



(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)



1-0033449

(51)⁷ C07K 16/28; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2018-01285

(22) 28/09/2016

(86) PCT/EP2016/073062 28/09/2016

(87) WO 2017/055328 06/04/2017

(30) 15188262.8 02/10/2015 EP; 16167893.3 02/05/2016 EP

(45) 26/09/2022 414

(43) 25/09/2018 366A

(73) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland

(72) HOFER, Thomas (CH); FERRARA KOLLER, Claudia (CH); MOESSNER, Ekkehard (DE); HE, Mi (IT).

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

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI CD19 CỦA NGƯỜI, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY, POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA KHÁNG THỂ, VECTƠ VÀ VẬT CHỦ CHỨA POLYNUCLEOTIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng CD19 của người (các kháng thể kháng-CD19 của người), phương pháp sản xuất chúng, các dược phẩm có chứa các kháng thể này, polynucleotit mã hóa kháng thể, vectơ và vật chủ chứa polynucleotit này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể được làm tương thích với người kháng CD19 của người (kháng thể kháng-CD19 của người), phương pháp sản xuất chúng, các được phẩm có chứa các kháng thể này, và các phương pháp sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD19 của người là một protein xuyên màng 95 kDa (đồng thụ thể tế bào B) chỉ biểu hiện trên các tế bào B và trên các tế bào dạng nhánh thể nang. CD 19 được tìm thấy kết hợp với CD21 và CD81. CD19 và CD21 là cần thiết cho quá trình biệt hoá tế bào B bình thường (Immunol. Res. 26 (2002) 45-54 của Carter, R.H., và các đồng tác giả). Các kháng thể kháng CD19 đã được sử dụng trong một vài thử nghiệm lâm sàng (ví dụ, xem: Cancer Immunol. Immunother. 32 (191) 364-372 của Hekman, A., và các đồng tác giả; Cancer Immunol. Immunother. 40 (1995) 37-47 của Vlasfeld, L.T., và các đồng tác giả; J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 18 (1995) 231-241 của Conry, R.M., và các đồng tác giả; Int. J. Cancer 91 (2001) 516-522 của Manzke, O., và các đồng tác giả).

Các kháng thể kháng CD19 có thể có tác dụng ức chế hoặc kích thích đối với sự hoạt hoá tế bào B. Việc gắn kết của các kháng thể CD19 với các tế bào B bị kích thích-do phân bào ức chế hiện tượng tăng Ca^{2+} sau đó và sự hoạt hoá và tăng sinh tiếp theo của các tế bào này và sự tăng sinh và biệt hoá tế bào B có thể bị ức chế hoặc tăng cường bởi kháng thể CD19 tùy thuộc vào tác nhân kích thích gây phân bào đã sử dụng và mức độ liên kết ngang của kháng thể. Các bệnh ung thư được điều trị bằng các kháng thể kháng CD19 ví dụ bao gồm các bệnh ác tính dòng tế bào B ví dụ như các u lympho tế bào B hoặc các bệnh bạch cầu tế bào B, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, u lympho không-Hodgkin, bệnh bạch cầu lympho mãn tính, và bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính. Các kháng thể kháng CD19 cũng có thể hữu ích để điều trị các bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương.

Trong WO 2011/147834, các kháng thể kháng CD19 và ứng dụng của chúng được báo cáo. Tuy nhiên, đã xác định được là các kháng thể này có một số điểm nóng khử amit trong các trình tự của chúng. Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này không chỉ được đặc trưng bởi các trình tự không có các điểm nóng khử amit này, mà chúng còn có ái lực cao đối với CD19 đích.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng-CD19 của người với ái lực cao.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết đặc hiệu với CD19 của người với ái lực cao hơn so với một kháng thể bao gồm chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:113 và chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:114.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết đặc hiệu với CD19 của người, trong đó kháng thể này bao gồm

- (a) CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43,
- (b) CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44,
- (c) CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45,
- (d) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46,
- (e) CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, và
- (f) CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48.

Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể này là kháng thể đơn dòng. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là kháng thể của người, được làm tương thích với người hoặc khảm. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là một mảnh kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 của người.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, trong đó kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 99 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 100.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này ở trên, mà là kháng thể IgG1 có độ dài đầy đủ.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này, mà là kháng thể IgG1 có độ dài đầy đủ với các đột biến L234A, L235A và P329G (cách đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này, mà là kháng thể IgG1 có độ dài đầy đủ với các đột biến L234A, L235A và P329G (cách đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này, mà phản ứng chéo đối với CD19 của người và của khỉ đầu chó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà là lưỡng đặc hiệu, trong đó kháng thể này gắn kết đặc hiệu với CD19 của người và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai, trong đó kháng thể này bao gồm

- (a) CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43,
- (b) CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44,
- (c) CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45,
- (d) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46,
- (e) CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, và
- (f) CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hoá một kháng thể như được xác định trong bản mô tả này ở trên. Sáng chế còn đề xuất vật truyền, cụ thể là vật truyền biểu hiện, bao gồm polynucleotit được phân lập của sáng chế và tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit được phân lập này hoặc vật truyền 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 xuất phương pháp sản xuất kháng thể của sáng chế, bao gồm các bước (i) nuôi cấy tế bào vật chủ của sáng chế trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên này, và (ii) thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên này. Sáng chế còn bao gồm một kháng thể được sản xuất theo phương pháp này của sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm bao gồm kháng thể này của sáng chế và ít nhất một tá được được dụng.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể của sáng chế, hoặc được phẩm của sáng chế, để sử dụng làm thuốc. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể của sáng chế, hoặc được phẩm của sáng chế, để sử dụng trong điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị này. Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể của sáng chế, hoặc được phẩm của sáng chế, để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể của sáng chế, hoặc được phẩm của sáng chế, để sử dụng trong điều trị các bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương.

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng kháng thể của sáng chế để bào chế thuốc để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị này, cụ thể là để bào chế thuốc để điều trị bệnh ung thư, cũng như phương pháp điều trị bệnh ở một cá thể, bao gồm việc cho cá thể này dùng một lượng có tác dụng điều trị của chế phẩm bao gồm kháng thể này ở dạng được dụng. Theo một khía cạnh cụ thể, bệnh này là bệnh ung thư. Theo một khía cạnh khác, bệnh này được chọn từ nhóm gồm các bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, cá thể này tốt hơn là động vật có vú, cụ thể là người.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Trên Fig.1 minh họa phương thức chọn ngẫu nhiên đối với các vùng CDR của dòng tính gốc 8B8. Được thể hiện là các miền biến đổi của dòng tính gốc 8B8 và các vùng CDR (được đóng khung) theo cách đánh số của Kabat. Trình tự của VL tương ứng với SEQ ID NO:114 và trình tự của VH tương ứng với SEQ ID NO:113. (X) thể hiện các vị trí được chọn ngẫu nhiên.

Fig.2 thể hiện mô tả lược đồ các phương thức tạo thư viện. Được thể hiện là phương thức tách dòng và khuếch đại PCR được sử dụng để tạo ra thư viện dựa trên-8B8 với A) các vùng CDR1 và CDR2 được chọn ngẫu nhiên trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoặc B) các vùng CDR1 và CDR3 được chọn ngẫu nhiên trong chuỗi nhẹ và vùng CDR3 trong chuỗi nặng. Các enzym tương ứng được sử dụng để tách dòng vào plasmit thực khuẩn thể được chỉ ra.

Fig.3 thể hiện sự sắp thẳng hàng của dòng vô tính kháng-CD19 gốc 8B8 với các chất gắn kết có ái lực thuần thực đã chọn. Được thể hiện là các trình tự của dòng vô tính 8B8 và tất cả các chất gắn kết có ái lực thuần thực đã chọn. Các CDR của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đóng khung.

Các hình vẽ từ Fig. 4A đến Fig. 4H đề cập đến phân tích SPR của dòng vô tính 8B8 gốc và các biến thể có ái lực thuần thực của nó. Được thể hiện là đồ thị cảm biến của dòng vô tính 8B8 và các dẫn xuất có ái lực thuần thực của nó mà không có các điểm nóng LCDR1 N27d và N28.

Fig.5 thể hiện khả năng gắn kết của các dòng vô tính CD19 IgG1 khác nhau với các tế bào khối u biểu hiện CD19 của người (các tế bào WSU-DLCL2). Việc gắn kết được phát hiện bằng mảnh F(ab')₂ của dê đặc hiệu-kháng mảnh-IgG F(ab')₂ của người AffiniPure được tiếp hợp-PE. Được thể hiện là trung bình của cường độ huỳnh quang (MFI) so với nồng độ của các dòng vô tính đã thử nghiệm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Trừ khi được định nghĩa khác đi, các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như được sử dụng chung trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Để diễn giải bản mô tả này, các thuật ngữ dưới đây sẽ sử dụng và bất kỳ khi nào thích hợp, các thuật ngữ được sử dụng ở số ít sẽ cũng bao gồm cả số nhiều và ngược lại.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “phân tử gắn kết kháng nguyên” theo nghĩa rộng nhất của nó chỉ phân tử gắn kết đặc hiệu với phần quyết định tính kháng nguyên. Các ví dụ về phân tử gắn kết kháng nguyên là các kháng thể, các mảnh kháng thể và các protein gắn kết kháng nguyên dạng giá đỡ.

Thuật ngữ “gốc gắn kết kháng nguyên” chỉ phân tử polypeptit mà gắn kết đặc hiệu với phần quyết định tính kháng nguyên. Theo một khía cạnh, gốc gắn kết kháng nguyên có thể hoạt hoá phát tín hiệu thông qua kháng nguyên tế bào đích của nó. Theo một khía cạnh cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên có thể điều khiển phân tử mà nó gắn với đến vị trí đích. Các gốc gắn kết kháng nguyên bao gồm các kháng thể và các mảnh của chúng có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Ngoài ra, các gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm các protein gắn kết kháng nguyên dạng giá đỡ như được xác định trong bản mô tả này dưới đây, ví dụ các miền gắn kết mà dựa trên các protein lặp lại được thiết kế hoặc các miền lặp lại được thiết kế như protein lặp lại ankyrin được thiết kế (DARPs) (ví dụ, xem WO 2002/020565) hoặc Lipocalins (Anticalin).

Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng trong bản mô tả này theo nghĩa rộng nhất và bao hàm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đơn đặc hiệu và đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể lưỡng đặc hiệu), và các mảnh kháng thể miễn là chúng thể hiện hoạt tính gắn kết kháng nguyên mong muốn.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản đồng nhất, nghĩa là, các kháng thể riêng lẻ bao gồm quần thể là giống nhau và/hoặc gắn kết cùng epitop, ngoại trừ các kháng thể biến thể, ví dụ, có chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc phát sinh trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể này nhìn chung có với lượng nhỏ. Trái với các chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau nhằm kháng lại các phần quyết định tính kháng nguyên khác nhau (các epitop), mỗi kháng thể đơn dòng trong chế phẩm kháng thể đơn dòng nhằm vào phần quyết định duy nhất trên một kháng nguyên.

