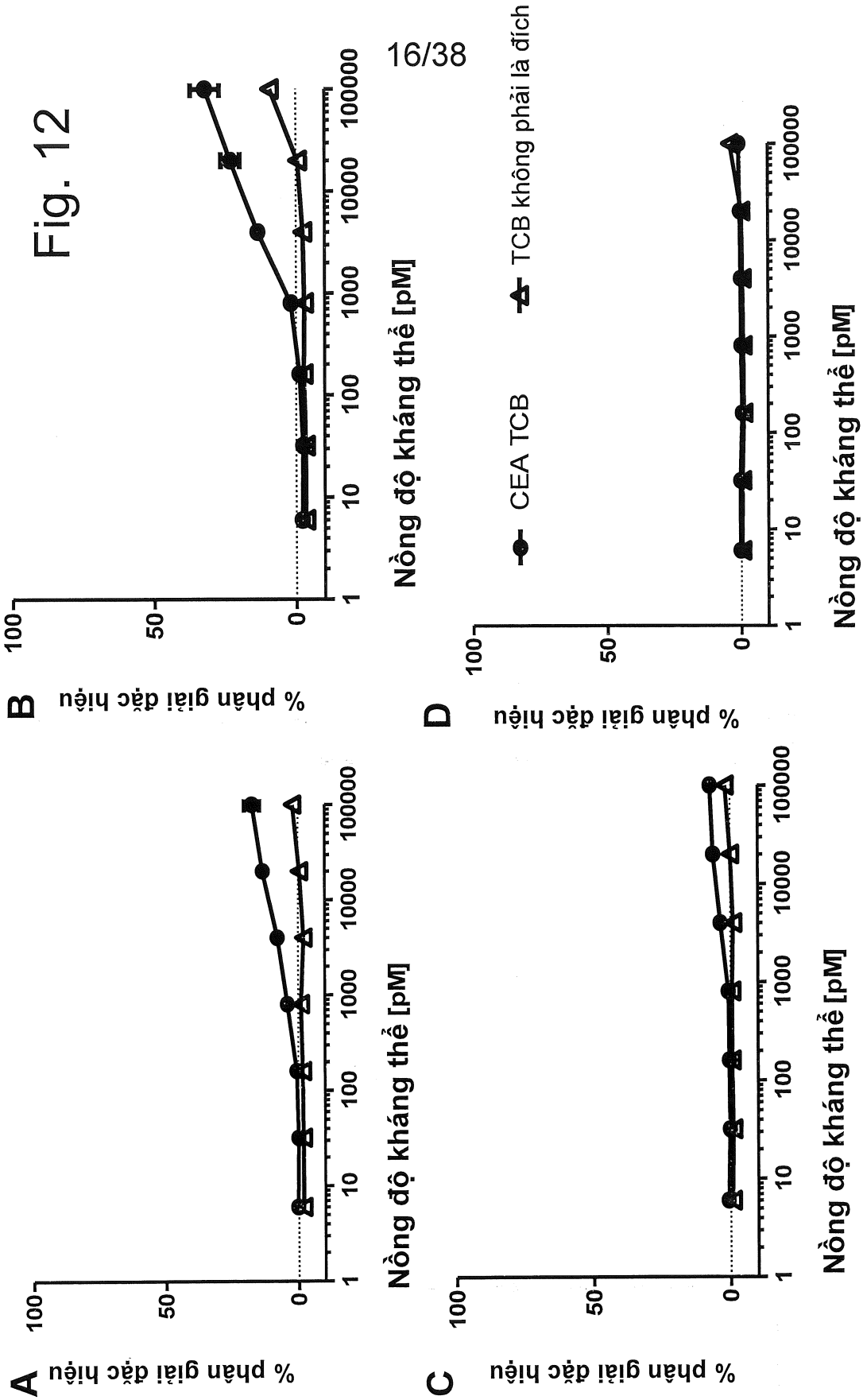
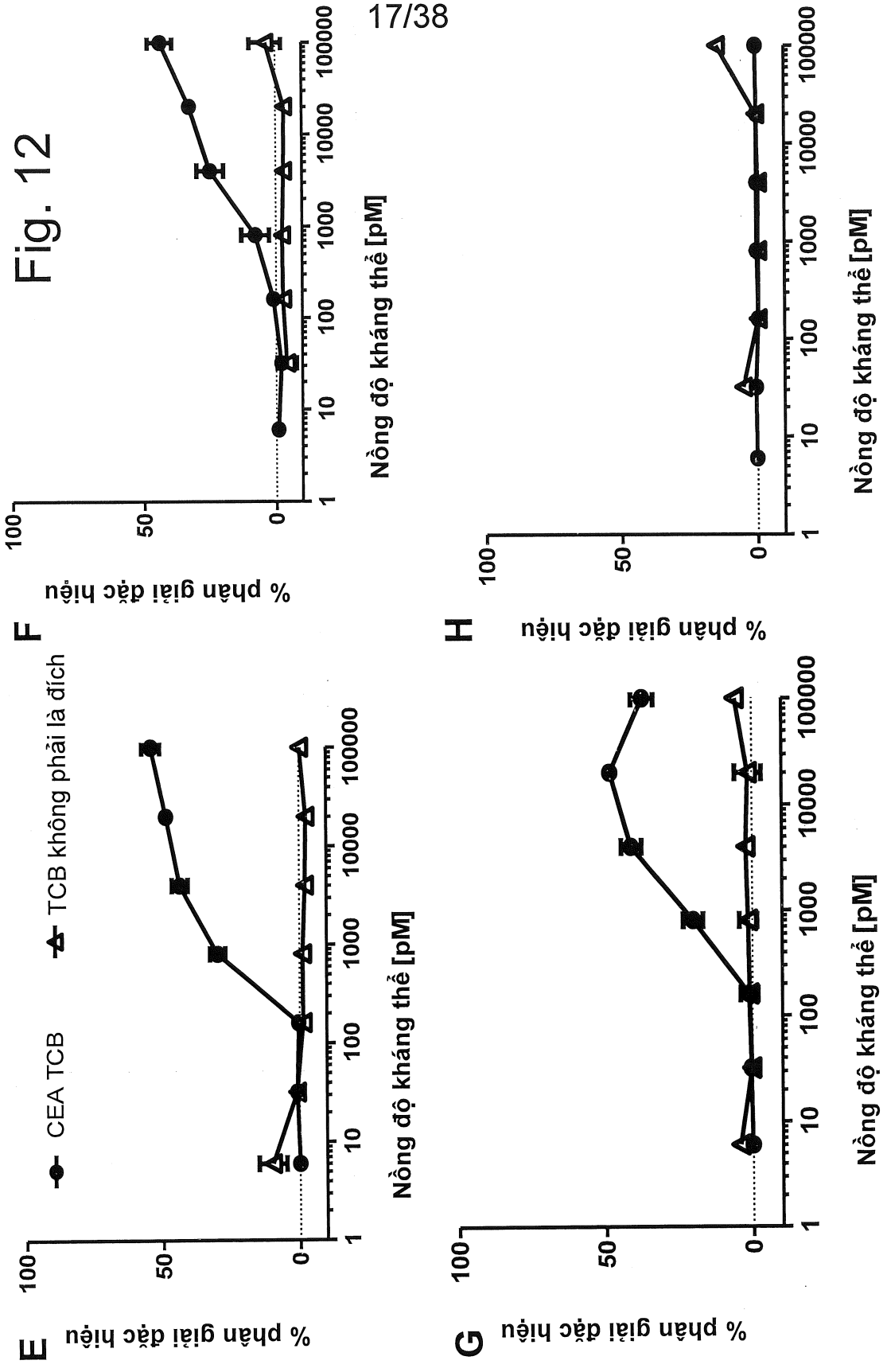

16/38
A
B
C
D
% phân giải đặc hiệu
Nồng độ kháng thể [pM]
1
10
100
1000
10000
100000
0
50
100
CEA TCB
TCB không phải là đích

Fig. 12


E
F
G
H
CEA TCB
TCB không phải là đích
% phân giải đặc hiệu
Nồng độ kháng thể [pM]
100
50
0
1
10
100
1000
10000
100000

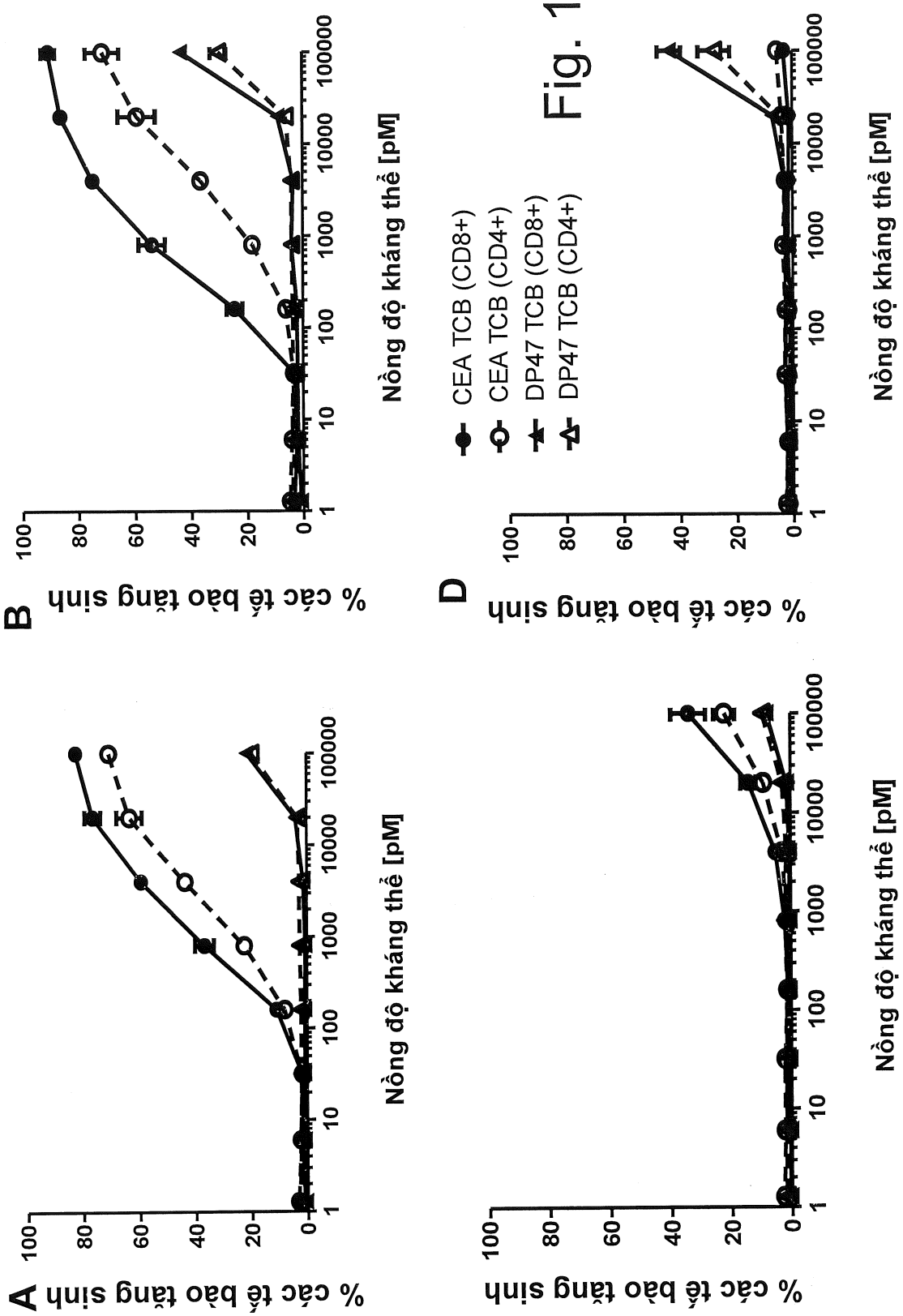
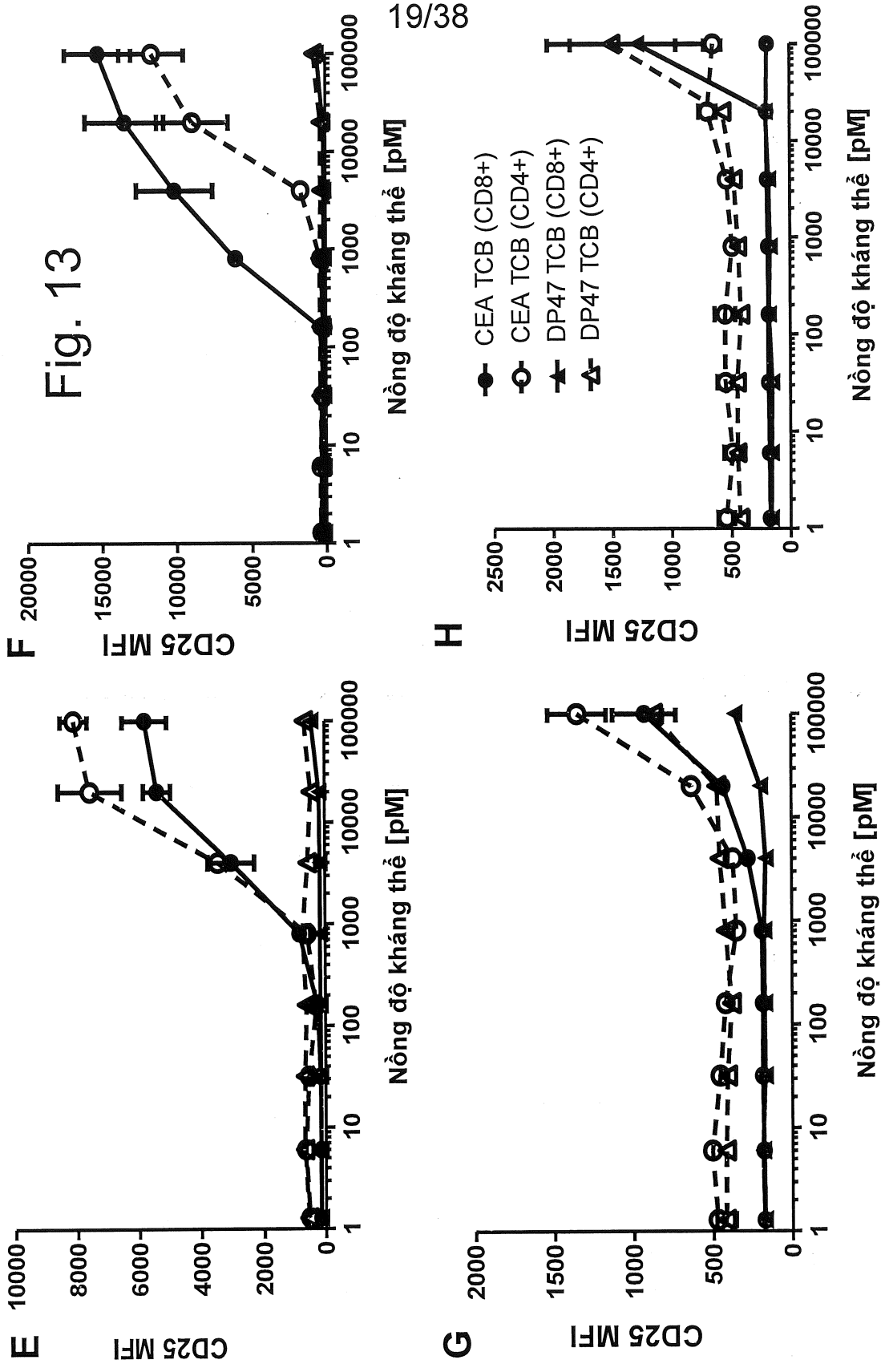

A
B
C
D
% các tế bào tăng sinh
Nồng độ kháng thể [pM]
CEA TCB (CD8+)
CEA TCB (CD4+)
DP47 TCB (CD8+)
DP47 TCB (CD4+)

Fig. 13

Fig. 13


E
CD25 MFI
Nồng độ kháng thể [pM]
F
CD25 MFI
Nồng độ kháng thể [pM]
G
CD25 MFI
Nồng độ kháng thể [pM]
H
CD25 MFI
Nồng độ kháng thể [pM]
CEA TCB (CD8+)
CEA TCB (CD4+)
DP47 TCB (CD8+)
DP47 TCB (CD4+)

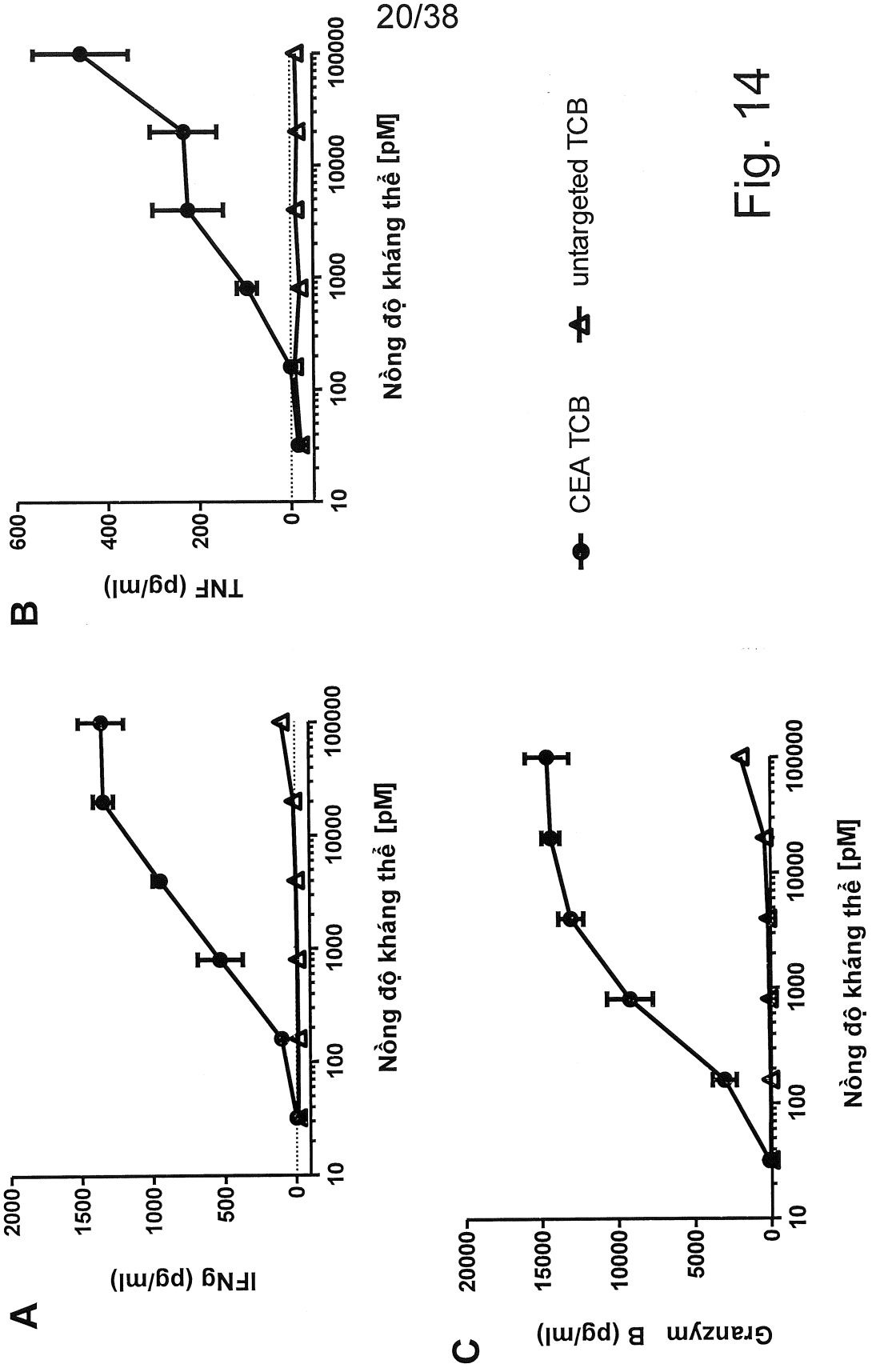

A
IFNg (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
10
100
1000
10000
100000
Nồng độ kháng thể [pM]
B
TNF (pg/ml)
600
400
200
0
10
100
1000
10000
100000
Nồng độ kháng thể [pM]
CEA TCB
untargeted TCB
C
Granzym B (pg/ml)
20000
15000
10000
5000
0
10
100
1000
10000
100000
Nồng độ kháng thể [pM]

Fig. 14

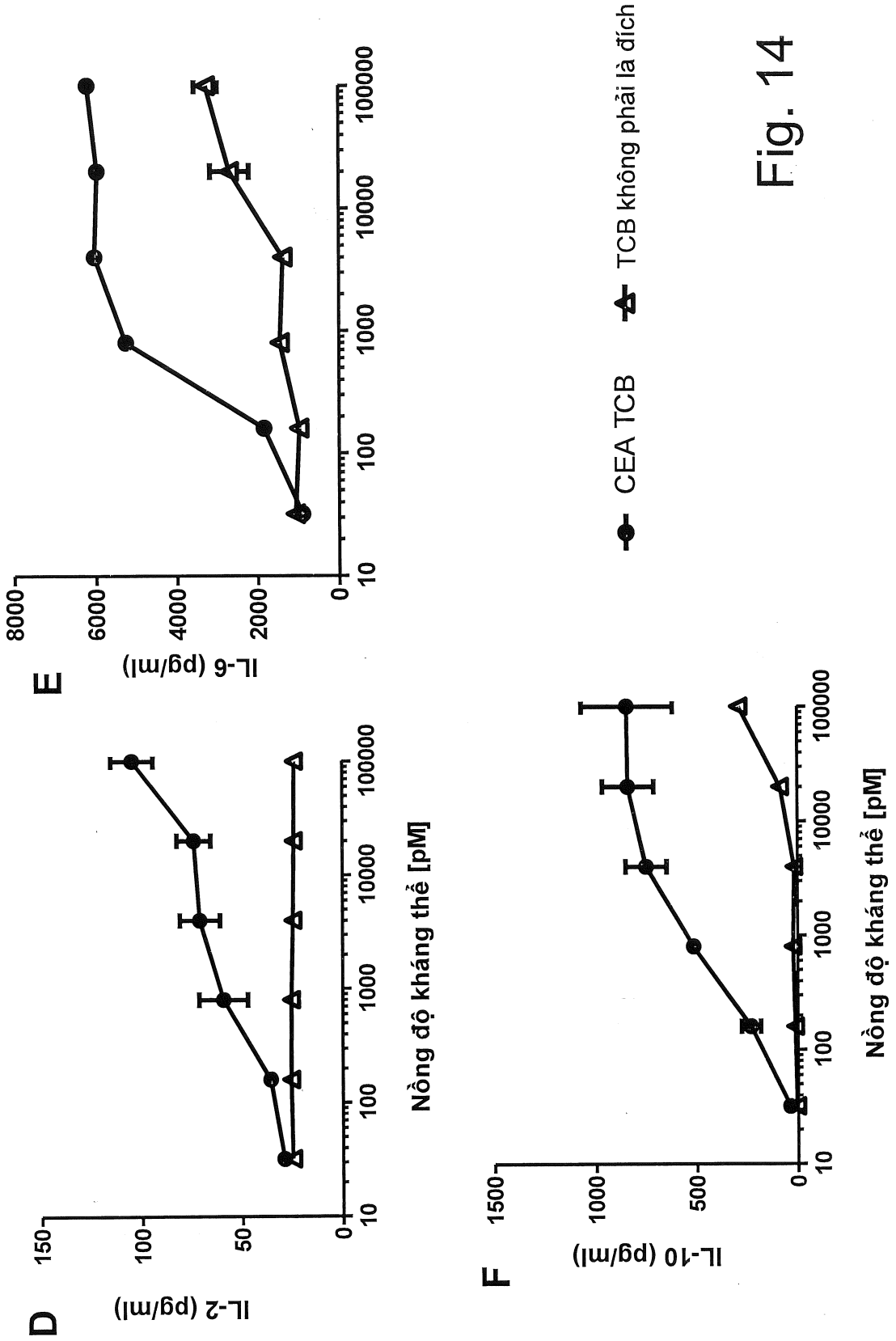

D
IL-2 (pg/ml)
150
100
50
0
10
100
1000
10000
100000
Nồng độ kháng thể [pM]
E
IL-6 (pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
10
100
1000
10000
100000
CEA TCB
TCB không phải là đích
F
IL-10 (pg/ml)
1500
1000
500
0
10
100
1000
10000
100000
Nồng độ kháng thể [pM]

Fig. 14

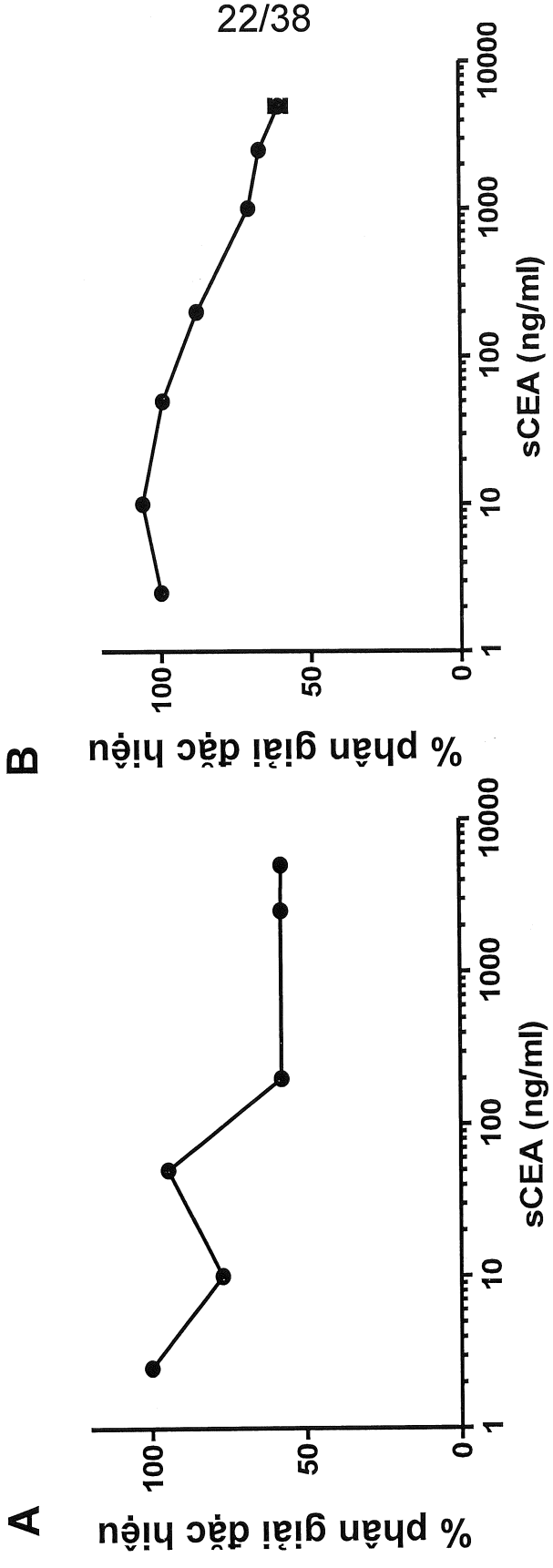
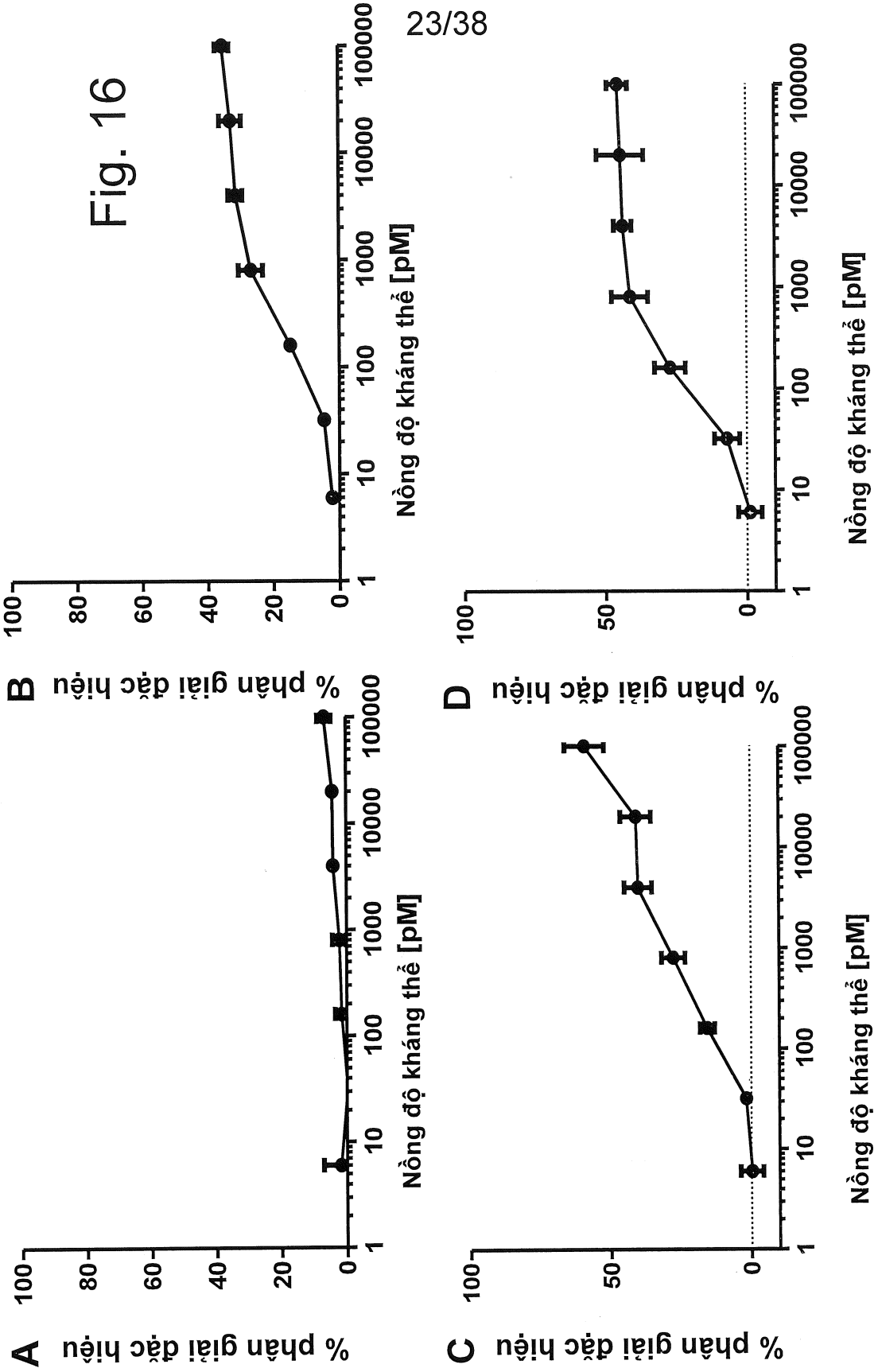