Thuật ngữ kháng thể "đơn đặc hiệu" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ một kháng thể mà có một hoặc nhiều vị trí gắn kết, mỗi vị trí này gắn kết với cùng một epitop của cùng một kháng nguyên. Thuật ngữ "lưỡng đặc hiệu" nghĩa là phân tử gắn kết kháng nguyên có thể gắn kết đặc hiệu với ít nhất hai phần quyết định tính kháng nguyên phân biệt. Thông thường, phân tử gắn kết kháng nguyên lưỡng đặc hiệu bao gồm hai vị trí gắn kết kháng nguyên, mỗi vị trí này đặc hiệu đối với phần quyết định tính kháng nguyên khác nhau. Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên lưỡng đặc hiệu 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 phân biệt.

Thuật ngữ "hoá trị" như được sử dụng trong đơn này chỉ sự hiện diện của một số lượng cụ thể các vị trí gắn kết trong một phân tử gắn kết kháng nguyên. Do đó,

các thuật ngữ “hoá trị hai”, “hoá trị bốn”, và “hoá trị sáu” tương ứng chỉ sự hiện diện của hai vị trí gắn kết, bốn vị trí gắn kết, và sáu vị trí gắn kết, trong một phân tử gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ “kháng thể có độ dài đầy đủ”, “kháng thể nguyên vẹn”, và “kháng thể nguyên” được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này chỉ kháng thể có cấu trúc về cơ bản tương tự với cấu trúc kháng thể nguyên thủy. “Các kháng thể nguyên thủy” chỉ các phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên có các cấu trúc khác nhau. Ví dụ, các kháng thể lớp-IgG nguyên thủy là các glycoprotein heterotetrame khoảng 150.000 dalton, gồm có hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng được liên kết disulfua. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nặng có một vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền nặng thay đổi 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 nhẹ thay đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, tiếp đó là ba miền ổn định chuỗi nhẹ (CL), còn được gọi là vùng ổn định chuỗi nhẹ. Chuỗi nặng của một kháng thể có thể thuộc một trong năm týp, gọi là α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG), hoặc μ (IgM), một vài loại còn có thể phân tiếp thành týp phụ, ví dụ $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2), $\gamma 3$ (IgG3), $\gamma 4$ (IgG4), $\alpha 1$ (IgA1) và $\alpha 2$ (IgA2). Chuỗi nhẹ của một kháng thể có thể thuộc một trong hai týp, gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa vào trình tự axit amin của miền ổn định của chúng.

"Mảnh kháng thể" chỉ một phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn mà bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn gắn kết với kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn gắn kết với. Các 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 ghép hai, các kháng thể ghép ba, các kháng thể ghép bốn, các mảnh Fab pha tạp; các kháng thể mạch thẳng; các phân tử kháng thể đơn-chuỗi (ví dụ scFv); và các kháng thể miền đơn. Xem tổng kết về các mảnh kháng thể, xem tài liệu của Hudson và các đồng tác giả: Nat Med 9, 129-134 (2003). Xem tổng kết về các mảnh scFv, ví dụ xem tài liệu của Plückthun: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg và Moore eds., Springer-Verlag, New York, các trang 269-315 (1994); cũng tham khảo WO 93/16185; và các bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5,571,894 và 5,587,458. Xem thảo luận về các mảnh Fab và F(ab')₂ bao gồm các gốc epitop gắn kết thụ thể thu hồi và

có thời gian bán thải *in vivo* gia tăng, xem bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5,869,046. Các kháng thể ghép hai là các mảnh kháng thể có hai vị trí gắn kết kháng nguyên mà có thể là hoá trị hai hoặc lưỡng đặc hiệu, xem, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson và các đồng tác giả, Nat Med 9, 129-134 (2003); và Hollinger và các đồng tác giả, Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Các kháng thể ghép ba và các kháng thể ghép bốn cũng được đề cập trong tài liệu của Hudson và các đồng tác giả: Nat Med 9, 129-134 (2003). Các kháng thể miền đơn là các mảnh kháng thể bao gồm toàn bộ hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc toàn bộ hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của một kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem ví dụ bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 6,248,516 B1). Có thể tạo ra các mảnh kháng thể bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuỷ phân phân giải protein kháng thể nguyên vẹn cũng như sản xuất bằng 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.

Thuỷ phân bằng papain các kháng thể nguyên vẹn tạo ra hai mảnh gắn kết kháng nguyên giống nhau, gọi là các mảnh “Fab” mỗi mảnh có chứa các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và cả miền ổn định của chuỗi nhẹ và miền ổn định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “mảnh Fab” chỉ một mảnh kháng thể bao gồm mảnh chuỗi nhẹ bao gồm miền VL và miền ổn định của chuỗi nhẹ (CL), và miền VH và miền ổn định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Các mảnh Fab’ khác với các mảnh Fab là có bổ sung thêm một vài gốc ở đầu tận cùng carboxy của miền CH1 của chuỗi nặng bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề kháng thể. Fab’-SH là các mảnh Fab’ trong đó (các) gốc xystein của các miền ổn định mang nhóm thiol tự do. Xử lý bằng pepsin cho mảnh F(ab')₂ có hai vị trí kết hợp kháng nguyên (hai mảnh Fab) và một phần của vùng Fc.

Thuật ngữ “mảnh Fab pha tạp” hoặc “mảnh xFab” hoặc “mảnh Fab hoán đổi” chỉ mảnh Fab, trong đó các vùng biến đổi hoặc các vùng ổn định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được hoán đổi. Hai thành phần chuỗi khác nhau của phân tử Fab hoán đổi là có thể và được bao gồm trong các kháng thể lưỡng đặc hiệu của sáng chế: Một mặt, các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được hoán đổi, nghĩa là phân tử Fab hoán đổi bao gồm chuỗi peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng ổn định chuỗi nặng (CH1), và chuỗi peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và

vùng ổn định chuỗi nhẹ (CL). Phân tử Fab hoán đổi này còn được gọi là CrossFab (VLVH). Mặt khác, khi các vùng ổn định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Fab được hoán đổi, phân tử Fab hoán đổi bao gồm chuỗi peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng ổn định chuỗi nhẹ (CL), và chuỗi peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng ổn định chuỗi nặng (CH1). Phân tử Fab hoán đổi này còn được gọi là CrossFab (CLCH1).

“Mảnh Fab chuỗi đơn” hoặc “scFab” là polypeptit gồm một miền biến đổi chuỗi nặng kháng thể (VH), một miền ổn định kháng thể 1 (CH1), một miền biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (VL), một miền ổn định chuỗi nhẹ kháng thể (CL) và liên kết, trong đó các miền kháng thể này và liên kết này theo một thứ tự trong số các thứ tự sau đây theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: a) VH-CH1-liên kết-VL-CL, b) VL-CL-liên kết-VH-CH1, c) VH-CL-liên kết-VL-CH1 hoặc d) VL-CH1-liên kết-VH-CL; và trong đó liên kết này là polypeptit có ít nhất 30 axit amin, tốt hơn là trong khoảng 32 và 50 axit amin. Các mảnh Fab chuỗi đơn này được làm ổn định thông qua liên kết disulfua tự nhiên giữa miền CL và miền CH1. Ngoài ra, các phân tử Fab chuỗi đơn này có thể được làm ổn định thêm bằng cách tạo ra các liên kết disulfua giữa các chuỗi bằng cách cài xen các gốc xystein (ví dụ vị trí 44 trong chuỗi nặng thay đổi và vị trí 100 trong chuỗi nhẹ biến đổi theo cách đánh số của Kabat).

“Mảnh Fab chuỗi đơn hoán đổi” hoặc “x-scFab” là polypeptit gồm một miền biến đổi chuỗi nặng kháng thể (VH), một miền ổn định kháng thể 1 (CH1), một miền biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (VL), một miền ổn định chuỗi nhẹ kháng thể (CL) và liên kết, trong đó các miền kháng thể này và liên kết này theo một thứ tự trong số các thứ tự sau đây theo hướng từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C: a) VH-CL-liên kết-VL-CH1 và b) VL-CH1-liên kết-VH-CL; trong đó VH và VL cùng tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên và trong đó liên kết này là polypeptit có ít nhất 30 axit amin. Ngoài ra, các phân tử x-scFab này có thể được làm ổn định thêm bằng cách tạo ra các liên kết disulfua giữa các chuỗi bằng cách cài xen các gốc xystein (ví dụ vị trí 44 trong chuỗi nặng thay đổi và vị trí 100 trong chuỗi nhẹ biến đổi theo cách đánh số của Kabat).

“Mảnh thay đổi đơn chuỗi (scFv)” là protein dung hợp của các vùng biến đổi của các chuỗi nặng (VH) và chuỗi nhẹ (VL) của một kháng thể, được nối bằng một peptit liên kết ngắn có từ 10 đến khoảng 25 axit amin. Liên kết này thường là giàu

glyxin để có tính linh hoạt, cũng như serin hoặc threonin để có độ tan, và có thể nối đầu tận cùng N của V_H với đầu tận cùng C của V_L , hoặc ngược lại. Protein này vẫn giữ được tính đặc hiệu của kháng thể gốc, mặc dù đã loại bỏ các vùng ổn định và đưa vào liên kết này. Các kháng thể scFv là, ví dụ được mô tả trong: J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96) của Houston. Ngoài ra, các mảnh kháng thể bao gồm các polypeptit đơn chuỗi có các đặc tính của miền V_H , đó là có thể lắp ghép cùng với miền V_L , hoặc các đặc tính của miền V_L , đó là có thể lắp ghép cùng với miền V_H với vị trí gắn kết kháng nguyên hoạt động và nhờ đó tạo ra tính chất gắn kết kháng nguyên của các kháng thể độ dài đầy đủ.

“Các protein gắn kết kháng nguyên dạng giá đỡ” là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, fibronectin và các protein lắp lại ankyrin được thiết kế (DARPin) đã được sử dụng như các giá đỡ khác cho các miền gắn kết kháng nguyên, ví dụ, xem: *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009) của Gebauer và Skerra, và *Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today* 13: 695-701 (2008) của Stumpp và các đồng tác giả. Theo một khía cạnh của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên giá đỡ được chọn từ nhóm gồm CTLA-4 (Evibody), Lipocalins (Anticalin), phân tử thu được từ Protein A như miền-Z của Protein A (Affibody), miền-A (Avimer/Maxibody), transferrin huyết thanh (thể-*trans*); a protein lắp lại ankyrin được thiết kế (DARPin), miền biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của kháng thể (kháng thể miền đơn, sdAb), miền biến đổi của chuỗi nặng kháng thể (Nanobody, V_H), các mảnh V_{NAR} , fibronectin (AdNectin), miền lectin tít-C (Tetranectin); miền biến đổi của beta-lactamaza thụ thể kháng nguyên mới (các mảnh V_{NAR}), gamma-crystallin hoặc ubiquitin của người (các phân tử Affilin); miền loại kunitz của các chất ức chế proteaza của người, các vi thể như các protein từ họ knottin, các peptit aptame và fibronectin (adnectin).

CTLA-4 (kháng nguyên kết hợp-lympho bào T độc tính tế bào 4) là thụ thể họ-CD28 được biểu hiện chủ yếu ở các tế bào T dương tính với CD4. Miền ngoại bào của nó có nếp gấp Ig tương tự miền biến đổi. Các quai tương ứng với các CDR của các kháng thể có thể được thay thế bằng trình tự khác loài để mang lại các tính chất gắn kết khác nhau. Các phân tử CTLA-4 được xử lý bằng công nghệ di truyền để có các tính đặc hiệu gắn kết khác nhau còn được gọi là các thể Evi (ví dụ US7166697B1).

Các thể Evi có kích cỡ gần bằng vùng biến đổi đã phân lập của một kháng thể (ví dụ kháng thể miễn). Xem chi tiết hơn trong: *Journal of Immunological Methods* 248 (1-2), 31-45 (2001).

Các lipocalin là họ các protein ngoại bào vận chuyển các phân tử kỵ nước như các steroid, bilirubin, retinoid và lipid. Chúng có cấu trúc bậc hai tám-beta không linh động với một số các quai ở đáy của cấu trúc hình nón mà có thể được xử lý bằng công nghệ di truyền để gắn kết với các kháng nguyên đích khác nhau. Các anticalin có cỡ khoảng 160-180 axit amin, và thu được từ lipocalins. Xem chi tiết hơn trong: *Biochim Biophys Acta* 1482: 337-350 (2000), US7250297B1 và US20070224633.

Affibody là giá đỡ thu được từ Protein A của *Staphylococcus aureus* mà có thể được xử lý bằng công nghệ di truyền để gắn kết kháng nguyên. Các miền gồm có ba-chuỗi xoắn khoảng 58 axit amin. Các thư viện đã được tạo ra bằng cách chọn ngẫu nhiên các gốc bề mặt. Xem chi tiết hơn trong: *Protein Eng. Des. Sel.* 17, 455-462 (2004) và EP 1641818A1.

Avimer là các protein đa miền thu được từ họ giá đỡ miền-A. Các miền nguyên thủy có khoảng 35 axit amin có cấu trúc được liên kết disulfua xác định. Tính đa dạng được tạo ra bằng cách xáo trộn biến thiên tự nhiên biểu hiện bởi họ các miền-A. Xem chi tiết hơn trong: *Nature Biotechnology* 23(12), 1556 - 1561 (2005) và *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16(6), 909-917 (June 2007).

Transferrin là glycoprotein vận chuyển trong huyết thanh monome. Các transferrin có thể được xử lý bằng công nghệ di truyền để gắn kết các kháng nguyên đích khác nhau bằng cách cài xen các trình tự peptit vào qua bề mặt cho phép. Các ví dụ về các giá đỡ transferrin được xử lý bằng công nghệ di truyền bao gồm thể-Trans. Xem chi tiết hơn trong: *J. Biol. Chem* 274, 24066-24073 (1999).

Các protein lặp lại ankyrin được thiết kế (DARPin) là thu được từ Ankyrin, đây là họ các protein điều tiết quá trình gắn các protein màng nguyên vẹn vào bộ khung tế bào. Đoạn lặp ankyrin đơn là một mô-típ 33 gốc gồm hai chuỗi xoắn-alpha và một beta-turn. Chúng có thể được xử lý bằng công nghệ di truyền để gắn kết các kháng nguyên đích khác nhau bằng cách chọn ngẫu nhiên các gốc trong chuỗi xoắn-alpha thứ nhất và và một beta-turn của mỗi đoạn lặp. Có thể gia tăng giao diện gắn kết của chúng bằng cách gia tăng số lượng các mô-đun (phương pháp làm trường

thành ái lực). Xem chi tiết hơn trong: J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) và J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) và US20040132028A1.

Kháng thể miền đơn là một mảnh kháng thể gồm miền kháng thể thay đổi monome đơn nhất. Miền đơn thứ nhất thu được từ miền biến đổi của chuỗi nặng kháng thể từ họ lạc đà (các thể nano hoặc các mảnh V_HH). Hơn nữa, thuật ngữ kháng thể miền đơn bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của người tự sinh hoặc các mảnh V_{NAR} thu được từ họ cá mập.

Fibronectin là giá đỡ mà có thể được xử lý bằng công nghệ di truyền để gắn kết kháng nguyên. Các adnectin gồm mạch chính có trình tự axit amin tự nhiên của miền thứ 10 trong số 15 đơn vị lặp lại của fibronectin của người typ III (FN3). Ba quai ở một đầu của beta.-sandwich có thể được xử lý bằng công nghệ di truyền để làm cho Adnectin nhận biết đặc hiệu đích trị liệu quan tâm. Xem chi tiết hơn trong: Protein Eng. Des. Sel. 18, 435- 444 (2005), US20080139791, WO2005056764 và US6818418B1.

Các peptit aptame là các phân tử nhận biết tổ hợp gồm protein giá đỡ ổn định, thường là thioredoxin (TrxA) mà có chứa quai peptit thay đổi hạn chế được cài xen ở vị trí hoạt tính. Xem chi tiết hơn trong: Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005).

Các vi thể thu được từ các vi protein có trong tự nhiên có độ dài 25-50 axit amin mà có chứa 3-4 cầu xystein - các ví dụ về vi protein bao gồm KalataBI và conotoxin và knottin. Các vi protein có quai có thể được xử lý bằng công nghệ di truyền để bao gồm tối đa 25 axit amin mà không ảnh hưởng đến gấp nếp tổng thể của vi protein này. Xem chi tiết hơn về các miền knottin được xử lý bằng công nghệ di truyền trong: WO2008098796.

“Phân tử gắn kết kháng nguyên mà gắn kết cùng epitop” làm phân tử tham chiếu chỉ phân tử gắn kết kháng nguyên mà phong bế gắn kết của phân tử tham chiếu này với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh ở mức 50% hoặc lớn hơn, và ngược lại, phân tử tham chiếu này phong bế gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên này với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh ở mức 50% hoặc lớn hơn.

Thuật ngữ “miền gắn kết kháng nguyên” chỉ phần của một phân tử gắn kết kháng nguyên mà bao gồm vùng gắn kết đặc hiệu với và hỗ trợ cho một phần hoặc toàn bộ

kháng nguyên. Trong trường hợp kháng nguyên cỡ lớn, phân tử gắn kết kháng nguyên có thể chỉ gắn kết với một phần cụ thể của kháng nguyên này, phần này được gọi là epitop. Miền gắn kết kháng nguyên có thể được tạo bởi ví dụ, một hoặc nhiều miền biến đổi (còn được gọi là các vùng biến đổi). Tốt hơn là, miền gắn kết kháng nguyên bao gồm một vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (VL) và một vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể (VH).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phần quyết định tính kháng nguyên" là đồng nghĩa với "kháng nguyên" và "epitop," và chỉ một vị trí (ví dụ đoạn liên kế axit amin hoặc cấu hình được tạo bởi các vùng khác nhau axit amin không liên kế) trên đại phân tử polypeptit mà gốc gắn kết kháng nguyên gắn kết với, tạo thành phức hợp gốc gắn kết kháng nguyên-kháng nguyên. Các 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 virus, trên các bề mặt của các tế bào bệnh khác, trên bề mặt của các tế bào miễn dịch, có tự do trong huyết thanh, và/hoặc trong cấu trúc nền (ECM). Các protein hữu ích làm các kháng nguyên trong bản mô tả này có thể là dạng nguyên thủy 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 quy định khác. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên là protein của người. Khi đề cập đến một protein cụ thể trong bản mô tả này, thuật ngữ này bao gồm protein chưa được xử lý "độ dài đầy đủ", cũng như dạng bất kỳ của protein mà thu được từ quá trình chế biến trong tế bào. Thuật ngữ này cũng bao hàm các biến thể có trong tự nhiên của protein này, ví dụ các biến thể cắt nối khác hoặc các biến thể alen.

"Gắn kết đặc hiệu" nghĩa là gắn kết 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 một phân tử gắn kết kháng nguyên gắn kết với một kháng nguyên đặc hiệu có thể xác định được thông qua thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết-enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác tương tự như kỹ thuật trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (được phân tích trên máy BIAcore) (Glyco J 17, 323-329 (2000) của Liljeblad và các đồng tác giả), và các thử nghiệm gắn kết truyền thống (Endocr Res 28, 217-229 (2002) của Heeley). Theo một phương án, mức độ gắn kết của một phân tử gắn kết kháng nguyên với protein không liên quan là <

khoảng 10% mức gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên, khi được xác định, ví dụ bằng SPR. Theo các phương án nhất định, một phân tử gắn kết kháng nguyên có hằng số phân ly (K_d) $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, hoặc $\leq 0,001 \text{ nM}$ (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).

“Ái lực” hoặc “ái lực gắn kết” chỉ cường độ tổng cộng các tương tác không phải cộng hoá trị giữa một vị trí gắn kết đơn nhất của một phân tử (ví dụ một kháng thể) và đối tác gắn kết của nó (ví dụ kháng nguyên). Trừ khi có quy định khác, như được sử dụng trong bản mô tả này, “ái lực gắn kết” chỉ ái lực gắn kết riêng phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của một cặp gắn kết (ví dụ kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của một phân tử X đối với đối tác Y của nó nhìn chung có thể biểu thị bằng hằng số phân ly (K_d), đây là tỷ lệ của hằng số tốc độ phân ly và kết hợp (tương ứng là koff và kon). Do đó, các ái lực tương đương có thể bao gồm các hằng số tốc độ khác nhau, miễn là tỷ lệ giữa các hằng số tốc độ vẫn giữ nguyên. Có thể xác định ái lực bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Phương pháp cụ thể để xác định ái lực là Cộng hưởng Plasmon Bề mặt (SPR).