A
% phân giải độc hiện
100
50
0
1
10
100
1000
10000
sCEA (ng/ml)
B
% phân giải độc hiện
100
50
0
1
10
100
1000
10000
sCEA (ng/ml)

Fig. 15

Fig. 16


A
% phân giải đặc hiệu
Nồng độ kháng thể [pM]
B
% phân giải đặc hiệu
Nồng độ kháng thể [pM]
C
% phân giải đặc hiệu
Nồng độ kháng thể [pM]
D
% phân giải đặc hiệu
Nồng độ kháng thể [pM]

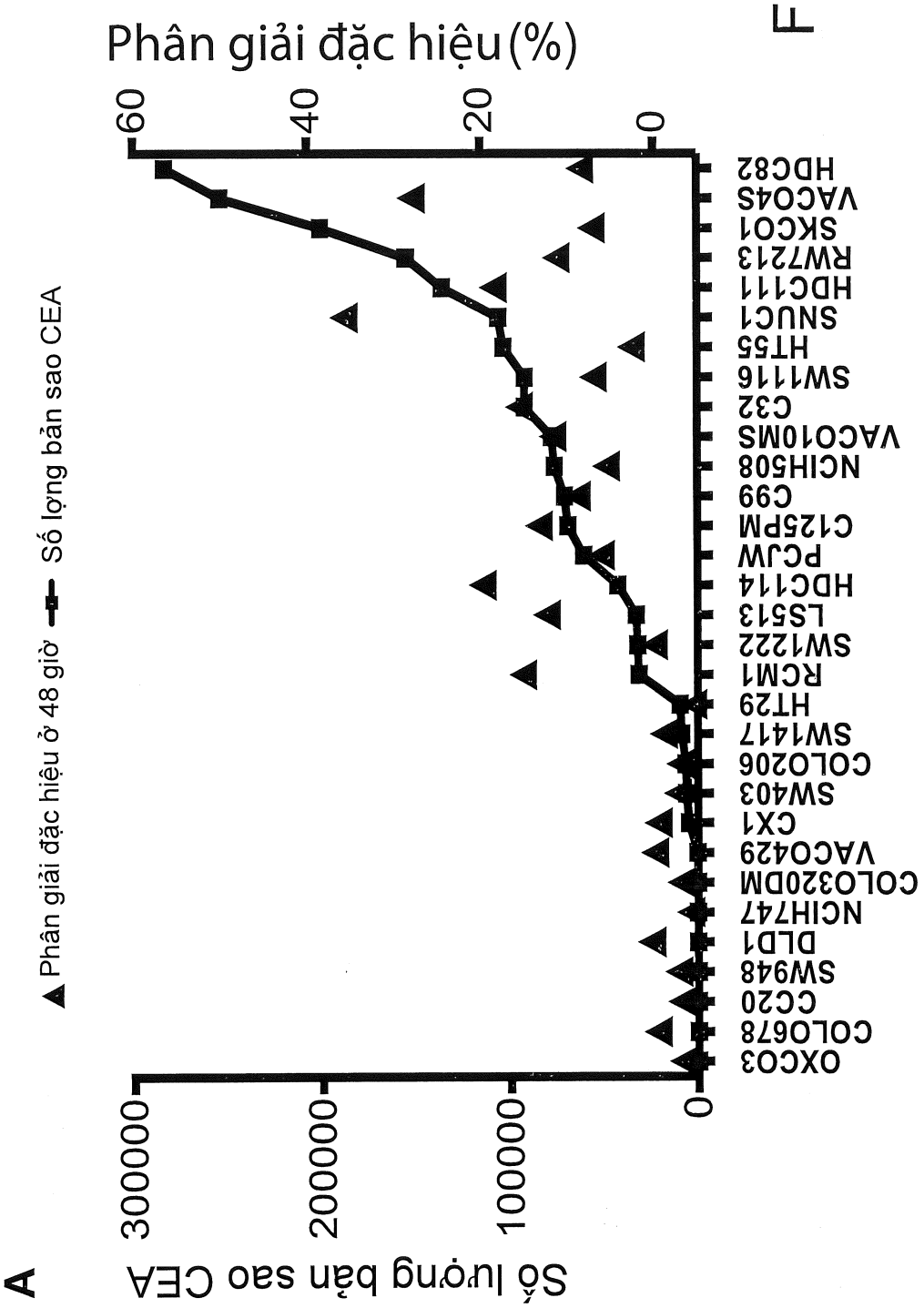

A
Số lượng bản sao CEA
300000
200000
100000
0
Phân giải đặc hiệu (%)
60
40
20
0
▲ Phân giải đặc hiệu ở 48 giờ — Số lượng bản sao CEA
OXCO3
COLO678
CC20
SW948
DLD1
NCIH747
COLO320DM
VACO429
CX1
SW403
COLO206
SW1417
HT29
RCM1
SW1222
LS513
HDC114
PCJW
C125PM
C99
NCIH508
VACO10MS
C32
SW1116
HT55
SNUC1
HDC111
RW7213
SKCO1
VACO4S
HDC82

Fig. 17

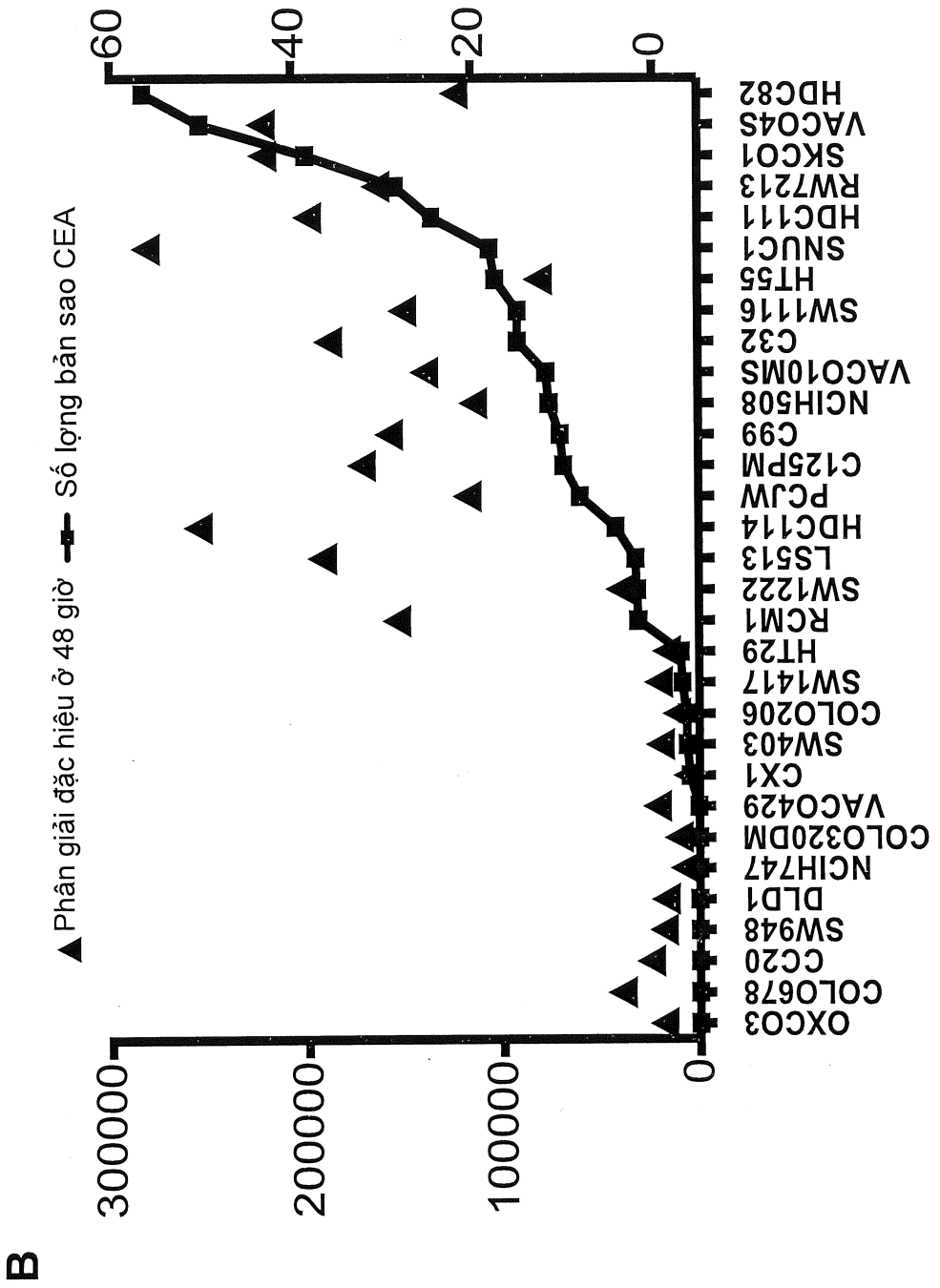

B
▲Phân giải đặc hiệu ở 48 giờ
Số lợng bản sao CEA
300000
200000
100000
0
60
40
20
0
OXCO3
COLO678
CC20
SW948
DLD1
NCIH747
COLO320DM
VACO429
CX1
SW403
COLO206
SW1417
HT29
RCM1
SW1222
LS513
HDC114
PCJW
C125PM
C99
NCIH508
VACO10MS
C32
SW1116
HT55
SNUC1
HDC111
RW7213
SKCO1
VACO4S
HDC82

Fig. 17

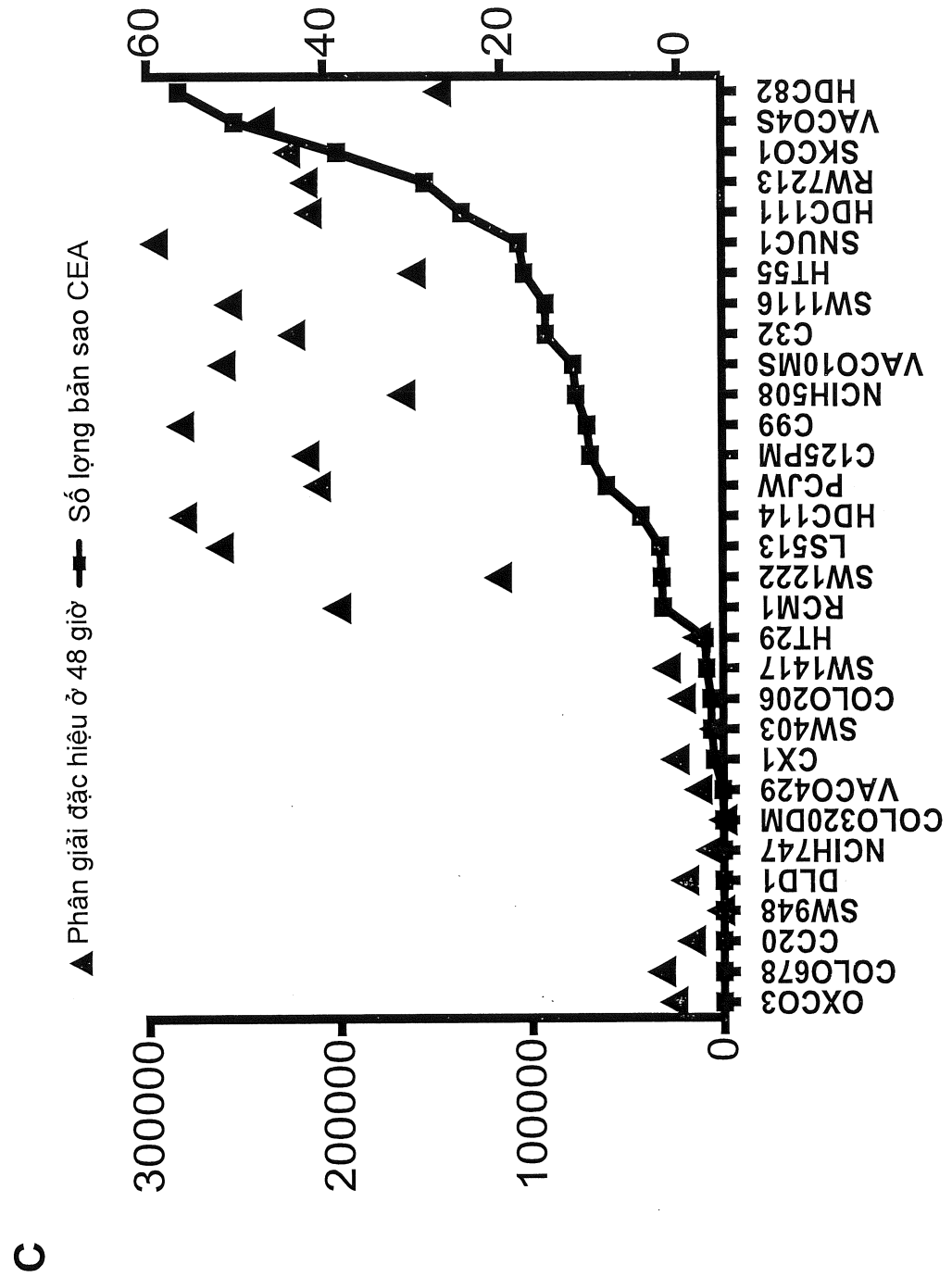
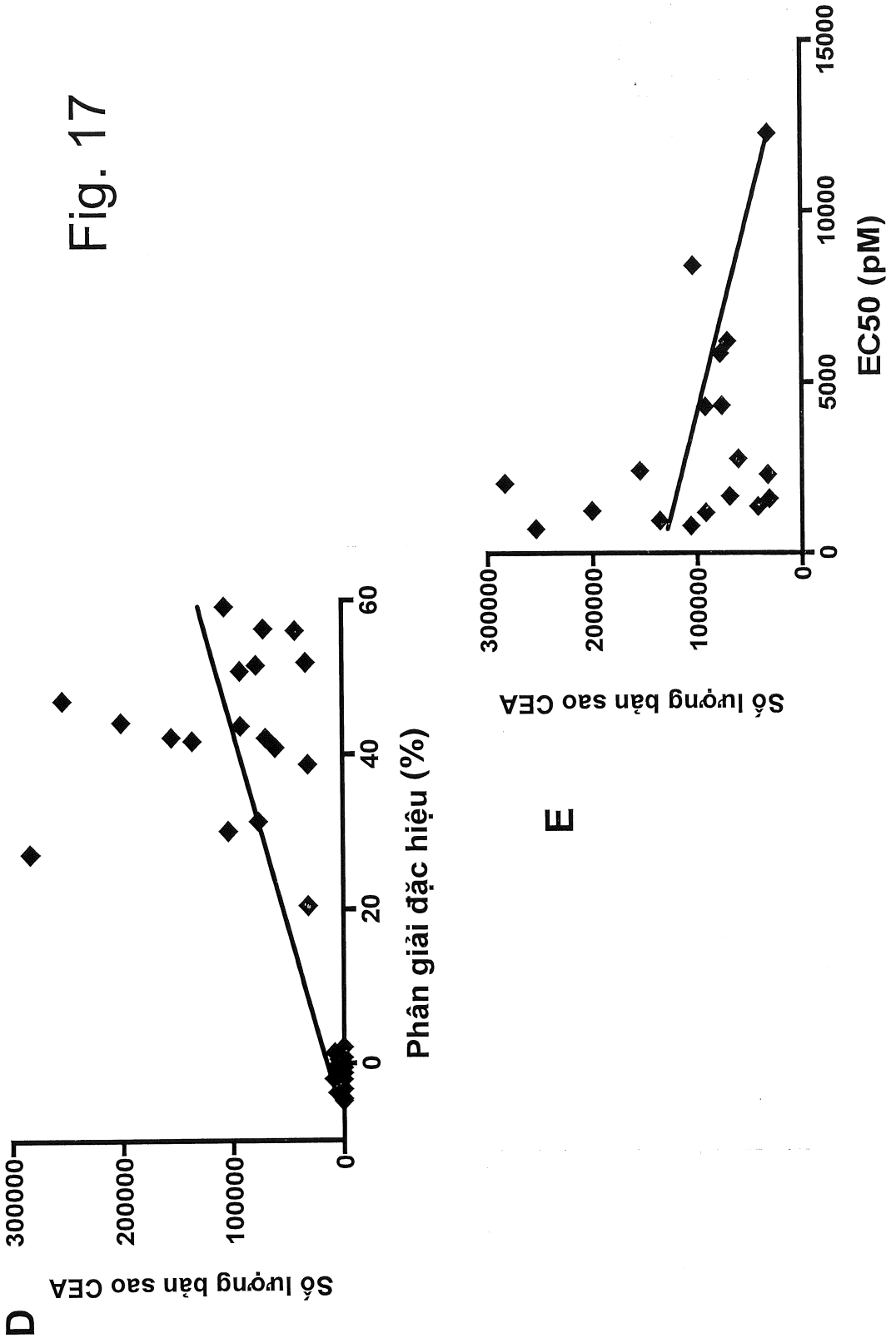