Thuật ngữ “CD19” chỉ kháng nguyên lympho bào B CD19, còn được gọi là kháng nguyên bề mặt lympho bào B B4 hoặc kháng nguyên bề mặt tế bào T Leu-12 và bao gồm CD19 nguyên thủy bất kỳ 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) các động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ khỉ đầu chó) và các động vật gặm nhấm (ví dụ chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Trình tự axit amin của CD19 của người được thể hiện trong: Uniprot accession no. P15391 (phiên bản 160, SEQ ID NO: 115). Thuật ngữ này bao hàm CD19 chưa được xử lý “độ dài đầy đủ” của người cũng như dạng bất kỳ của CD19 của người mà thu được từ quá trình chế biến trong tế bào miễn là kháng thể như được đề cập trong bản mô tả này gắn kết với nó. CD19 là một thụ thể bề mặt tế bào có cấu trúc phân biệt được biểu hiện trên bề mặt của tế bào B của người, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tế bào tiền-tế bào B, các tế bào B trong giai đoạn phát triển ban đầu (nghĩa là, các tế bào B chưa trưởng thành), các tế bào B trưởng thành thông qua quá trình biệt hoá cuối cùng thành các tương bào, và các tế bào B ác tính. CD19 được biểu hiện bởi đa số bệnh bạch cầu

nguyên bào lympho cấp tính (ALL) tiền B, u lympho không-Hodgkin, bệnh bạch cầu lympho mãn tính (CLL) tế bào B, bệnh bạch cầu tiền tế bào lympho, bệnh bạch cầu tế bào tủy, bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính, và một vài bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính-tế bào Null (tế bào bạch huyết không có các dấu chuẩn tế bào T hoặc tế bào B trên bề mặt của nó). Việc biểu hiện của CD19 trên các tương bào còn gợi ý là nó có thể được biểu hiện trên các khối u tế bào B đã biệt hoá như đa u tủy. Do đó, kháng nguyên CD19 là đích cho liệu pháp miễn dịch trong điều trị u lympho không-Hodgkin, bệnh bạch cầu lympho mãn tính và/hoặc bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính.

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 thủy nhìn chung có cấu trúc tương tự nhau, với mỗi miền bao gồm bốn vùng khung bảo toàn (các FR) và ba vùng biến đổi mạnh (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 biến đổi mạnh” hoặc “HVR,” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ vùng trong số các vùng của miền biến đổi của kháng thể mà thay đổi mạnh về trình tự và/hoặc tạo thành các quai có cấu trúc xác định (“các quai thay đổi mạnh”). Nhìn chung, các kháng thể bốn-chuỗi nguyên thủy bao gồm sáu HVR; ba ở VH (H1, H2, H3), và ba ở VL (L1, L2, L3). Nhìn chung, các kháng thể bao gồm sáu HVR; ba ở VH (H1, H2, H3), và ba ở VL (L1, L2, L3). Các HVR nhìn chung bao gồm các gốc axit amin từ các quai thay đổi mạnh và/hoặc từ “các vùng xác định tính hỗ trợ” (các CDR), các CDR có mức độ biến thiên trình tự cao nhất và/hoặc tham gia nhận biết kháng nguyên. Các quai thay đổi mạnh ví dụ ở các gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3) (*J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) của Chothia and Lesk). Các CDR ví dụ (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3) ở các gốc axit amin 24-34 của L1, 50-56 của L2, 89-97 của L3, 31-35B của H1, 50-65 của H2, và 95-102 của H3 (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) của Kabat và các đồng tác giả). Các vùng

biến đổi mạnh (các HVR) còn được gọi là các vùng xác định tính hỗ trợ (các CDR), và các thuật ngữ này được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này 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, U.S. Dept. of Health and Human Services, mô tả trong "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) và Chothia và các đồng tác giả mô tả trong: *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), trong đó các định nghĩa bao gồm các trùng lặp axit amin hoặc các phân nhóm axit amin khi so sánh với nhau. Tuy nhiên, áp dụng định nghĩa trong một trong hai tài liệu này chỉ CDR của một kháng thể hoặc các biến thể của chúng là thuộc phạm vi dự định của thuật ngữ này và được sử dụng trong bản mô tả này. Các gốc axit amin thích hợp bao gồm các CDR như được xác định bởi một trong số các tài liệu trích dẫn nêu trên được đưa ra dưới đây trong Bảng A để so sánh. Số gốc chính xác bao gồm một CDR cụ thể sẽ thay đổi tùy thuộc vào trình tự và kích cỡ của CDR này. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thường quy xác định những gốc nào bao gồm một CDR cụ thể với một trình tự axit amin vùng biến đổi của kháng thể đã cho.

BẢNG A. Các định nghĩa về 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 dưới đây).

² "AbM" với chữ cái "b" viết thường như được sử dụng trong Bảng A chỉ các CDR như xác định bằng 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 mà có thể áp dụng cho kháng thể bất kỳ. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể quy chiếu hệ thống "đánh số Kabat" này cho trình tự vùng biến đổi bất kỳ, mà không cần dựa vào dữ liệu thực nghiệm từ trình tự này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "đánh số Kabat" chỉ hệ thống đánh số do Kabat và các đồng tác giả, U.S. Dept. of Health and Human Services, đưa ra trong tài liệu: "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Trừ khi có quy định khác, dẫn chiếu đến số vị trí gốc axit amin cụ thể trong vùng biến đổi kháng thể là theo hệ thống đánh số của Kabat.

Ngoại trừ CDR1 trong VH, các CDR nhìn chung bao gồm các gốc axit amin tạo thành các quai thay đổi mạnh. Các CDR cũng bao gồm "các gốc xác định tính đặc hiệu," hoặc "các SDR" là các gốc tiếp xúc kháng nguyên. Các SDR có chứa trong các vùng của các CDR được viết tắt là các CDR, hoặc các a-CDR. Các a-CDR ví dụ (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, và a-CDR-H3) ở các gốc axit amin 31-34 của L1, 50-55 của L2, 89-96 của L3, 31-35B của H1, 50-58 của H2, và 95-102 của H3. (xem: *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) của Almagro và Fransson). Trừ khi có quy định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, các gốc FR) được đánh số theo Kabat và các đồng tác giả, *nêu trên*.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thuần thực ái lực" trong ngữ cảnh các phân tử gắn kết kháng nguyên (ví dụ, các kháng thể) chỉ phân tử gắn kết kháng nguyên mà thu được từ phân tử gắn kết kháng nguyên tham chiếu, ví dụ, bằng cách gây đột biến, gắn kết với cùng kháng nguyên, tốt hơn là gắn kết với cùng epitop, như kháng thể tham chiếu; và có ái lực cao hơn đối với kháng nguyên của phân tử gắn kết kháng nguyên tham chiếu. Làm trưởng thành ái lực nhìn chung bao gồm cải biến một hoặc nhiều các gốc axit amin trong một hoặc nhiều CDR của phân tử gắn kết kháng nguyên. Thông thường, phân tử gắn kết kháng nguyên thuần thực ái lực gắn kết với cùng epitop như phân tử gắn kết kháng nguyên tham chiếu ban đầu.

"Khung" hoặc "FR" chỉ các gốc miền biến đổi không phải là các gốc vùng biến đổi mạnh (HVR). FR của miền biến đổi nhìn chung gồm có 4 miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Do đó, các trình tự HVR và FR nhìn chung xuất hiện theo trình tự sau trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Thuật ngữ "khung của người tiếp nhận" cho mục đích của bản mô tả này là khung có trình tự axit amin của khung miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền biến đổi chuỗi nặng (VH) thu được từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người, như xác định dưới đây. Một khung của người tiếp nhận "thu được từ" khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người có thể bao gồm trình tự axit amin giống nhau, hoặc có thể có các thay đổi trình tự axit amin. Theo một vài phương án, số lượng các thay đổi axit amin là 10 hoặc ít hơn, 9 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 7 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn, hoặc 2 hoặc ít hơn. Theo một vài phương án, khung của người tiếp nhận VL tương đồng về mặt trình tự với trình tự khung globulin miễn dịch của người VL hoặc trình tự khung liên ứng của người.

Thuật ngữ kháng thể "khảm" chỉ một kháng thể, trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là thu được từ một nguồn hoặc loài cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là thu được từ một nguồn hoặc loài khác.

Thuật ngữ "lớp" kháng thể chỉ loại miền ổn định hoặc vùng ổn định của chuỗi nặng của nó. Có 5 lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài lớp trong số này có thể chia thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Các miền ổn định chuỗi nặng tương ứng với các lớp globulin khác nhau tương ứng được gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ .

Thuật ngữ kháng thể "được làm tương thích với người" dùng để chỉ kháng thể khảm bao gồm các gốc axit amin từ các HVR không phải của người và các gốc axit amin từ của các FR của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể được làm tương thích với người về cơ bản bao gồm tất cả ít nhất một, và thông thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc về cơ bản tất cả các HVR (ví dụ, các CDR) tương ứng với các miền của kháng thể không phải-của người, và tất cả hoặc về cơ bản tất cả các FR tương ứng với các miền của kháng thể của người. Kháng thể được làm tương thích với người tùy ý có thể bao gồm ít nhất là một phần của vùng ổn định

kháng thể thu được từ kháng thể của người. Thuật ngữ “dạng được làm tương thích với người” của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải-của người, dùng để chỉ kháng thể đã được làm tương thích với người. Các dạng khác của “các kháng thể được làm tương thích với người” theo sáng chế là các dạng, trong đó vùng ổn định được cải biến hoặc thay đổi bổ sung từ vùng này của kháng thể gốc để tạo ra các tính chất theo sáng chế, đặc biệt là về khả năng gắn kết C1q và/hoặc khả năng gắn kết thụ thể Fc (FcR).

Kháng thể “của người” là kháng thể có trình tự axit amin mà tương ứng với trình tự này của một kháng thể được sản sinh bởi người hoặc tế bào của người hoặc thu được từ nguồn không phải của người mà sử dụng thư mục kháng thể của người hoặc các trình tự mã hoá kháng thể của người. Định nghĩa này về kháng thể của người cụ thể loại trừ kháng thể được làm tương thích với người bao gồm các gốc gắn kết kháng nguyên không phải của người.

Thuật ngữ “miền Fc” hoặc “vùng Fc” trong bản mô tả này được sử dụng để xác định vùng đầu tận cùng C của một chuỗi nặng kháng thể mà có chứa ít nhất một phần của vùng ổn định. Thuật ngữ này bao gồm các vùng Fc trình tự nguyên thủy và các vùng Fc biến thể. Vùng Fc của IgG bao gồm miền CH2 của IgG và miền CH3 của IgG. “Miền CH2” của vùng Fc của IgG của người thường kéo dài từ gốc axit amin ở vị trí khoảng 231 đến gốc axit amin ở vị trí khoảng 340. Theo một phương án, chuỗi hydrat cacbon được gắn với miền CH2. Miền CH2 trong bản mô tả này có thể là miền CH2 trình tự nguyên thủy hoặc miền CH2 biến thể. “Miền CH3” bao gồm đoạn các gốc đầu tận cùng C đến miền CH2 trong vùng Fc (nghĩa là từ gốc axit amin ở vị trí khoảng 341 đến gốc axit amin ở vị trí khoảng 447 của IgG). Miền CH3 trong bản mô tả này có thể là miền CH3 trình tự nguyên thủy hoặc miền CH3 biến thể (ví dụ miền CH3 với “phần phòng” (“nốt phòng”) được đưa vào trong một chuỗi của nó và “khoảng” (“lỗ”) được đưa vào tương ứng trong chuỗi còn lại của nó; xem bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5,821,333, được viện dẫn cụ thể trong bản mô tả này để tham khảo). Các miền CH3 biến thể này có thể được sử dụng để thúc đẩy heterodimer hoá hai chuỗi nặng kháng thể không tương đồng như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng của IgG của người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng này. Tuy nhiên, lysin đầu tận cùng C (Lys447) của vùng Fc này 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 được 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.