C
▲ Phân giải đặc hiệu ở 48 giờ — Số lợng bản sao CEA
300000
200000
100000
0
60
40
20
0
OXCO3
COLO678
CC20
SW948
DLD1
NCIH747
COLO320DM
VACO429
CX1
SW403
COLO206
SW1417
HT29
RCM1
SW1222
LS513
HDC114
PCJW
C125PM
C99
NCIH508
VACO10MS
C32
SW1116
HT55
SNUC1
HDC111
RW7213
SKCO1
VACO4S
HDC82

Fig. 17

Fig. 17


D
Số lượng bản sao CEA
300000
200000
100000
0
0
20
40
60
Phân giải đặc hiệu (%)
E
Số lượng bản sao CEA
300000
200000
100000
0
0
5000
10000
15000
EC50 (pM)

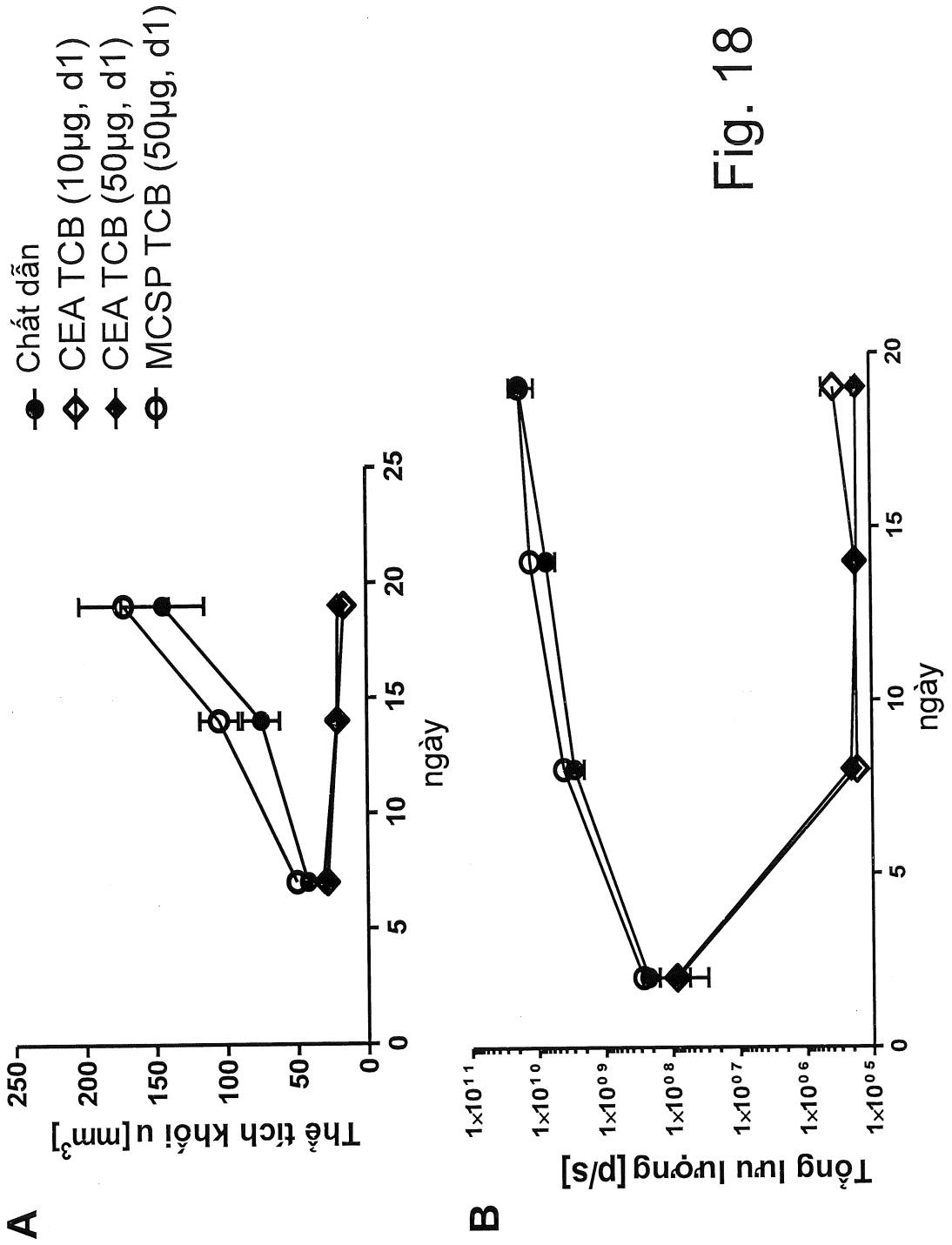

A
Thể tích khối u [mm³]
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
ngày
Chất dẫn
CEA TCB (10µg, d1)
CEA TCB (50µg, d1)
MCSP TCB (50µg, d1)
B
Tổng lượng [p/s]
1×10¹¹
1×10¹⁰
1×10⁹
1×10⁸
1×10⁷
1×10⁶
1×10⁵
0
5
10
15
20
ngày

Fig. 18

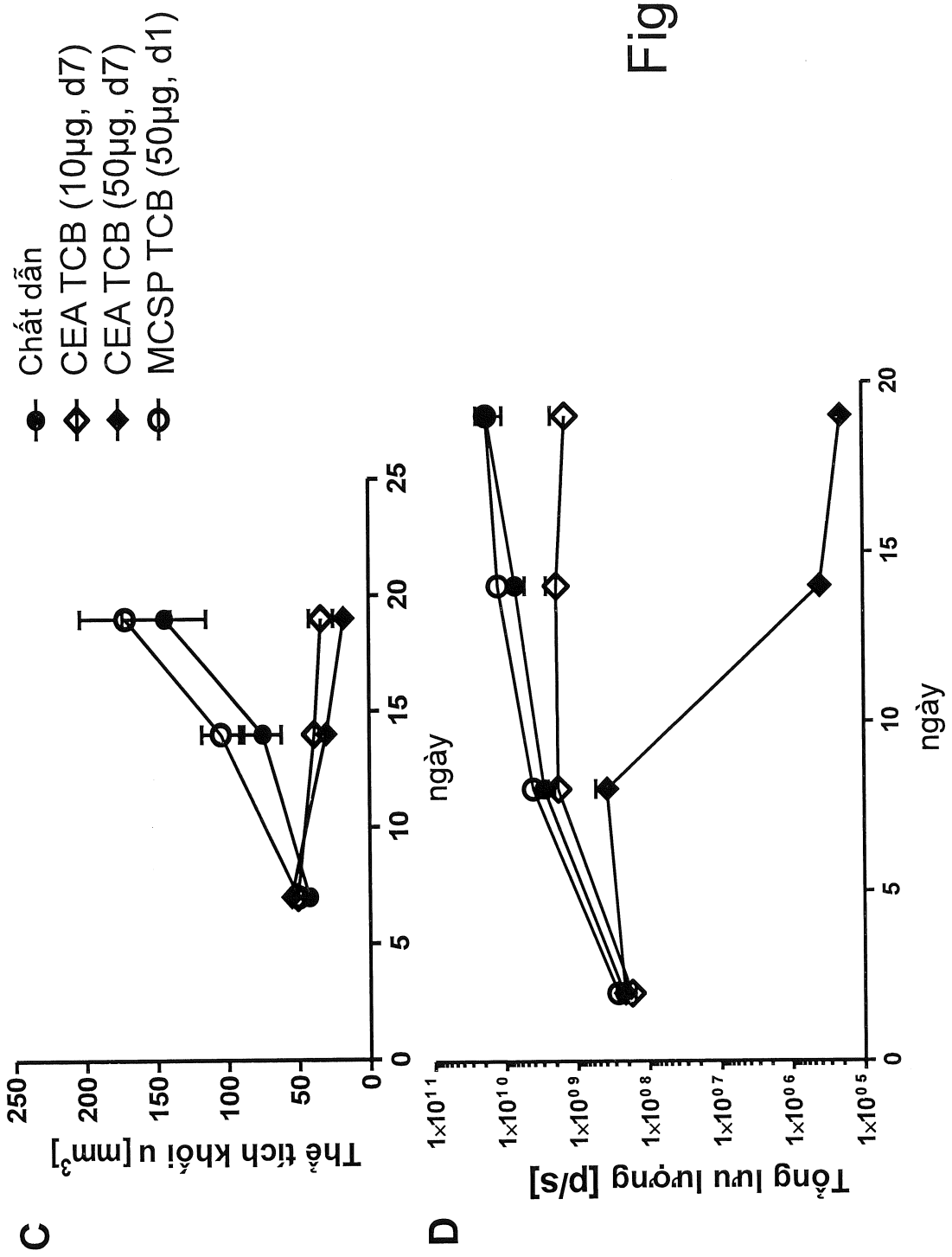

C
Thể tích khối u [mm³]
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
ngày
Chất dẫn
CEA TCB (10µg, d7)
CEA TCB (50µg, d7)
MCSP TCB (50µg, d1)
D
Tổng lượng lượng [p/s]
1x10¹¹
1x10¹⁰
1x10⁹
1x10⁸
1x10⁷
1x10⁶
1x10⁵
0
5
10
15
20
ngày

Fig. 18

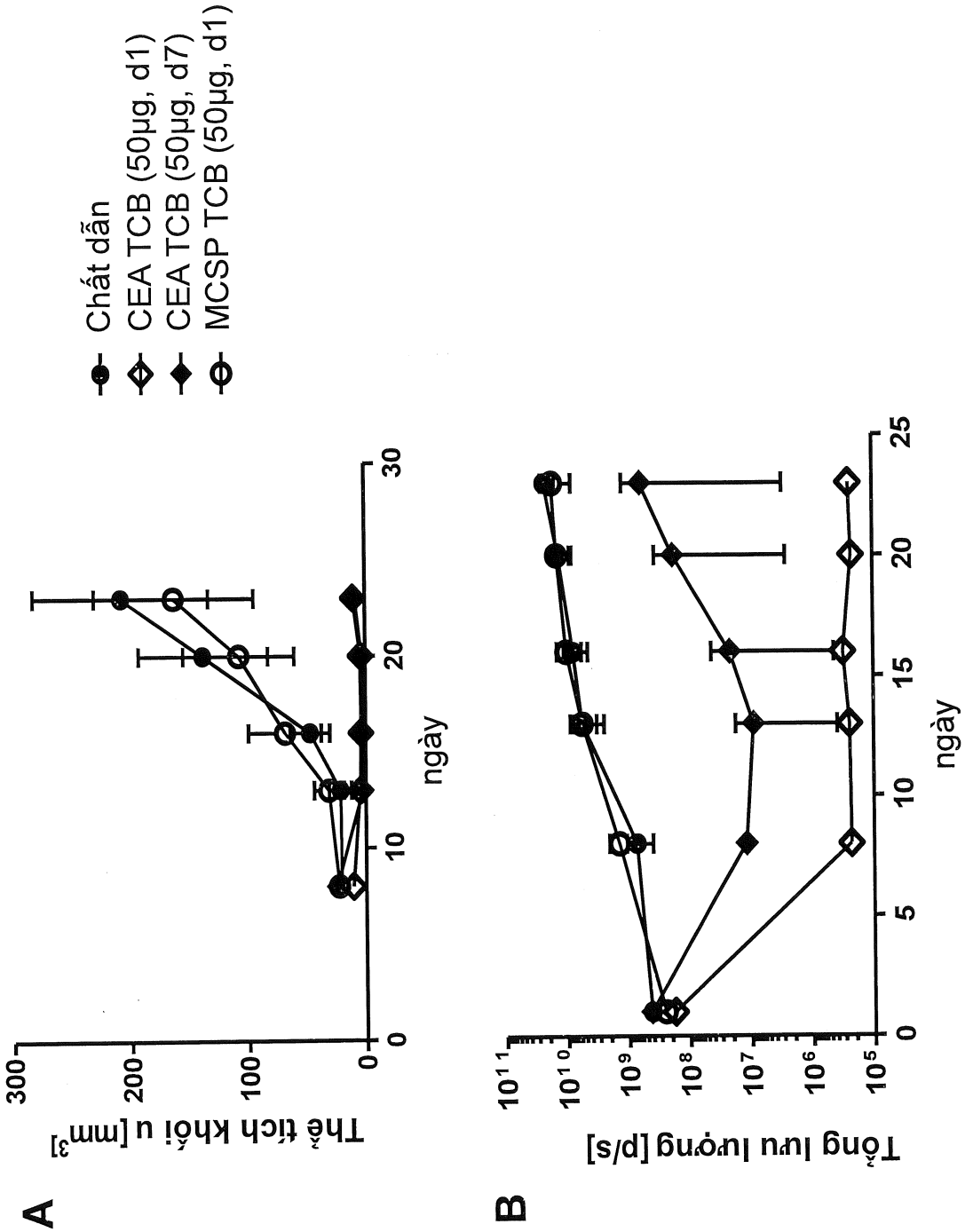
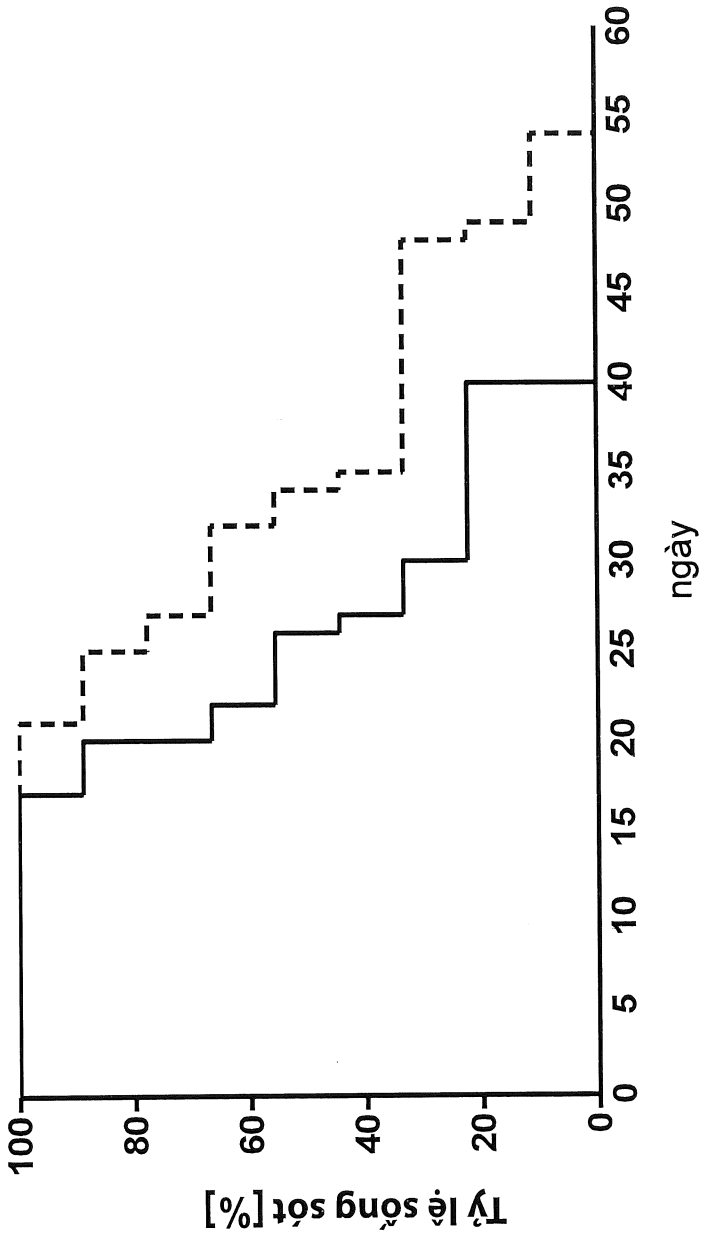