Công nghệ “nốt phòng-vào-lỗ” được mô tả, ví dụ trong 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. Nhìn chung, phương pháp này bao gồm đưa vào phần phòng (“nốt phòng”) ở giao diện của polypeptit thứ nhất và khoang tương ứng (“lỗ”) ở giao diện của polypeptit thứ hai, sao cho phần phòng có thể ở vị trí trong khoang này để thúc đẩy tạo thành heterodime và ngăn cản tạo thành homodime. Các phần phòng được tạo cấu trúc bằng cách thay thế các mạch bên axit amin cỡ nhỏ từ giao diện của polypeptit thứ nhất bằng các mạch bên cỡ lớn hơn (ví dụ tyrosin hoặc tryptophan). Các khoang bù có kích cỡ giống hoặc tương tự như các phần phòng được tạo ra ở giao diện của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế các mạch bên axit amin cỡ lớn bằng các mạch cỡ nhỏ hơn (ví dụ alanin hoặc threonin). Phần phòng và khoang này có thể được tạo ra bằng cách biến đổi các 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, cải biến nốt phòng bao gồm thay thế axit amin T366W ở một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và cải biến lỗ bao gồm các thay thế axit amin T366S, L368A và Y407V trong cấu trúc còn lại trong số hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo một phương án cụ thể hơn, cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bao gồm cải biến nốt phòng còn bao gồm thay thế axit amin S354C, và cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bao gồm cải biến còn bao gồm thay thế axit amin Y349C. Đưa vào hai gốc xystein này dẫn đến tạo thành cầu disulfua giữa hai cấu trúc siêu phân tử của Fc, do đó làm ổn định hơn nữa dime này (J Immunol Methods 248, 7-15 (2001) của Carter).

"Vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch" dự định bao gồm các biến thể alen có trong tự nhiên của vùng Fc của globulin miễn dịch cũng như các biến thể có các biến đổi tạo ra các thay thế, bổ sung hoặc khuyết đoạn mà không làm giảm đáng kể khả năng của globulin miễn dịch này điều tiết các chức năng hiệu ứng (như độc tính tế bào phụ thuộc-kháng thể). Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có thể khuyết

đoạn ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của vùng Fc của globulin miễn dịch mà không làm mất đáng kể chức năng sinh học. Các biến thể này có thể được chọn theo các nguyên tắc chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để có tác động tối thiểu lên hoạt tính (xem, ví dụ, Science 247:1306-10 (1990) của Bowie, J. U. và các đồng tác giả).

Thuật ngữ “các chức năng hiệu ứng” chỉ các hoạt tính sinh học do vùng-Fc của kháng thể, mà thay đổi theo isotyp kháng thể. Các ví dụ về các chức năng hiệu ứng kháng thể bao gồm: khả năng gắn kết C1q và độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC); gắn kết thụ thể Fc; độc tính tế bào qua trung gian-tế bào phụ thuộc-kháng thể (ADCC); thực bào tế bào phụ 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 thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B), và hoạt hoá tế bào B.

“Thụ thể Fc hoạt hoá” là thụ thể Fc mà sau khi tiếp hợp bởi vùng Fc của một kháng thể gây một loạt sự kiện phát tín hiệu kích thích tế bào mang-thụ thể để thực hiện các chức năng hiệu ứng. Các thụ thể Fc hoạt hoá bao gồm FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), và FcαRI (CD89). Thụ thể Fc hoạt hoá cụ thể là FcγRIIIa của người (xem: UniProt accession no. P08637, version 141).

“Ngoại miền” là miền của protein màng mà kéo dài vào khoang ngoài tế bào (nghĩa là khoang ngoài tế bào đích). Các ngoại miền thường là các phần của protein mà khởi đầu tiếp xúc với các bề mặt, dẫn đến tải nạp tín hiệu.

Thuật ngữ “tác nhân liên kết peptit” chỉ peptit bao gồm một hoặc nhiều axit amin, thường nằm trong khoảng từ 2 đến 20 axit amin. Các tác nhân liên kết peptit là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc được mô tả trong bản mô tả này. Các tác nhân liên kết peptit không gây miễn dịch thích hợp ví dụ, là các tác nhân liên kết peptit $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ hoặc $G_4(SG_4)_n$, trong đó “n” nhìn chung là số nằm trong khoảng từ 1 đến 10, thường nằm trong khoảng từ 1 đến 4, cụ thể là 2.

Thuật ngữ “axit amin” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhóm carboxy α-axit amin có trong tự nhiên bao gồm alanin (mã ba chữ cái: ala, mã một chữ cái: A), arginin (arg, R), asparagin (asn, N), axit aspartic (asp, D), cystein (cys, C), glutamin (gln, Q), axit glutamic (glu, E), glyxin (gly, G), histidin (his, H), isoleuxin (ile, I), leuxin (leu, L), lysin (lys, K), methionin (met, M), phenylalanin (phe, F), prolin

(pro, P), serin (ser, S), threonin (thr, T), tryptophan (trp, W), tyrosin (tyr, Y), và valin (val, V).

Thuật ngữ “được dung hợp” hoặc “được kết nối” nghĩa là các thành phần được liên kết bằng liên kết peptit, trực tiếp hoặc thông qua một hoặc nhiều liên kết peptit.

“Tỷ lệ phần trăm (%) mức tương đồng trình tự axit amin” đối với trình tự polypeptit tham chiếu là tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin trong trình tự ứng cử mà giống với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi làm thẳng mạch các trình tự và đưa vào các khe trống, nếu cần, để thu được tỷ lệ phần trăm mức tương đồng trình tự tối đa, và không coi các thay thế bảo toàn là một phần của sự tương đồng trình tự. Làm thẳng mạch để xác định tỷ lệ phần trăm mức tương đồng trình tự axit amin có thể thực hiện theo nhiều cách trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính sẵn có như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các tham số thích hợp để làm thẳng mạch các trình tự, bao gồm thuật toán cần thiết để có sự thẳng mạch tối đa trên toàn bộ độ dài đầy đủ của các trình tự sẽ so sánh. Trong bản mô tả này, tuy nhiên, các giá trị % mức tương đồng trình tự axit amin được tạo ra có 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 tại Cục Bản Quyền của Mỹ, Washington D.C., 20559, Đăng ký Bản quyền Mỹ số TXU510087. Chương trình ALIGN-2 có thể có được từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể biên soạn từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 phải được biên soạn để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX V4.0D kỹ thuật số. Tất cả các tham số so sánh trình tự là chương trình ALIGN-2 cài đặt 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 làm thẳng mạch trình tự ALIGN-2 làm 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 “các biến thể trình tự axit amin” bao gồm các biến thể về cơ bản trong đó có các thay thế axit amin ở một hoặc nhiều gốc vùng biến đổi mạnh của phân tử gắn kết kháng nguyên gốc (ví dụ kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể của người). Nhìn chung, (các) biến thể thu được được chọn lọc để nghiên cứu tiếp sẽ có các cải biến (ví dụ, các cải thiện) một số tính chất sinh học nhất định (ví dụ, ái lực gia tăng, tính gây miễn dịch giảm) so với phân tử gắn kết kháng nguyên gốc và/hoặc về cơ bản sẽ vẫn giữ được các tính chất sinh học nhất định của phân tử gắn kết kháng nguyên gốc. Biến thể thể ví dụ là kháng thể thuần thực ái lực, kháng thể này có thể được tạo ra một cách thuận tiện, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật làm trưởng thành ái lực bộc lộ-thực khuẩn thể như các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này. Vấn đề là, một hoặc nhiều các gốc HVR được gây đột biến và các phân tử gắn kết kháng nguyên biến thể được bộc lộ trên thực khuẩn thể và được sàng lọc cho một hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ ái lực gắn kết). Theo các phương án nhất định, các thay thế, cài xen hoặc khuyết đoạn có thể ở trong phạm vi một hoặc nhiều HVR miễn là các biến đổi này về cơ bản không làm giảm khả năng gắn kết với kháng nguyên của phân tử gắn kết kháng nguyên. Ví dụ, có thể tạo ra các biến đổi bảo toàn (ví dụ, các thay thế bảo toàn như được đề xuất trong bản mô tả này) về cơ bản không làm giảm ái lực gắn kết trong các HVR. Phương pháp hữu ích để xác định các gốc hoặc các vùng của một kháng thể mà có thể là đích để gây đột biến được gọi là “gây đột biến quét alanin” như được Cunningham và Wells mô tả trong: *Science*, 244:1081-1085, (1989). Theo phương pháp này, một gốc hoặc nhóm của các gốc đích (ví dụ, các gốc tích điện như Arg, Asp, His, Lys, và Glu) được xác định và thay thế bằng axit amin trung tính hoặc tích điện âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem liệu tương tác của kháng thể này với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Có thể đưa vào các thay thế khác nữa ở các vị trí axit amin chứng tỏ tính nhạy cảm chức năng với các thay thế ban đầu. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-phân tử gắn kết kháng nguyên nhằm xác định các điểm tiếp

xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Có thể nhằm đích hoặc loại bỏ các gốc tiếp xúc này và các gốc bên cạnh như các gốc ứng cử để thay thế. Có thể sàng lọc các biến thể để xác định xem các biến thể này có chứa các tính chất mong muốn.

Các cài xen trình tự axit amin bao gồm các dung hợp đầu tận cùng amino và/hoặc carboxyl có độ dài trong khoảng từ một gốc đến các polypeptit có chứa một trăm hoặc nhiều gốc, cũng như các cài xen trong trình tự đơn hoặc đa gốc axit amin.

“Các thay thế bảo toàn” được đề xuất trong Bảng B dưới mục “Các thay thế được ưu tiên” và được mô tả tiếp dưới đây tham chiếu đến các nhóm mạch bên của axit amin từ (1) đến (6). Các thay thế axit amin có thể được đưa vào phân tử quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc cho hoạt tính mong muốn, ví dụ, vẫn giữ/cải thiện khả năng gắn kết kháng nguyên, tính gây miễn dịch giảm, hoặc ADCC hoặc CDC cải thiện.

Bảng B

Gốc ban đầu	Thay thế ví dụ	Các thay thế được ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg

Gốc ban đầu	Thay thế ví dụ	Các thay thế được ưu tiên
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norloxin	Leu
Leu (L)	Norloxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norloxin	Leu

Axit amin có thể được nhóm vào theo các tính chất mạch bên hay gấp:

- (1) kỵ nước: Norloxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) tính axit: Asp, Glu;
- (4) tính bazơ: His, Lys, Arg;
- (5) các gốc ảnh hưởng đến định hướng mạch: Gly, Pro;
- (6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các thay thế không bảo toàn sẽ dẫn đến hoán đổi một thành viên của một nhóm trong số các nhóm này cho một nhóm khác.