A
Thể tích khối u [mm3]
300
200
100
0
0
10
20
30
ngày
Chất dẫn
CEA TCB (50µg, d1)
CEA TCB (50µg, d7)
MCSP TCB (50µg, d1)
B
Tổng lượng [p/s]
10^11
10^10
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0
5
10
15
20
25
ngày

Fig. 19

Fig. 20


Chất dẫn
CEA TCB (d8)
Tỷ lệ sống sót [%]
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
ngày

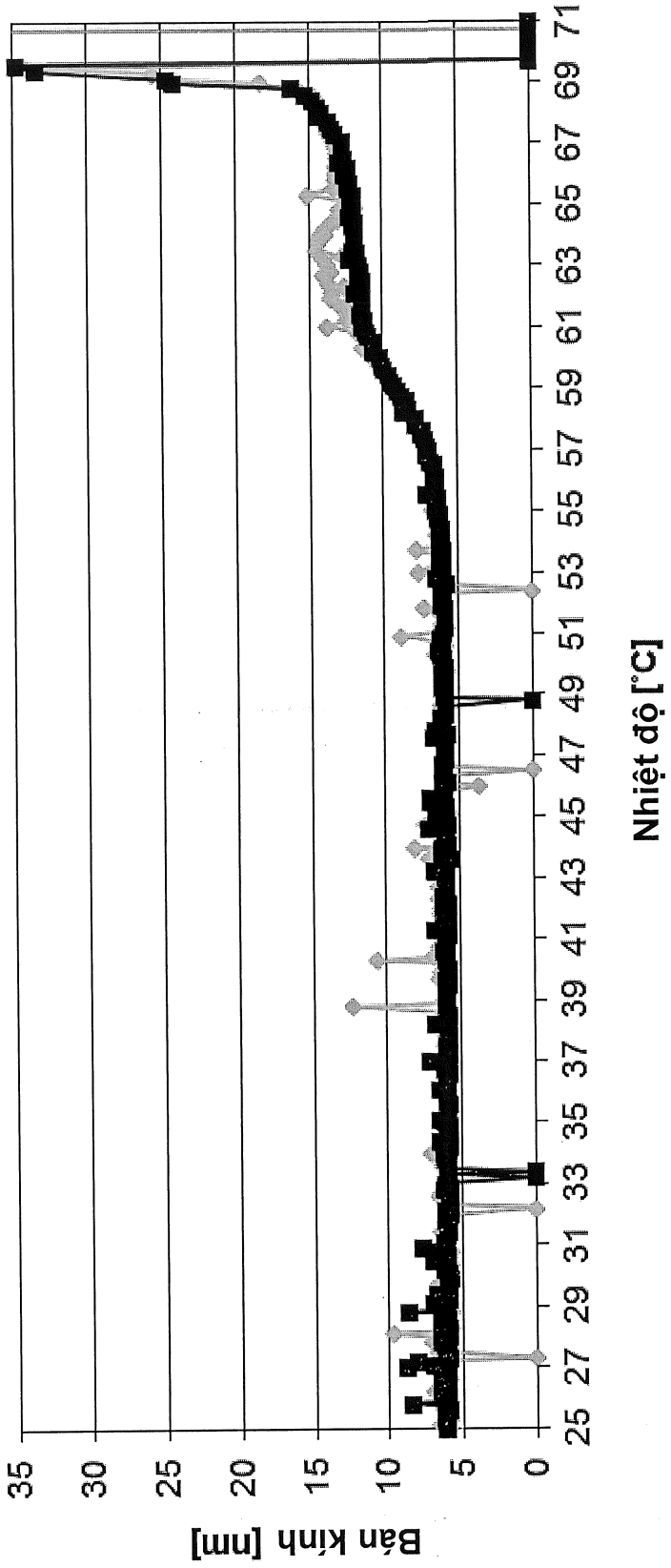

Bán kính [nm]
35
30
25
20
15
10
5
0
Nhiệt độ [°C]
25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67 69 71

Fig. 21

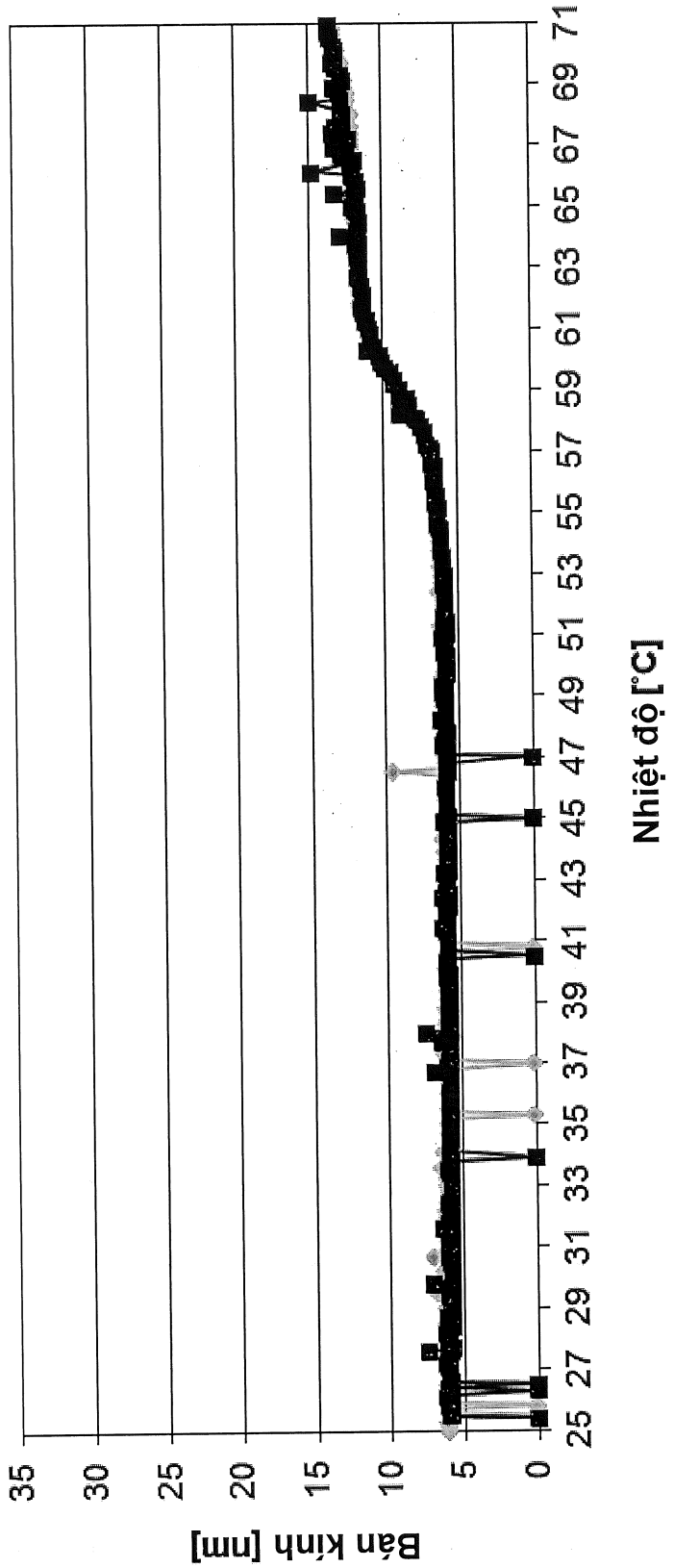

Bán kính [nm]
35
30
25
20
15
10
5
0
Nhiệt độ [°C]
25 27 29 31 33 35 37 39 41 43 45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65 67 69 71

Fig. 22

Fig. 23

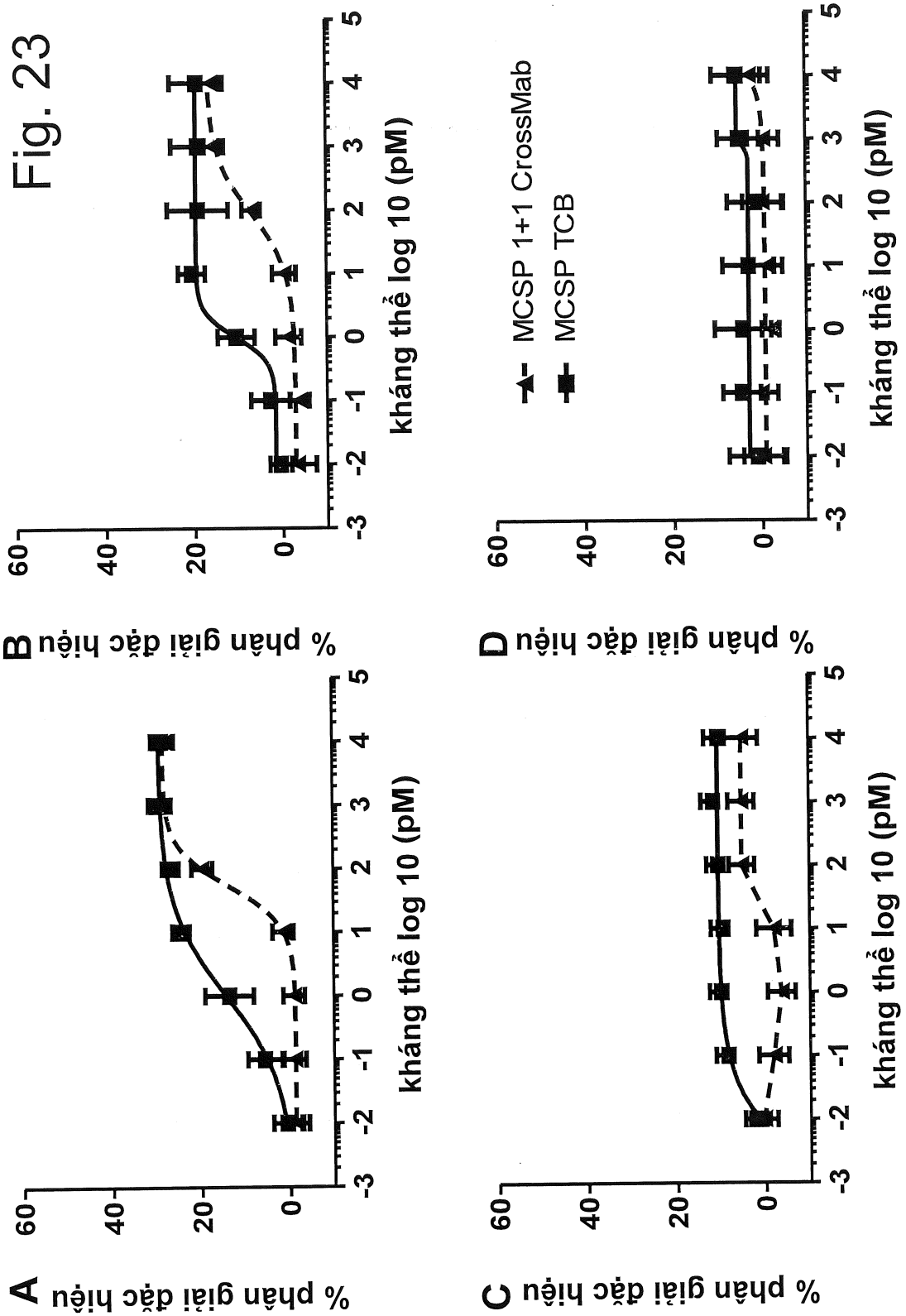

A
% phân giải đặc hiệu
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
kháng thể log 10 (pM)
B
% phân giải đặc hiệu
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
kháng thể log 10 (pM)
C
% phân giải đặc hiệu
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
kháng thể log 10 (pM)
D
% phân giải đặc hiệu
MCSP 1+1 CrossMab
MCSP TCB
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
kháng thể log 10 (pM)