Theo các phương án nhất định, các phân tử gắn kết kháng nguyên được đề xuất trong bản mô tả này được biến đổi để gia tăng hoặc giảm thiểu mức độ mà kháng thể này được glycosyl hoá. Các biến thể glycosyl hoá của các phân tử này có thể thu được một cách thuận tiện bằng cách làm biến đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl được tạo ra hoặc loại bỏ. Trong trường hợp phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm vùng Fc, hydrat cacbon gắn với nó có thể được biến đổi. Các kháng thể nguyên thủy do các tế bào động vật có vú sản sinh thường bao gồm oligosacarit mạch nhánh, hai nhánh mà nhìn chung gắn bằng liên kết-N với Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Xem, ví dụ, *TIBTECH* 15:26-32 (1997) của Wright và các đồng tác giả. Oligosacarit có thể bao gồm nhiều loại hydrat cacbon, ví dụ, manosa, N-acetyl glucosamin (GlcNAc), galactosa, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn với GlcNAc ở phần “thân” của cấu trúc oligosacarit hai nhánh. Theo một vài phương án, có thể tiến hành các cải biến của oligosacarit trong các phân tử gắn kết kháng nguyên để tạo ra các biến thể có một số tính chất được cải tiến nhất định. Theo một khía cạnh, các biến thể của các phân tử gắn kết kháng nguyên được đề xuất có cấu trúc hydrat cacbon mà không có fucoza được gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) với vùng Fc. Các biến thể fucosyl hoá này có thể có chức năng ADCC được cải thiện, xem ví dụ Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2003/0157108 (Presta, L.) hoặc US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Các biến thể khác nữa của các phân tử gắn kết kháng nguyên của sáng chế bao gồm các biến thể với các oligosacarit bị cắt đôi, ví dụ, trong đó oligosacarit hai nhánh được gắn với vùng Fc bị cắt đôi bởi GlcNAc. Các biến thể này có thể có fucosyl hoá giảm và/hoặc chức năng ADCC được cải thiện. Ví dụ, xem WO 2003/011878 (Jean-Mairet và các đồng tác giả); bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 6,602,684 (Umana và các đồng tác giả); và đơn sáng chế Mỹ số 2005/0123546 (Umana và các đồng tác giả). Các biến thể với ít nhất một gốc galactosa trong oligosacarit được gắn với vùng Fc cũng được đề xuất. Các biến thể kháng thể này có chức năng CDC được cải thiện và được mô tả, ví dụ, trong WO 1997/30087 (Patel và các đồng tác giả); WO 1998/58964 (Raju, S.); và WO 1999/22764 (Raju, S.).

Theo các phương án nhất định, có thể mong muốn tạo ra các biến thể được xử lý bằng công nghệ di truyền xystein của phân tử gắn kết kháng nguyên của sáng chế, ví dụ, “thioMAbs,” trong đó một hoặc nhiều gốc của phân tử được thay thế bằng các gốc xystein. Theo các phương án cụ thể, các gốc được thay thế này là ở các vị trí có

thể tiếp cận được của kháng thể. Bằng cách thay thế các gốc này bằng xystein, các nhóm thiol phản ứng do đó ở vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể và có thể được sử dụng để tiếp hợp kháng thể với các phân tử khác, như các phân tử thuốc hoặc phân tử liên kết-thuốc, để tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc bất kỳ sau đây có thể được thay thế bằng xystein: V205 (đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (cách đánh số Châu Âu) của chuỗi nặng; và S400 (cách đánh số Châu Âu) của vùng chuỗi nặng Fc. Các phân tử gắn kết kháng nguyên được xử lý bằng công nghệ di truyền xystein có thể được tạo ra như mô tả trong, ví dụ, Bằng độc quyền sáng chế của Mỹ số 7,521,541.

Theo các phương án nhất định, các phân tử gắn kết kháng nguyên được đề xuất theo sáng chế có thể được cải biến tiếp để có chứa các phân tử không phải protein bổ sung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có bán sẵn. Các phân tử thích hợp để tạo dẫn xuất kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyme tan trong nước. Các ví dụ không mang tính giới hạn về các polyme tan trong nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), các copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymethylxenluloza, dextran, rượu polyvinyllic, polyvinyl pyrrolidon, poly-1,3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit của axit maleic, poly-axit amin (các homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, các homopolyme propylen glycol, các copolyme polypropylen oxit/etylen oxit, polyol polyoxyetyl hoá (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyllic, và các hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có các ưu điểm trong sản xuất do nó ổn định trong nước. Polyme có thể có phân tử lượng bất kỳ, và có thể mạch nhánh hoặc không phải mạch nhánh. Số lượng các polyme gắn với kháng thể có thể biến thiên, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn, các polyme này có thể là cùng một phân tử hoặc các phân tử khác nhau. Nhìn chung, số lượng và/hoặc chủng loại các polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên cân nhắc các yếu tố, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần cải thiện, liệu dẫn xuất kháng thể sẽ được sử dụng trong liệu pháp điều trị trong các điều kiện xác định, v.v. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các thể tiếp hợp của kháng thể và phân tử không phải protein có thể được gia nhiệt chọn lọc bằng cách phơi nhiễm phóng xạ. Theo một phương án, phân tử không phải protein là ống nano cacbon (Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605 của Kam, N.W. và các đồng tác giả). Chiếu xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bước sóng không gây hại các tế bào bình thường, nhưng gia nhiệt cho phân tử không phải protein đến nhiệt độ mà ở đó giết các tế bào gắn với kháng thể-phần tử không phải protein. Theo một khía cạnh khác, có thể thu được thể tiếp hợp miễn dịch của các phân tử gắn kết kháng nguyên được đề xuất trong bản mô tả này. “Thể tiếp hợp miễn dịch” là một kháng thể được tiếp hợp với một hoặc nhiều phân tử khác loài, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tác nhân gây độc tế bào.

Thuật ngữ “polynucleotit” chỉ phân tử hoặc cấu trúc axit nucleic được phân lập, ví dụ ARN thông tin (mARN), ARN thu được từ virus, hoặc ADN plasmit (pDNA). Polynucleotit có thể bao gồm liên kết phosphodiester quy ước hoặc liên kết không-quy ước (ví dụ liên kết amit, như tìm thấy trong các axit nucleic peptit (PNA). Thuật ngữ “phân tử axit nucleic” chỉ một hoặc nhiều đoạn axit nucleic, ví dụ các mảnh ADN hoặc ARN, có mặt trong polynucleotit.

Phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit “được phân lập” dùng để chỉ phân tử axit nucleic, ADN hoặc ARN đã được phân tách từ hợp phần môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, polynucleotit tái tổ hợp mã hoá polypeptit có chứa trong vật truyền được xem là được phân tách cho mục đích của sáng chế. Các ví dụ khác về polynucleotit được phân lập bao gồm polynucleotit tái tổ hợp được duy trì trong các tế bào vật chủ khác loài hoặc các polynucleotit đã tinh chế (một phần hoặc về cơ bản) trong dung dịch. Polynucleotit được phân lập bao gồm phân tử polynucleotit có chứa trong các tế bào mà thông thường có chứa phân tử polynucleotit này, nhưng phân tử polynucleotit này có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí nhiễm sắc thể mà khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó. Các phân tử ARN được phân lập 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 được phân lập hoặc các axit nucleic theo sáng chế còn bao gồm các phân tử này 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 gen khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, hoặc gen kết thúc phiên mã.

Axit nucleic hoặc polynucleotit có trình tự nucleotit, ví dụ, “trùng đồng” ở mức ít nhất là 95% với trình tự nucleotit tham chiếu của sáng chế, được dự định là trình tự nucleotit của polynucleotit này là trùng đồng với trình tự tham chiếu ngoại trừ trình

tự polynucleotit có thể bao gồm tối đa 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 ở mức ít nhất là 95% với trình tự nucleotit tham chiếu, tối đa 5% các nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được làm khuyết đoạn hoặc thay thế bằng một nucleotit khác, hoặc số lượng các nucleotit tối đa đến 5% trong tổng số các nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được cài xen vào trình tự tham chiếu. Các biến 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 bất kỳ vị trí nào giữa các vị trí đầu tận cùng này, rải rác đơn lẻ giữa các gốc trong trình tự tham chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liền kề trong phạm vi trình tự tham chiếu. Thực tế là, liệu trình tự polynucleotit cụ thể bất kỳ là tương đồng ở mức ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nucleotit của sáng chế có thể được xác định theo cách thông thường bằng cách sử dụng các chương trình máy tính đã biết, như các chương trình nêu trên cho các polypeptit (ví dụ ALIGN-2).

Thuật ngữ "cat-xet biểu hiện" chỉ polynucleotit được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp với một loạt các yếu tố axit nucleic đã xác định mà cho phép phiên mã một axit nucleic cụ thể trong tế bào đích. Cat-xet biểu hiện tái tổ hợp có thể được hợp nhất vào plasmit, nhiễm sắc thể, của ADN ty lập thể, ADN plastit, virus, hoặc mảnh axit nucleic. Thông thường, cat-xet biểu hiện tái tổ hợp của một vật truyền biểu hiện bao gồm, ngoài các trình tự khác, trình tự axit nucleic cần phiên mã và gen khởi đầu. Theo các phương án nhất định, cat-xet biểu hiện của sáng chế bao gồm các trình tự polynucleotit mà mã hoá phân tử gắn kết kháng nguyên lưỡng đặc hiệu của sáng chế hoặc các đoạn của chúng.

Thuật ngữ "vật truyền" hoặc "vật truyền biểu hiện" là đồng nghĩa với "cấu trúc biểu hiện" và chỉ phân tử ADN mà được sử dụng để đưa vào và điều khiển quá trình biểu hiện của một gen cụ thể mà nó được liên kết theo cách có điều khiển với trong tế bào đích. Thuật ngữ này bao gồm vật truyền cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vật truyền được hợp nhất vào bộ gen của tế bào vật chủ mà nó đã được đưa vào. Vật truyền biểu hiện của sáng chế bao gồm cat-xet biểu hiện. Các vật truyền biểu hiện cho phép phiên mã các lượng lớn của mRNA ổn định. Khi vật truyền biểu hiện ở bên trong tế bào đích, phân tử axit ribonucleic hoặc protein mà gen này mã hoá được sản sinh bởi bộ máy phiên mã và/hoặc dịch mã của tế bào. Theo một phương án, vật

truyền biểu hiện của sáng chế bao gồm cat-xet biểu hiện mà bao gồm các trình tự polynucleotit mã hoá các phân tử gắn kết kháng nguyên lưỡng đặc hiệu của sáng chế hoặc các mảnh của chúng.