Fig. 23

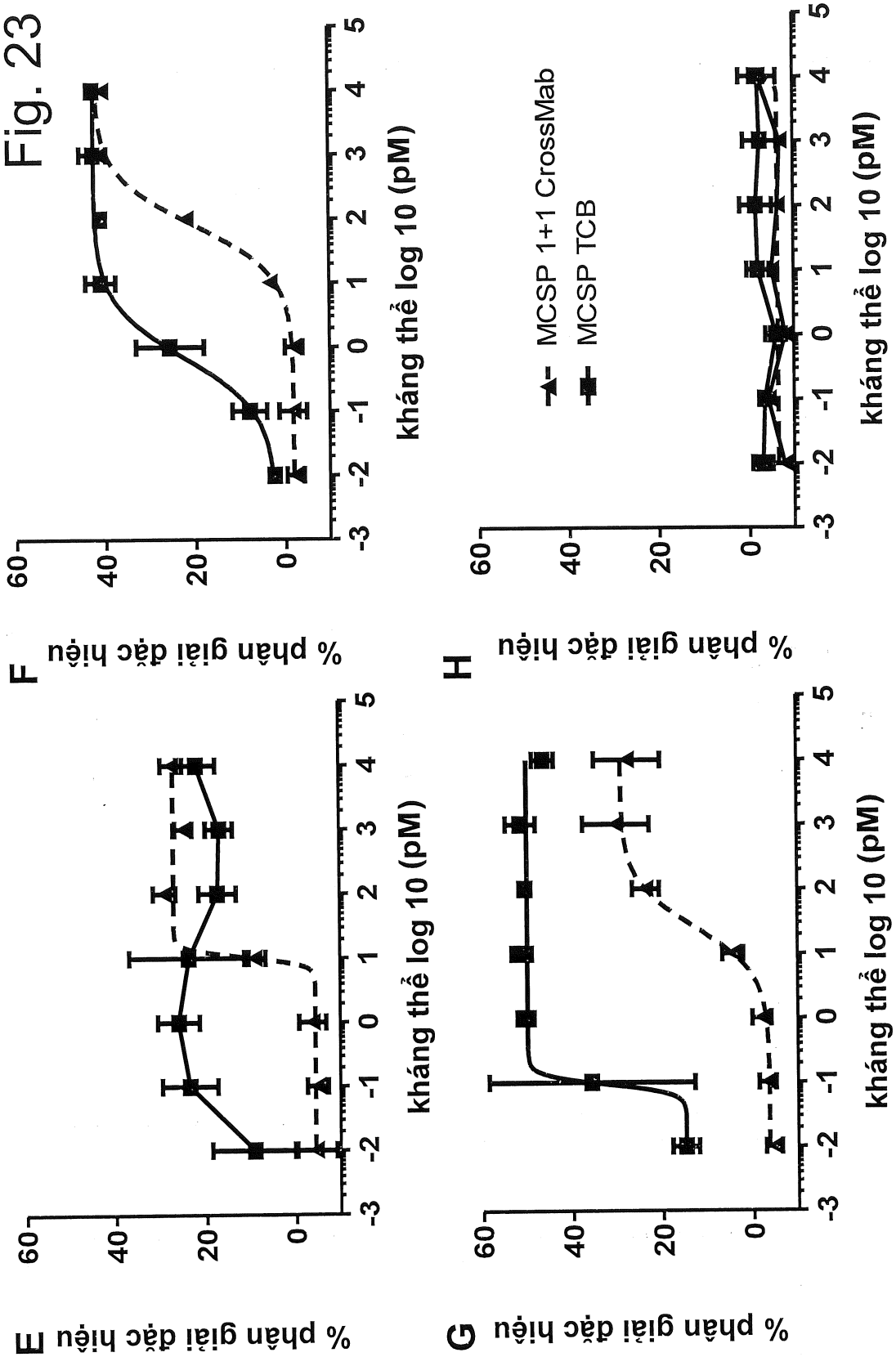

E
% phân giải đặc hiệu
kháng thể log 10 (pM)
F
% phân giải đặc hiệu
kháng thể log 10 (pM)
G
% phân giải đặc hiệu
kháng thể log 10 (pM)
H
% phân giải đặc hiệu
kháng thể log 10 (pM)
MCSP 1+1 CrossMab
MCSP TCB

Fig. 24

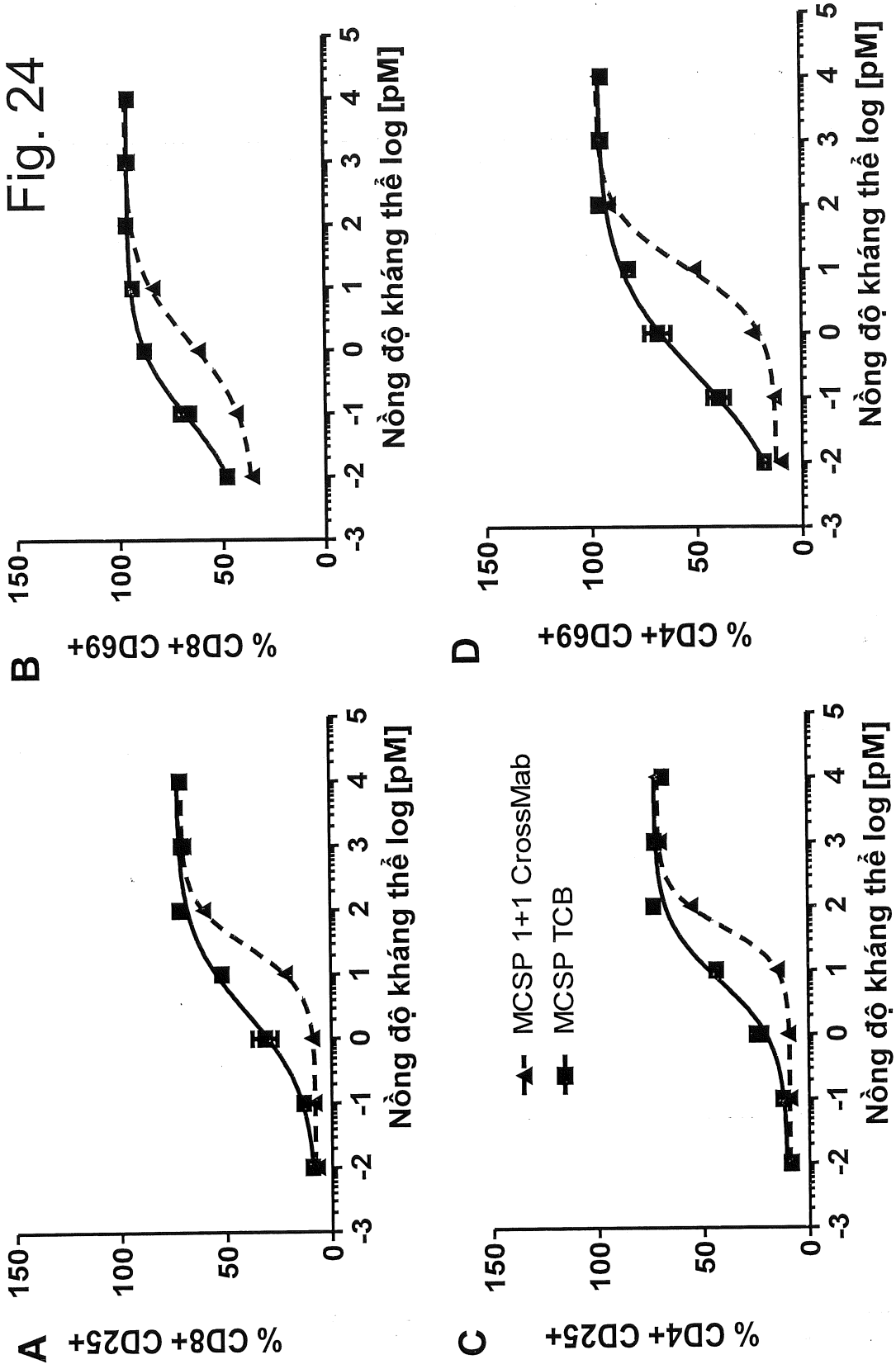
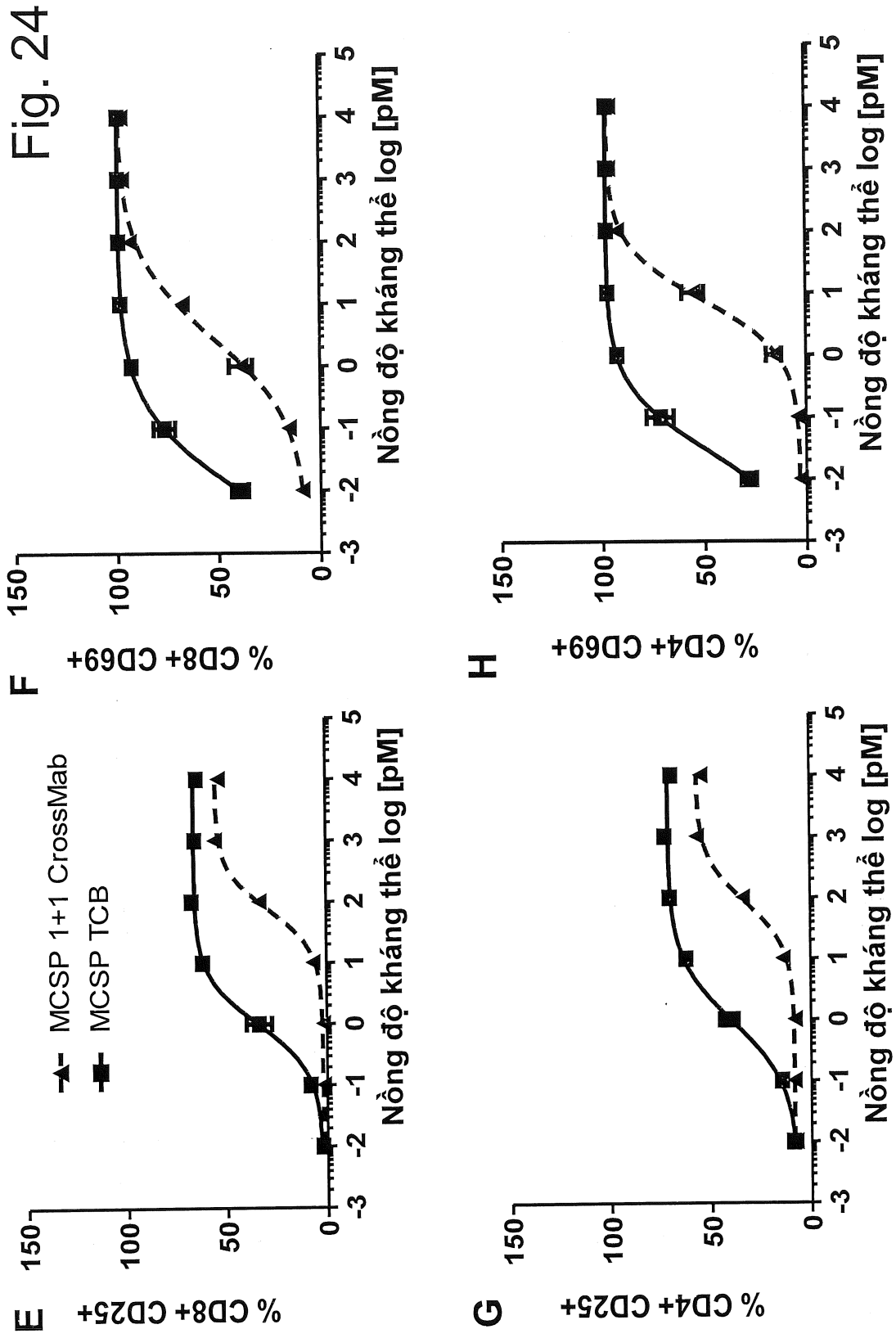

A
% CD8+ CD25+
B
% CD8+ CD69+
C
% CD4+ CD25+
D
% CD4+ CD69+
150
100
50
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
Nồng độ kháng thể log [pM]
MCSP 1+1 CrossMab
MCSP TCB

Fig. 24


E
% CD8+ CD25+
F
% CD8+ CD69+
G
% CD4+ CD25+
H
% CD4+ CD69+
MCSP 1+1 CrossMab
MCSP TCB
Nồng độ kháng thể log [pM]
150
100
50
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5

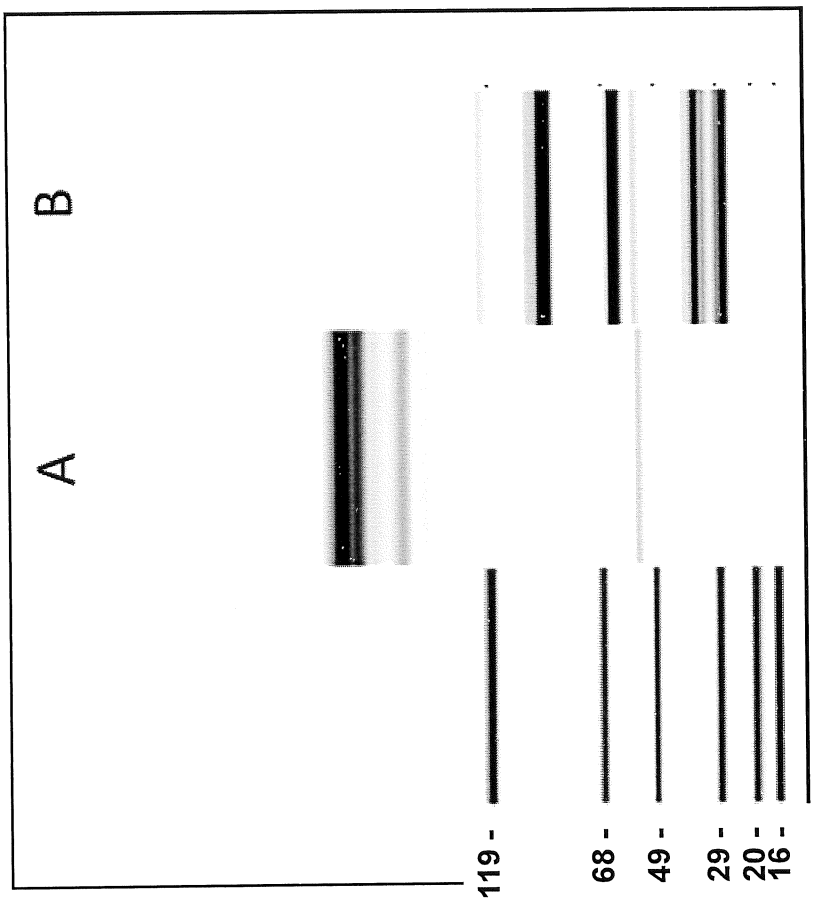


Fig. 25

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Roche Glycart AG

<120> PHÂN TỬ GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN ĐẶC HIỆU KÉP HOẠT HOÁ TẾ BÀO T VÀ POLYPEPTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP MÃ HÓA PHÂN TỬ NÀY

<130> 31447

<150> EP 13156686.1
<151> 2013-02-26

<160> 122

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 455
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 1

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 Thr Tyr
20 25 30

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

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

```
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
            180                 185                 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
        195                 200                 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
    210                 215                 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
        275                 280                 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
            340                 345                 350
```

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 2
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 2

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
100 105 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 3
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 3

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 Thr Tyr
20 25 30

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

35 40 45

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 4

Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 5

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

Val Lys Gly

<210> 6
<211> 14

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR3 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 6

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 7

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 8

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 9

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 10

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 11
<211> 442
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC MCSP M4-3 (C1)$

<400> 11

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

```
Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65                  70                  75                  80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
        115                 120                 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
            180                 185                 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
                245                 250                 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
```

275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
340 345 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC MCSP ML2 (G3)

<400> 12

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

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH MCSP M4-3 (C1)

<400> 13

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 MCSP M4-3 (C1)

<400> 14

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 MCSP M4-3 (C1)

<400> 15

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

<210> 16
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR3 MCSP M4-3 (C1)

<400> 16

Phe Asp Tyr
1

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL MCSP ML2 (G3)

<400> 17

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 18

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

<220>
<223> LCDR1 MCSP ML2 (G3)

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 MCSP ML2 (G3)

<400> 19

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 MCSP ML2 (G3)

<400> 20

Gln Gln Tyr Ser Ala Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 21
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC CEA CH1A1A 98-99

<400> 21

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

```
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                405                 410                 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro Gly Lys
    450
```

<210> 22
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CEA 2F1

<400> 22

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 Ala Ala Val Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 23
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH CEA CH1A1A 98-99