Các thuật ngữ "tế bào vật chủ," "dòng tế bào vật chủ," và "dịch nuôi cấy tế bào vật chủ" được sử dụng thay thế cho nhau và chỉ các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh đã được đưa vào, bao gồm thế hệ sau của các tế bào này. Tế bào vật chủ bao gồm "các thể biến nạp" và "các tế bào được biến nạp," bao gồm tế bào được biến nạp cấp một và tế bào thế hệ sau thu được từ chúng bất kể số lần cấy chuyển. Các tế bào thế hệ sau không thể giống hoàn toàn về hàm lượng axit nucleic với tế bào gốc, có thể có các đột biến. Các tế bào thế hệ sau đột biến có thể có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc chọn lọc trong tế bào được biến nạp ban đầu là được bao gồm trong bản mô tả này. Tế bào vật chủ là loại hệ tế bào bất kỳ mà có thể sử dụng để tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên của sáng chế. Các tế bào vật chủ bao gồm các tế bào được nuôi cấy, ví dụ các tế bào được nuôi cấy của động vật có vú, 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 của chuột P3X63, 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, không chỉ lấy một vài ví dụ, mà bao gồm cả các tế bào có trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc mô động vật.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu" của một chất, chỉ lượng cần thiết dẫn đến thay đổi sinh lý trong tế bào hoặc mô mà nó được sử dụng cho.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu điều trị" của một chất, ví dụ, dược phẩm, chỉ lượng hữu hiệu, ở các liều lượng và trong thời gian cần thiết đạt được kết quả trị liệu hoặc phòng bệnh mong muốn. Một lượng có tác dụng điều trị của một chất ví dụ loại trừ, giảm thiểu, trì hoãn, giảm tối thiểu hoặc ngăn ngừa tác dụng bất lợi của một bệnh.

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Các động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật nuôi (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, người và 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 không có chứa các thành phần bổ sung khác gây độc không chấp nhận được đối với đối tượng cho dùng chế phẩm này.

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

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

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "điều trị" (và các biến thể ngữ pháp của nó, như ở dạng động từ hoặc danh động từ) chỉ sự can thiệp trên lâm sàng trong một nỗ lực làm thay đổi tiến trình tự nhiên của cá thể đang được điều trị, và có thể được tiến hành để ngăn ngừa hoặc trong tiến trình bệnh lý lâm sàng. Các tác dụng mong muốn của việc điều trị bao gồm, nhưng không chỉ 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 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 "bệnh ung thư" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ các bệnh tăng sinh, như các u lympho, bệnh bạch cầu lympho bào, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCL), bệnh ung thư phổi tế bào phế quản phế nang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư tụy, bệnh ung thư da, bệnh ung thư đầu hoặc cổ, u melanin da hoặc trong mắt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư của vùng hậu môn, bệnh ung thư bụng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư tử cung, caxinom của các ống dẫn trứng, caxinom của nội mạc tử cung, caxinom của cổ tử cung, caxinom của âm đạo, caxinom của âm hộ, bệnh Hodgkin, bệnh ung thư của thực quản,

bệnh ung thư của ruột non, bệnh ung thư của hệ nội tiết, bệnh ung thư của tuyến giáp, bệnh ung thư của tuyến cận giáp, bệnh ung thư của tuyến thận, sacoma của mô mềm, bệnh ung thư của niệu quản, bệnh ung thư của dương vật, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư của bàng quang, bệnh ung thư của thận hoặc niệu quản, caxinom tế bào thận, caxinom của bề thận, u trung biểu mô, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư mật, khối u của hệ thần kinh trung ương (CNS), khối u cột sống, u thần kinh đệm thân não, u nguyên bào đệm đa dạng, u bào hình sao, u bao sợi thần kinh, u màng não thất, u nguyên bào tuỷ, u màng não, caxinom tế bào vảy, u tuyến yên và sacoma Ewings, bao gồm các thể dai dẳng của bệnh ung thư bất kỳ trong số các bệnh ung thư nêu trên, hoặc kết hợp của một hoặc nhiều của bệnh ung thư nêu trên.

Các kháng thể của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể kháng-CD19 của người mới có các tính chất có lợi cụ thể như khả năng sản xuất được, độ ổn định, ái lực gắn kết, hoạt tính sinh học, hiệu quả nhắm đích và độc tính giảm.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng-CD19 của người với ái lực cao.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể, mà gắn kết đặc hiệu với CD19 của người với ái lực cao hơn so với một kháng thể bao gồm chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:113 và chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:114.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 của người, trong đó kháng thể này bao gồm

- (a) CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43,
- (b) CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44,
- (c) CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45,
- (d) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46,
- (e) CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, và
- (f) CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48.

Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm (a) CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43, (b) CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44, (c) CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45, (d) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, (e) CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, và (f) CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48, và gắn kết đặc hiệu với CD19 của người với ái lực cao hơn so với một kháng thể bao gồm chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:113 và chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:114.

Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể là kháng thể đơn dòng. Theo một khía cạnh khác, kháng thể là kháng thể của người, được làm tương thích với người hoặc khảm. Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể là kháng thể được làm tương thích với người. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là một mảnh kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 của người.

Một khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất một kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này mà gắn kết đặc hiệu với CD19. Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này gắn kết đặc hiệu với CD19 của người. Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này gắn kết đặc hiệu với CD19 của khỉ đầu chó. Theo một khía cạnh khác nữa, các kháng thể như được bộc lộ có tính phản ứng chéo các loài.

Theo các khía cạnh nhất định, kháng thể kháng-CD19 như được bộc lộ trong bản mô tả này có hằng số phân ly cân bằng (K_d) là $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, hoặc $\leq 0,001\text{ nM}$, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M hoặc từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M . Theo một khía cạnh cụ thể, kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này gắn kết với CD19 với hằng số phân ly (K_d) cân bằng là 1 nM hoặc nhỏ hơn như được xác định bằng Cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất kháng thể kháng-CD19 như được bộc lộ trong bản mô tả này với hằng số phân ly (k_d) $\leq 10^{-2}/\text{giây}$, $\leq 10^{-3}/\text{giây}$, $\leq 10^{-4}/\text{giây}$, $\leq 10^{-5}/\text{giây}$, $\leq 10^{-6}/\text{giây}$, $\leq 10^{-7}/\text{giây}$, hoặc $\leq 10^{-8}/\text{giây}$, từ $10^{-4}/\text{giây}$ đến $10^{-9}/\text{giây}$ hoặc từ $10^{-5}/\text{giây}$ đến $10^{-11}/\text{giây}$. Theo một phương án cụ thể, kháng thể như được bộc lộ trong bản mô tả này gắn kết đặc hiệu với CD19 và còn đặc trưng bởi

hằng số phân ly (k_d) = 10^{-4} /giây hoặc nhỏ hơn như được xác định bằng Cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19, trong đó kháng thể này bao gồm ít các vị trí khử amit hơn so với một kháng thể bao gồm chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:113 và chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:114. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19, trong đó kháng thể này bao gồm ít các gốc asparagin hơn so với một kháng thể bao gồm chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:113 và chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:114.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ biến đổi biến thể và/hoặc chuỗi nặng thay đổi biến thể bao gồm ít nhất một thay thế axit amin so với một kháng thể bao gồm chuỗi nặng thay đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:113 và chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:114, trong đó ít nhất một gốc asparagin được thay thế. Theo các khía cạnh được ưu tiên, ít nhất hai, ít nhất ba hoặc ít nhất bốn gốc asparagin được thay thế.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể, trong đó kháng thể này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:99 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:100.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 của người, trong đó kháng thể này được chọn từ nhóm gồm

(i) một kháng thể bao gồm CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27, CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29, và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30,

(ii) một kháng thể bao gồm CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 32, CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33, CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 34, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35, và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36,

(iii) một kháng thể bao gồm CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 38, CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 39, CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 40, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 41, và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 42,

(iv) một kháng thể bao gồm CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44, CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45, CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48,

(v) một kháng thể bao gồm CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50, CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51, CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53, và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 54,

(vi) một kháng thể bao gồm CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56, CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57, CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60, và

(vii) một kháng thể bao gồm CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 61, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62, CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 65, và CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19, trong đó kháng thể này bao gồm

(i) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:111 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:112,

(ii) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:101 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:102,

(iii) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:103 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:104,

(iv) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:99 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:100,

(v) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:105 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:106,

(vi) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:107 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:108, hoặc

(vii) miền VH bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:109 và miền VL bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:110.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể như được xác định trong bản mô tả này ở trên bao gồm miền Fc gồm có cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng kết hợp ổn định.

Theo một khía cạnh khác nữa, miền Fc là IgG, cụ thể là miền Fc của IgG1 hoặc miền Fc của IgG4. Cụ thể hơn là, miền Fc là miền Fc của IgG1. Theo một khía cạnh cụ thể, miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy kết hợp cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc này.

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

Miền Fc của các phân tử gắn kết kháng nguyên của sáng chế gồm có một cặp chuỗi polypeptit bao gồm các miền chuỗi nặng của phân tử globulin miễn dịch. Ví dụ, miền Fc của phân tử globulin miễn dịch G (IgG) là dime, mỗi cấu trúc siêu phân tử của nó các miền ổn định bao gồm chuỗi nặng CH2 và CH3 của IgG. Hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc có khả năng kết hợp ổn định với nhau.

Miền Fc mang lại các tính chất dược động học cho các phân tử gắn kết kháng nguyên của sáng chế, bao gồm thời gian bán thải trong huyết thanh kéo dài góp phần cho tích lũy nhiều ở mô đích và tỷ lệ phân bố mô-máu thuận lợi. Tuy nhiên, đồng thời có thể dẫn đến nhằm đích không mong muốn của các kháng thể của sáng chế đến các

tế bào biểu hiện các thụ thể Fc mà không phải là các tế bào mang-kháng nguyên được ưu tiên. Do đó, theo các khía cạnh cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên của sáng chế thể hiện ái lực gắn kết giảm với thụ thể Fc và/hoặc chức năng hiệu ứng giảm, so với miền Fc của IgG1 nguyên thủy. Theo một khía cạnh, Fc về cơ bản không gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc không gây cảm ứng chức năng hiệu ứng. Theo một khía cạnh cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ . Theo một khía cạnh, thụ thể Fc là thụ thể Fc của người. Theo một khía cạnh cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ của người hoạt hoá, cụ thể hơn là Fc γ RIIIa, Fc γ RI hoặc Fc γ RIIa của người, cụ thể nhất là Fc γ RIIIa của người. Theo một khía cạnh, miền Fc không gây cảm ứng chức năng hiệu ứng. Chức năng hiệu ứng giảm có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều của chức năng sau đây: độc tính thể bào phụ thuộc bổ thể (CDC) giảm, độc tính thể bào qua trung gian-tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) giảm, thực bào tế bào phụ 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, giảm gắn kết với các tế bào NK, giảm gắn kết với đại thực bào, giảm gắn kết với bạch cầu đơn nhân, giảm gắn kết với các tế bào đa hình nhân, giảm chết tế bào theo chương trình cảm ứng tín hiệu trực tiếp, giảm trưởng thành tế bào dạng nhánh, hoặc giảm gây miễn cảm sơ bộ tế bào T.