<400> 23

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 CEA CH1A1A 98-99

<400> 24

Glu Phe Gly Met Asn
1 5

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 CEA CH1A1A 98-99

<400> 25

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR3 CEA CH1A1A 98-99

<400> 26

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 27
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL CEA 2F1

<400> 27

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 Ala Ala Val Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 CEA 2F1

<400> 28

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 CEA 2F1

<400> 29

Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
1 5

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 CEA 2F1

<400> 30

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 31
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL CD3 CH2527 (VL_7-43(11))

<400> 31

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val
65 70 75 80

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser
100 105 110

<210> 32
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH CD3 CH2527 (VHcomboA49SV93A)

<400> 32

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 Thr Tyr
20 25 30

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

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 33
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH CD3 CH2527 (VHcomboA49SV93AR94K)

<400> 33

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 Thr Tyr
20 25 30

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

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Lys His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 34
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH MCSP M4-3 (D6)

<400> 34

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

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

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

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

<220>
<223> HCDR2 MCSP M4-3 (D6)

<400> 35

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

<210> 36
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH MCSP M4-3 (A7)

<400> 36

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Asp Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

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

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 MCSP M4-3 (A7)

<400> 37

Asp Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 MCSP M4-3 (A7)

<400> 38

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

<210> 39
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH MCSP M4-3 (B7)

<400> 39

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ile Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 MCSP M4-3 (B7)

<400> 40

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

<210> 41
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH MCSP M4-3 (B8)

<400> 41

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

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

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 42
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH MCSP M4-3

<400> 42

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
            20                  25                  30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Ile Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
    50                  55                  60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65                  70                  75                  80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL MCSP ML2 (E10)

<400> 43

```
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 Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
```

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 MCSP ML2 (E10)

<400> 44

Arg Ala Ser Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 MCSP ML2 (E10)

<400> 45

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL MCSP ML2 (E10-G3)

<400> 46

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 Tyr Gly Ile Arg Gly Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 47
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL MCSP ML2 (C5)

<400> 47

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 Arg Gly Ile Arg Glu Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 48

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

<220>
<223> LCDR1 MCSP ML2 (C5)

<400> 48

Arg Ala Ser Arg Gly Ile Arg Glu Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 MCSP ML2 (C5)

<400> 49

Tyr Thr Gly Ser Leu His Ser
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 MCSP ML2 (C5)

<400> 50

Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 51
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL MCSP ML2 (C5-G3)

<400> 51

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 Arg Gly Ile Arg Glu Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 52
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL MCSP ML2

<400> 52

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 53
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 53

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
115 120 125

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
180 185 190

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 54
<211> 685
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(nốt phồng) P329GLALA

<400> 54

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

```
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
            180                 185                 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    210                 215                 220

Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
225                 230                 235                 240

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
                245                 250                 255

Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
            260                 265                 270

Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
        275                 280                 285

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
    290                 295                 300

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
305                 310                 315                 320

Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser
                325                 330                 335

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
            340                 345                 350

Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        355                 360                 365
```

```
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    370                 375                 380

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
385                 390                 395                 400

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                405                 410                 415

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            420                 425                 430

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        435                 440                 445

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
    450                 455                 460

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
465                 470                 475                 480

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                485                 490                 495

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
            500                 505                 510

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        515                 520                 525

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    530                 535                 540

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
545                 550                 555                 560

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                565                 570                 575

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys
            580                 585                 590
```

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
595 600 605

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
610 615 620

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
625 630 635 640

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
645 650 655

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
660 665 670

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675 680 685

<210> 55
<211> 442
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - Fc(lỗ) P329GLALA

<400> 55

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Thr Phe Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

```
Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
        115                 120                 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145                 150                 155                 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
                165                 170                 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
            180                 185                 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
        195                 200                 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225                 230                 235                 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
                245                 250                 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
            260                 265                 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
        275                 280                 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
    290                 295                 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305                 310                 315                 320
```

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
340 345 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 56
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 56

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
115 120 125

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
180 185 190

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 57
<211> 694
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA CH1A1A 98/99 - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(nốt phồng) P329GLALA

<400> 57

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe

20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
225 230 235 240

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
245 250 255

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val
260 265 270

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser
275 280 285

Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
290 295 300

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
305 310 315 320

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His
325 330 335

Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
340 345 350

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
355 360 365

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
370 375 380

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
385 390 395 400

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
405 410 415

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
420 425 430

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
435 440 445

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
450 455 460

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
465 470 475 480

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
485 490 495

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
500 505 510

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
515 520 525

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
530 535 540

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
545 550 555 560

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
565 570 575

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
580 585 590

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
595 600 605

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
610 615 620

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
625 630 635 640

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
645 650 655

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
660 665 670

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
675 680 685

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690

<210> 58
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA CH1A1A 98/99 (VH-CH1) - Fc(lỗ) P329GLALA

<400> 58

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

```
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
                405                 410                 415
```

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 59
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC DP47 GS

<400> 59

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 60
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 60

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
115 120 125

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
180 185 190

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 61
<211> 688
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DP47 GS (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(nốt phồng) P329GLALA

<400> 61

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            100                 105                 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
        115                 120                 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    130                 135                 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145                 150                 155                 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
                165                 170                 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
            180                 185                 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
        195                 200                 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser
    210                 215                 220

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
225                 230                 235                 240

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
                245                 250                 255

Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
            260                 265                 270

Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala
        275                 280                 285

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
```

290 295 300

Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
305 310 315 320

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser
325 330 335

Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
340 345 350

Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
355 360 365

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
370 375 380

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
385 390 395 400

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
405 410 415

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
420 425 430

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
435 440 445

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr
450 455 460

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
465 470 475 480

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
485 490 495

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
500 505 510

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
515 520 525

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
530 535 540

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
545 550 555 560

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
565 570 575

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
580 585 590

Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
595 600 605

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
610 615 620

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
625 630 635 640

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
645 650 655

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
660 665 670

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675 680 685

<210> 62
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DP47 GS (VH-CH1) - Fc(lỗ) P329GLALA

<400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 63
<211> 1365
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 63
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt catctgctag caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 420

aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480

ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540

gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600

ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660

aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct 720

gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg 780

atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840

gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960

tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1020

gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080

ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1140

tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200

accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1260

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaa 1365

<210> 64
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 64
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtcctaggt caacccaagg ctgcccccag cgtgaccctg 360

ttcccccca gcagcgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatcagc 420

gacttctacc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggccg acagcagccc cgtgaaggcc 480

ggcgtggaga ccaccacccc cagcaagcag agcaacaaca agtacgccgc cagcagctac 540

ctgagcctga cccccgagca gtggaagagc cacaggtcct acagctgcca ggtgacccac 600

gagggcagca ccgtggagaa aaccgtggcc cccaccgagt gcagc 645

<210> 65
<211> 375
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 65
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt catct 375

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

<220>
<223> HCDR1 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 66

acctacgcca tgaac 15

<210> 67
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 67
cggatcagaa gcaagtacaa caactacgcc acctactacg ccgacagcgt gaagggc 57

<210> 68
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR3 CD3 CH2527 (VH_3-23(12))

<400> 68
cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct ac 42

<210> 69
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 69
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtccta 327

<210> 70
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 70
ggcagttcta caggcgccgt gaccaccagc aactacgcca ac 42

<210> 71
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 71
ggcaccaaca agagagcccc t 21

<210> 72
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 CD3 CH2527 (VL_7-46(13))

<400> 72
gccctgtggt acagcaacct gtgggtg 27

<210> 73
<211> 1326
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC MCSP M4-3 (C1)

<400> 73
caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60

acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120

caccccggca agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac 180

aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240

ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac 300

tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc 360

ttcccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg 420

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 480

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 540

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag 600

cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca 660

tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca 720

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 780

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960

aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1020

ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1080

acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 1200

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320

ggtaaa 1326

<210> 74
<211> 642
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC MCSP ML2 (G3)

<400> 74
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgcc gggccagcca gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcctagc 180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccattagctc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tactctgctc tgccgtggac cttcggccag 300

ggaacaaagg tggagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 75
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH MCSP M4-3 (C1)

<400> 75
caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60

acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120

caccccggca agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac 180

aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240

ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac 300

tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagc 336

<210> 76
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 MCSP M4-3 (C1)

<400> 76
agcggctatt attggaac 18

<210> 77
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 MCSP M4-3 (C1)

<400> 77
tacatcactt tcgacggctc taacaactac aaccccagcc tgaagtcc 48

<210> 78
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR3 MCSP M4-3 (C1)

<400> 78

ttcgactac 9

<210> 79
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL MCSP ML2 (G3)

<400> 79
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgcc gggccagcca gggcatccgg aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgcctagc 180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccattagctc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tactctgctc tgccgtggac cttcggccag 300

ggaacaaagg tggagatcaa g 321

<210> 80
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 MCSP ML2 (G3)

<400> 80
cgggccagcc agggcatccg gaactacctg aac 33

<210> 81
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 MCSP ML2 (G3)

<400> 81
tacaccagca gcctgcacag c 21

<210> 82
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 MCSP ML2 (G3)

<400> 82
cagcagtact ctgctctgcc gtggacc 27

<210> 83
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC CEA CH1A1A 98-99

<400> 83
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttcgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agcgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 84
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CEA 2F1

<400> 84
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtgc ggctgtgggt acgtatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaagggg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 85
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH CEA CH1A1A 98-99

<400> 85
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttcgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agc 363

<210> 86
<211> 15
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR1 CEA CH1A1A 98-99

<400> 86
gagttcggca tgaac 15

<210> 87
<211> 51
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR2 CEA CH1A1A 98-99

<400> 87
tggatcaaca ccaagaccgg cgaggccacc tacgtggaag agttcaaggg c 51

<210> 88
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HCDR3 CEA CH1A1A 98-99

<400> 88
tgggacttcg cctattacgt ggaagccatg gactac 36

<210> 89
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL CEA 2F1

<400> 89
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

atcacttgca aggccagtgc ggctgtgggt acgtatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120

gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaagggg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300

cagggcacca agctcgagat caag 324

<210> 90
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1 CEA 2F1

<400> 90
aaggccagtg cggctgtggg tacgtatgtt gcg 33

<210> 91
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2 CEA 2F1

<400> 91
tcggcatcct accgcaaaag g 21

<210> 92
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3 CEA 2F1

<400> 92
caccaatatt acacctatcc tctattcacg 30

<210> 93
<211> 642
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 93
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360

cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420

aaggattatt ttcctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480

gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540

acagtgccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600

agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

<210> 94
<211> 2055
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(nốt phồng) P329GLALA

<400> 94
caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60

acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120

caccccggca agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac 180

aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240

ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac 300

tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagcgcta gcacaaaggg ccccagcgtg 360

ttccctctgg cccctagcag caagagcaca tctggcggaa cagccgccct gggctgcctc 420

gtgaaggact actttcccga gcctgtgacc gtgtcctgga actctggcgc cctgacaagc 480

ggcgtgcaca cctttccagc cgtgctgcag agcagcggcc tgtactctct gagcagcgtg 540

gtcaccgtgc ctagcagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600

cccagcaaca ccaaagtgga caagaaggtg gagcccaaga gctgtgatgg cggaggaggg 660

tccggaggcg gaggatccga ggtgcagctg ctggaatctg gcggcggact ggtgcagcct 720

ggcggatctc tgagactgag ctgtgccgcc agcggcttca ccttcagcac ctacgccatg 780

aactgggtgc gccaggcccc tggcaaaggc ctggaatggg tgtcccggat cagaagcaag 840

tacaacaact acgccaccta ctacgccgac agcgtgaagg gccggttcac catcagccgg 900

gacgacagca agaacaccct gtacctgcag atgaacagcc tgcgggccga ggacaccgcc 960

gtgtactatt gtgtgcggca cggcaacttc ggcaacagct atgtgtcttg gtttgcctac 1020

tggggccagg gcaccctcgt gaccgtgtca agcgctagcg tggccgctcc ctccgtgttt 1080

atctttcccc catccgatga acagctgaaa agcggcaccg cctccgtcgt gtgtctgctg 1140

aacaattttt accctaggga agctaaagtg cagtggaaag tggataacgc actgcagtcc 1200

ggcaactccc aggaatctgt gacagaacag gactccaagg acagcaccta ctccctgtcc 1260

tccaccctga cactgtctaa ggctgattat gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 1320

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtgacaag 1380

acccacacct gtccccttg tcctgcccct gaagctgctg gcggcccttc tgtgttcctg 1440

ttcccccaa agcccaagga caccctgatg atcagccgga cccccgaagt gacctgcgtg 1500

gtggtggatg tgtcccacga ggaccctgaa gtgaagttca attggtacgt ggacggcgtg 1560

gaagtgcaca acgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 1620

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1680

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1740

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 1800

gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1860

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1920

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1980

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 2040

ctgtctccgg gtaaa 2055

<210> 95
<211> 1326
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MCSP M4-3 (C1) (VH-CH1) - Fc(lỗ) P329GLALA

<400> 95
caggtgcaat tgcaggaaag cggccctggc ctggtcaagc ccagccagac cctgagcctg 60

acctgcaccg tgtccggcgg cagcatcacc agcggctatt attggaactg gattcggcag 120

caccccggca agggcctgga atggatcggc tacatcactt tcgacggctc taacaactac 180

aaccccagcc tgaagtccag agtgaccatc agccgggaca ccagcaagaa ccagttcagc 240

ctgaagctgt ccagcgtgac agccgccgac accgccgtgt actactgcgc cgacttcgac 300

tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtg tccagcgcta gcaccaaggg cccctccgtg 360

ttcccccctgg cccccagcag caagagcacc agcggcggca cagccgctct gggctgcctg 420

gtcaaggact acttccccga gcccgtgacc gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc 480

ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag agttctggcc tgtatagcct gagcagcgtg 540

gtcaccgtgc cttctagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag 600

cccagcaaca ccaaggtgga caagaaggtg gagcccaaga gctgcgacaa aactcacaca 660

tgcccaccgt gcccagcacc tgaagctgca gggggaccgt cagtcttcct cttccccccа 720

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac 780

gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1020

ccacaggtgt gcaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctc 1080

tcgtgcgcag tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 1200

ctcgtgagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320

ggtaaa 1326

<210> 96
<211> 642
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 96
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360

cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420

aaggattatt ttcctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480

gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540

acagtgccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600

agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

<210> 97
<211> 2082
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA CH1A1A 98/99 - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(nốt phồng) P329GLALA

<400> 97
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggcc 120

cctggacagg gcctggaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accaccgaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttcgcctact atgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agtgctagca caaagggccc cagcgtgttc cctctggccc ctagcagcaa gagcacatct 420

ggcggaacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact ttcccgagcc cgtgacagtg 480

tcctggaact ctggcgccct gacaagcggc gtgcacacct ttccagccgt gctgcagagc 540

agcggcctgt actctctgag cagcgtggtc accgtgccta gctctagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa 660

cccaagagct gcgatggcgg aggcggctcc ggaggcggag gatccgaggt gcagctgctg 720

gaatctggcg gcggactggt gcagcctggc ggatctctga gactgagctg tgccgccagc 780

ggcttcacct tcagcaccta cgccatgaac tgggtgcgcc aggcccctgg caaaggcctg 840

gaatgggtgt cccggatcag aagcaagtac aacaactacg ccacctacta cgccgacagc 900

gtgaagggcc ggttcaccat cagccgggac gacagcaaga acaccctgta cctgcagatg 960

aacagcctgc gggccgagga caccgccgtg tactattgtg tgcggcacgg caacttcggc 1020

aacagctatg tgtcttggtt tgcctactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcaagc 1080

gctagcgtgg ccgctccctc cgtgtttatc tttcccccat ccgatgaaca gctgaaaagc 1140

ggcaccgcct ccgtcgtgtg tctgctgaac aatttttacc ctagggaagc taaagtgcag 1200

tggaaagtgg ataacgcact gcagtccggc aactcccagg aatctgtgac agaacaggac 1260

tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc accctgacac tgtctaaggc tgattatgag 1320

aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 1380

agcttcaaca ggggagagtg tgacaagacc cacacctgtc ccccttgtcc tgcccctgaa 1440

gctgctggcg gcccttctgt gttcctgttc cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc 1500

agccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg gtggatgtgt cccacgagga ccctgaagtg 1560

aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagacaaa gccgcgggag 1620

gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1680

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag 1740

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1800

tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgtggt gcctggtcaa aggcttctat 1860

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1920

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1980

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 2040

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 2082

<210> 98
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA CH1A1A 98/99 (VH-CH1) - Fc(lỗ) P329GLALA

<400> 98
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120

ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240

atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300

ttcgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360

agcgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 99
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC DP47 GS

<400> 99
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300

caggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 100
<211> 642
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC CD3 CH2527 (Crossfab, VL-CH1)

<400> 100
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360

cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420

aaggattatt ttcctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480

gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540

acagtgccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600

agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

<210> 101
<211> 2064
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DP47 GS (VH-CH1) - CD3 CH2527 (Crossfab VH-Ck) - Fc(nốt phồng) P329GLALA

<400> 101
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag cacaaagggc 360

cccagcgtgt tccctctggc ccctagcagc aagagcacat ctggcggaac agccgccctg 420

ggctgcctcg tgaaggacta ctttcccgag cctgtgaccg tgtcctggaa ctctggcgcc 480

ctgacaagcg gcgtgcacac ctttccagcc gtgctgcaga gcagcggcct gtactctctg 540

agcagcgtgg tcaccgtgcc tagcagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aaccacaagc ccagcaacac caaagtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgtgatggc 660

ggaggagggt ccggaggcgg aggatccgag gtgcagctgc tggaatctgg cggcggactg 720

gtgcagcctg gcggatctct gagactgagc tgtgccgcca gcggcttcac cttcagcacc 780

tacgccatga actgggtgcg ccaggcccct ggcaaaggcc tggaatgggt gtcccggatc 840

agaagcaagt acaacaacta cgccacctac tacgccgaca gcgtgaaggg ccggttcacc 900

atcagccggg acgacagcaa gaacaccctg tacctgcaga tgaacagcct gcgggccgag 960

gacaccgccg tgtactattg tgtgcggcac ggcaacttcg gcaacagcta tgtgtcttgg 1020

tttgcctact ggggccaggg caccctcgtg accgtgtcaa gcgctagcgt ggccgctccc 1080

tccgtgttta tctttccccc atccgatgaa cagctgaaaa gcggcaccgc ctccgtcgtg 1140

tgtctgctga acaattttta ccctagggaa gctaaagtgc agtggaaagt ggataacgca 1200

ctgcagtccg gcaactccca ggaatctgtg acagaacagg actccaagga cagcacctac 1260

tccctgtcct ccaccctgac actgtctaag gctgattatg agaaacacaa agtctacgcc 1320

tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag 1380

tgtgacaaga cccacacctg tccccccttgt cctgcccctg aagctgctgg cggcccttct 1440

gtgttcctgt tccccccaaa gcccaaggac accctgatga tcagccggac ccccgaagtg 1500

acctgcgtgg tggtggatgt gtcccacgag gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg 1560

gacggcgtgg aagtgcacaa cgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 1620

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1680

aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1740

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catgccggga tgagctgacc 1800

aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1860

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1920

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1980

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 2040

agcctctccc tgtctccggg taaa 2064

<210> 102
<211> 1335
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DP47 GS (VH-CH1) - Fc(lỗ) P329GLALA

<400> 102
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360

ccctccgtgt tccccctggc ccccagcagc aagagcacca gcggcggcac agccgctctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc 480

ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg 540

agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgcgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgtg caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 103
<211> 207
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 104
<211> 198
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 104

Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
50 55 60

Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
65 70 75 80

Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
85 90 95

Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
100 105 110

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
115 120 125

Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
130 135 140

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
145 150 155 160

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
165 170 175

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
180 185 190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195

<210> 105
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> linker

<400> 105

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 106
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> linker

<400> 106

Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 107
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 107

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 108
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit dẫn

<400> 108

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 109
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit dẫn

<400> 109
atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 110
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit dẫn

<400> 110
atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 111
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit dẫn

<400> 111

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

<210> 112
<211> 66
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit dẫn

<400> 112
atggacatga gggtccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

<210> 113
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit dẫn

<400> 113

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 114
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit dẫn

<400> 114
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattcc 57

<210> 115
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit dẫn

<400> 115
atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccactggagt gcattcc 57

<210> 116
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit dẫn

<400> 116
atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcactct 57

<210> 117
<211> 643
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 117

Leu Ser Leu Glu Gly Ser Arg Thr Leu Thr Val Cys Pro Gly Ser Val
1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser Ser Ser Ala Gly Thr
20 25 30

Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val Arg Gly Pro Gln Leu Gly
35 40 45

Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn
50 55 60

Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu
65 70 75 80

Met Pro Thr Glu Pro Phe Trp Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln
85 90 95

Leu Ser Ser Pro Pro Ala Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala
100 105 110

Val Ser Phe Glu Ala Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser His Leu Trp Lys
115 120 125

Asn Lys Gly Leu Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Lys Ile Thr Met
130 135 140

Ala Ala Leu Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln
145 150 155 160

Arg Leu Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg
165 170 175

```
Gly Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His
            180                 185                 190

Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His Gly
        195                 200                 205

Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His Leu Gln
    210                 215                 220

Gly Pro Ala Gly Ala Thr Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser Glu Ala Phe
225                 230                 235                 240

Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala
                245                 250                 255

Ser Val Pro Leu Arg Ile Thr Arg Gly Ser Arg Ala Pro Ile Ser Arg
            260                 265                 270

Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu
        275                 280                 285

Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Pro Gly Pro Val Thr His Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser
305                 310                 315                 320

Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Val Phe
                325                 330                 335

Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu
            340                 345                 350

Ala Val Asp Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Gln Ala Pro
        355                 360                 365

Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln
    370                 375                 380

Leu Arg Val Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu
385                 390                 395                 400
```

Ile Gln Gly Pro Lys Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Ala
405 410 415

Ser Ala Phe Ser Gln Leu Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala
420 425 430

Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu
435 440 445

Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Ile Thr Val Arg Ala
450 455 460

Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu
465 470 475 480

Arg Leu Asp Pro Thr Ile Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr
485 490 495

Gly Ser Val Pro His Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg
500 505 510

Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu
515 520 525

Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu
530 535 540

Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Ser Pro Thr Gly Asp Ser
545 550 555 560

Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser
565 570 575

Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val
580 585 590

Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Thr Arg Met Glu Ala Gly Lys Pro
595 600 605

Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro
610 615 620

Val Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Gly Phe Leu Glu Ala Asn

625 630 635 640

Met Phe Ser

<210> 118
<211> 643
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118

Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys Pro Gly Ser Val
1 5 10 15

Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser Ser Ser Ala Gly Thr
20 25 30

Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val Arg Gly Pro Gln Leu Gly
35 40 45

Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn
50 55 60

Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu
65 70 75 80

Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln
85 90 95

Leu Ser Ser Pro Pro Ala Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala
100 105 110

Val Ser Phe Glu Ala Ala Cys Pro Gln His Pro Ser His Leu Trp Lys
115 120 125

Asn Lys Gly Leu Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val
130 135 140

Ala Ala Leu Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln
145 150 155 160

Arg Ser Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg
165 170 175

Gly Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His
180 185 190

Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His Gly
195 200 205

Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His Leu Gln
210 215 220

Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser Glu Ala Phe
225 230 235 240

Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala
245 250 255

Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg Gly Ser Arg Ala Pro Ile Ser Arg
260 265 270

Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu
275 280 285

Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly
290 295 300

Gly Gly Leu Gly Pro Val Thr Arg Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser
305 310 315 320

Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe
325 330 335

Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu
340 345 350

Ala Val Asp Ile Leu Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro
355 360 365

Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln
370 375 380

Leu Arg Val Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu
385 390 395 400

```
Ile Gln Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr
                405                 410                 415

Ser Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala
            420                 425                 430

Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala Leu
        435                 440                 445

Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val Arg Ala
    450                 455                 460

Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu
465                 470                 475                 480

Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr
                485                 490                 495

Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg
            500                 505                 510

Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu
        515                 520                 525

Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu
    530                 535                 540

Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser
545                 550                 555                 560

Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser
                565                 570                 575

Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val
            580                 585                 590

Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro
        595                 600                 605

Glu Ser Ser Thr Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro
    610                 615                 620

Glu Pro Ala Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn
```

625 630 635 640

Met Phe Ser

<210> 119
<211> 428
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> NABA-avi-his

<400> 119

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr
35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Met Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

```
Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr
                165                 170                 175

Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Arg Ser
            180                 185                 190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Thr Ile
        195                 200                 205

Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser
    210                 215                 220

Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn
225                 230                 235                 240

Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr
                245                 250                 255

Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr
            260                 265                 270

Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Leu Ser
        275                 280                 285

Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val Thr
    290                 295                 300

Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr Gly
305                 310                 315                 320

Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser Glu
                325                 330                 335

Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Ile Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val
            340                 345                 350

Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro Ile
        355                 360                 365

Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn Ala
    370                 375                 380

Leu Pro Gln Glu Asn Leu Ile Asn Val Asp Leu Glu Val Leu Phe Gln
```

385 390 395 400

Gly Pro Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
405 410 415

Trp His Glu Ala Arg Ala His His His His His His
420 425

<210> 120
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD3e stalk-Fc(nốt phồng)-Avi

<400> 120

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
20 25 30

Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
35 40 45

Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
50 55 60

Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
65 70 75 80

Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
85 90 95

Val Ser Glu Asn Cys Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser
100 105 110

Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
115 120 125

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
130 135 140

```
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
145                 150                 155                 160

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                165                 170                 175

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
            180                 185                 190

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
        195                 200                 205

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
    210                 215                 220

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
225                 230                 235                 240

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys
                245                 250                 255

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
            260                 265                 270

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
        275                 280                 285

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
    290                 295                 300

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
305                 310                 315                 320

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                325                 330                 335

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu
            340                 345                 350

Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
        355                 360
```

<210> 121

<211> 325
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD3d stalk-Fc(lỗ)

<400> 121

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
35 40 45

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

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Arg Ser Glu Gln Leu Tyr Phe Gln
65 70 75 80

Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
85 90 95

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
100 105 110

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
115 120 125

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
130 135 140

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
145 150 155 160

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
165 170 175

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
180 185 190

```
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
        195                 200                 205

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
    210                 215                 220

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
225                 230                 235                 240

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                245                 250                 255

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
            260                 265                 270

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
        275                 280                 285

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
    290                 295                 300

Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys
305                 310                 315                 320

Ile Glu Trp His Glu
                325
```

<210> 122
<211> 658
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 122

```
Leu Ser Leu Glu Gly Thr Arg Lys Leu Thr Val Cys Pro Glu Ser Val
1               5                   10                  15

Gln Pro Leu Ser Ser Gln Ser Leu Ser Ala Ser Ser Ser Thr Gly Ala
            20                  25                  30

Asp Pro Arg His Leu Leu Tyr Arg Val Val Arg Gly Pro Gln Leu Gly
        35                  40                  45

Arg Leu Leu His Ala Gln Gln Gly Ser Ala Glu Glu Val Leu Val Asn
    50                  55                  60
```

```
Phe Thr Gln Ala Glu Val Asn Ala Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu
65                  70                  75                  80

Met Ser Ser Glu Pro Phe Trp Glu Ala His Asp Thr Ile Gly Leu Leu
                85                  90                  95

Leu Ser Ser Pro Pro Ala Arg Asp Leu Ala Ala Thr Leu Ala Val Met
            100                 105                 110

Val Ser Phe Asp Ala Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser Arg Leu Trp Lys
        115                 120                 125

Asn Lys Gly Leu Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Lys Ile Thr Val
    130                 135                 140

Ala Ala Leu Asp Ala Ala Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ala Ser Gln
145                 150                 155                 160

Arg Ser Arg His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Thr Arg
                165                 170                 175

Gly Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Arg Arg Pro Tyr
            180                 185                 190

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His Gly
        195                 200                 205

Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe Arg Phe Arg Ala His Leu Gln
    210                 215                 220

Gly Pro Thr Gly Thr Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser Glu Ala Phe
225                 230                 235                 240

Val Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro Gln Pro Gln Ala
                245                 250                 255

Ser Ile Pro Leu Arg Val Thr Arg Gly Ser Arg Ala Pro Val Ser Arg
            260                 265                 270

Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser Ala Pro Gly Glu Ile Glu
        275                 280                 285
```

Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn Gly Phe Leu Ser Leu Ala Gly
290 295 300

Asp Asn Thr Gly Pro Val Thr His Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ala
305 310 315 320

Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Val Phe
325 330 335

Gln Leu Ser Met Ser Asp Gly Ala Ser Pro Pro Ile Pro Met Ser Leu
340 345 350

Ala Val Asp Val Leu Pro Ser Thr Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro
355 360 365

Leu Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Thr Ser Leu Ser Arg Gln Gln
370 375 380

Leu Gln Val Ile Ser Asp Arg Glu Glu Pro Asp Val Ala Tyr Arg Leu
385 390 395 400

Thr Gln Gly Pro Leu Tyr Gly Gln Leu Leu Val Gly Gly Gln Pro Ala
405 410 415

Ser Ala Phe Ser Gln Leu Gln Val Asp Gln Gly Asp Val Val Phe Val
420 425 430

Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser Gln Asp His Phe Lys Val Val Ala Leu
435 440 445

Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Thr Val Asn Val Thr Val Gln Ala
450 455 460

Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly Thr Thr Leu
465 470 475 480

Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Ser Glu Leu Ala Asn Arg Thr
485 490 495

Gly Ser Met Pro His Phe Arg Leu Leu Ala Gly Pro Arg Tyr Gly Arg
500 505 510

```
Val Val Arg Val Ser Gln Gly Arg Thr Glu Ser Arg Ser Asn Gln Leu
        515                 520                 525

Val Glu His Phe Thr Gln Arg Asp Leu Glu Glu Gly Gln Leu Gly Leu
    530                 535                 540

Glu Val Gly Lys Pro Glu Gly Arg Ser Thr Gly Pro Ala Gly Asp Arg
545                 550                 555                 560

Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala Lys Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Leu
                565                 570                 575

Leu Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr His Ala Ala Lys Ser Tyr Ser Val
            580                 585                 590

Ala Leu Leu Ser Val Pro Glu Ala Val Arg Thr Glu Thr Glu Lys Pro
        595                 600                 605

Gly Arg Ser Val Pro Thr Gly Gln Pro Gly Gln Ala Ala Ser Ser Pro
    610                 615                 620

Val Pro Thr Ala Ala Lys Gly Gly Val Asp Gly Leu Asn Asp Ile Phe
625                 630                 635                 640

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Arg Ala His His His His
                645                 650                 655

His His
```