Theo các khía cạnh nhất định, có thể đưa một hoặc nhiều các cải biến axit amin vào vùng Fc của một kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này, nhờ đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc có thể bao gồm trình tự vùng Fc của người (ví dụ, vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) bao gồm cải biến axit amin (ví dụ thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất một kháng thể, trong đó miền Fc bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin mà làm giảm khả năng gắn kết với thụ thể Fc, cụ thể là đối với thụ thể Fc γ .

Theo một khía cạnh, miền Fc của kháng thể của sáng chế bao gồm một hoặc nhiều đột biến axit amin mà làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với 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 siêu phân tử của miền Fc. Cụ thể là, miền Fc bao gồm thay thế axit amin ở vị trí của E233, L234, L235, N297, P331 và P329 (đánh số EU). Cụ thể là, miền Fc bao gồm các thay thế axit amin ở các vị trí 234 và

235 (đánh số EU) và/hoặc 329 (đánh số EU) của các chuỗi nặng của IgG. Cụ thể hơn là, sáng chế đề xuất kháng thể theo sáng chế mà bao gồm miền Fc với các thay thế axit amin L234A, L235A và P329G (“P329G LALA”, đánh số EU) trong các chuỗi nặng của IgG. Các thay thế axit amin L234A và L235A chỉ đột biến được gọi là LALA. Tổ hợp các thay thế axit amin “P329G LALA” gần như loại bỏ hoàn toàn khả năng gắn kết thụ thể Fcγ của miền Fc của IgG1 của người và được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 2012/130831 A1, đơn này cũng mô tả các phương pháp điều chế miền Fc đột biến này và các phương pháp xác định các tính chất của nó như gắn kết thụ thể Fc hoặc các chức năng hiệu ứng.

Các miền Fc với khả năng gắn kết thụ thể Fc giảm đi và/hoặc chức năng hiệu ứng giảm đi bao gồm các miền với thay thế một hoặc nhiều gốc vùng-Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (US 6,737,056). Các biến thể vùng-Fc này bao gồm các vùng-Fc với thay thế ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm thể đột biến vùng-Fc gọi là “DANA” với thay thế các gốc 265 và 297 thành alanin (US 7,332,581).

Theo một khía cạnh khác, miền Fc là miền Fc của IgG4. Các kháng thể IgG4 thể hiện ái lực gắn kết với các thụ thể Fc giảm và các chức năng hiệu ứng giảm so với các kháng thể IgG1. Theo một khía cạnh cụ thể hơn, miền Fc là miền Fc của bao gồm thay thế axit amin ở vị trí S228 (đánh số Kabat), cụ thể là thay thế axit amin S228P. Theo một khía cạnh cụ thể hơn, miền Fc là miền Fc của IgG4 bao gồm các thay thế axit amin L235E và S228P và P329G (đánh số EU). Các thể đột biến miền Fc của IgG4 này và các tính chất gắn kết thụ thể Fcγ của chúng cũng được mô tả trong: WO 2012/130831.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 của người, trong đó kháng thể này bao gồm

- (a) CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43,
- (b) CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44,
- (c) CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45,
- (d) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46,
- (e) CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, và

(f) CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48, và trong đó kháng thể này bao gồm miền Fc với các gốc axit amin 234A, 235A và 329G (đánh số EU) trong các chuỗi nặng của IgG.

Các miền Fc đột biến có thể được điều chế bằng cách làm khuyết đoạn, thay thế, cài xen hoặc cải biến axit amin bằng cách sử dụng các phương pháp di truyền hoặc hoá học đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật 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. Có thể kiểm định các thay đổi nucleotit chính xác, ví dụ bằng cách xác định trình tự.

Có thể dễ dàng xác định khả năng gắn kết với các thụ thể Fc ví dụ, bằng ELISA, hoặc bằng Cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) bằng cách sử dụng các thiết bị chuẩn như thiết bị BIAcore (GE Healthcare), và có thể thu được các thụ thể Fc bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Theo cách khác, có thể đánh giá ái lực gắn kết của các miền Fc hoặc các kháng thể hoạt hoá tế bào bao gồm miền Fc đối với các thụ thể Fc bằng cách sử dụng các dòng tế bào đã biết là biểu hiện các thụ thể Fc cụ thể, như các tế bào NK của người biểu hiện thụ thể FcγIIIa.

Chức năng hiệu ứng của miền Fc, hoặc các kháng thể của sáng chế bao gồm miền Fc, có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thử nghiệm thích hợp để xác định ADCC được mô tả trong bản mô tả này. Các ví dụ khác về các thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của một phân tử quan tâm được mô tả trong: bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5,500,362; Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) và Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985) Hellstrom và các đồng tác giả; bằng độc quyền sáng chế 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 có hoạt tính phóng xạ (xem, ví dụ, thử nghiệm độc tính tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACTITM cho đếm tế bào dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); và thử nghiệm độc tính tế bào không có hoạt tính 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, có thể đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm *in vivo*, ví dụ, trên mô hình động vật

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

Theo một vài khía cạnh, khả năng gắn kết của miền Fc với thành phần bổ thể, cụ thể là với C1q, giảm đi. Do đó, theo một vài phương án, trong đó miền Fc được xử lý bằng công nghệ di truyền để có chức năng hiệu ứng giảm, chức năng hiệu ứng giảm này bao gồm CDC giảm. Có thể tiến hành các thử nghiệm gắn kết C1q để xác định là liệu các kháng thể lưỡng đặc hiệu của sáng chế có thể gắn kết C1q và do đó có hoạt tính CDC. Ví dụ, xem ELISA gắn kết C1q và C3c trong: WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá khả năng hoạt hoá bổ thể, có thể tiến hành thử nghiệm CDC (xem, 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 polynucleotit

Sáng chế còn đề xuất các polynucleotit được phân lập mã hoá một kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này hoặc mảnh của nó.

Các polynucleotit được phân lập mã hoá các kháng thể của sáng chế có thể được biểu hiện dưới dạng polynucleotit đơn mà mã hoá toàn bộ phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc dưới dạng nhiều (ví dụ, hai hoặc nhiều) polynucleotit mà được đồng-biểu hiện. Các polypeptit được mã hoá bởi các polynucleotit mà được đồng-biểu hiện có thể kết hợp thông qua, ví dụ, các liên kết disulfua hoặc các cách thức khác để tạo thành phân tử gắn kết kháng nguyên hoạt động. Ví dụ, phần chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có thể được mã hoá bởi một polynucleotit riêng rẽ với phần chuỗi nặng của globulin miễn dịch này. Khi được đồng-biểu hiện, các polypeptit chuỗi nặng sẽ kết hợp với các polypeptit chuỗi nhẹ để tạo thành globulin miễn dịch này.

Theo một vài khía cạnh, polynucleotit được phân lập mã hoá toàn bộ kháng thể theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án khác, polynucleotit được phân lập mã hoá polypeptit có trong kháng thể theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các phương án nhất định 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 kháng thể 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, phân lập một hoặc nhiều polynucleotit mã hoá kháng thể hoặc polypeptit hoặc các mảnh của chúng, ví dụ, như được mô tả ở trên, và cài xen vào một hoặc nhiều vật truyền để tiếp tục tách dòng và/hoặc biểu hiện trong tế bào vật chủ. Polynucleotit có thể dễ dàng được phân lập và xác định trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường. Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề cập đến vật truyền, tốt hơn là vật truyền biểu hiện, bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit của sáng chế. Các phương pháp đã biết bởi các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để cấu tạo các vật truyền biểu hiện chứa trình tự mã hoá của kháng thể (mảnh) cùng với các tín hiệu kiểm soát phiên mã/dịch mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, các kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp *in vivo* /tái tổ hợp gen. Ví dụ, tham khảo các kỹ thuật đề cập trong 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. Vật truyền biểu hiện có thể là một phần của plasmid, virus, hoặc có thể là mảnh axit nucleic. Vật truyền biểu hiện bao gồm catxet biểu hiện trong đó polynucleotit mã hoá kháng thể hoặc các mảnh polypeptit của chúng (có nghĩa là vùng mã hoá) được tách dòng kết hợp theo cách có điều khiển với gen khởi đầu và/hoặc các yếu tố kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã khác. Như sử dụng trong bản mô tả này, "vùng mã hoá" là đoạn axit nucleic gồm có các codon được dịch mã thành các axit amin. Mặc dù "codon dừng" (TAG, TGA, hoặc TAA) không được dịch mã thành axit amin, có thể xem đơn vị mã này là một phần của vùng mã hoá, nếu có, còn các trình tự bên sườn, ví dụ đoạn khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, đoạn kết thúc phiên mã, các intron, các vùng không dịch mã 5' và 3', và các đoạn mã tương tự không phải là một phần của vùng mã hoá. Có thể có hai hoặc nhiều vùng mã hoá trong một cấu trúc polynucleotit đơn, ví dụ trên một vật truyền đơn nhất, hoặc trong các cấu trúc polynucleotit riêng biệt, ví dụ trên các vật truyền tách biệt (khác nhau). Ngoài ra, vật truyền bất kỳ có thể chứa một vùng mã hoá duy nhất, hoặc bao gồm hai hoặc nhiều vùng mã hoá, ví dụ vật truyền của sáng chế có thể mã hoá một hoặc nhiều polypeptit,

được phân tách sau dịch mã hoặc đồng thời khi dịch mã vào protein thành phẩm bằng cách phân cắt thuỷ phân protein. Ngoài ra, vật truyền, 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 kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của chúng, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của nó. Vùng mã hoá khác loài, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các yếu tố hoặc môtip chuyên biệt, như là peptit tín hiệu bài tiết hoặc một miền hoạt động khác loại. Liên kết theo cách có điều khiển là khi vùng mã hoá cho một sản phẩm gen, ví dụ polypeptit, được kết hợp với một hoặc nhiều trình tự điều hoà theo cách sao cho việc biểu hiện của sản phẩm gen chịu ảnh hưởng hoặc 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 "liên kết theo cách có điều khiển" nếu gây cảm ứng chức năng của gen khởi đầu dẫn đến việc phiên mã mARN mã hoá sản phẩm gen mong muốn và nếu bản chất liên kết giữa hai mảnh ADN không làm ảnh hưởng đến khả năng điều khiển việc biểu hiện sản phẩm gen của trình tự điều hoà biểu hiện hoặc ảnh hưởng đến khả năng phiên mã của khuôn mẫu ADN. Do đó, vùng gen khởi đầu sẽ được liên kết theo cách có điều khiển với axit nucleic mã hoá polypeptit nếu gen khởi đầu có khả năng tác động đến quá trình phiên mã của axit nucleic đó. Gen khởi đầu có thể là gen khởi đầu đặc hiệu tế bào mà điều khiển quá trình phiên mã cơ bản của ADN chỉ ở các tế bào định trước. Các yếu tố kiểm soát phiên mã khác, ngoài gen khởi đầu, ví dụ đoạn tăng cường, đoạn hoạt động, đoạn ức chế, và các yếu tố kết thúc phiên mã, có thể được liên kết theo cách có điều khiển với polynucleotit để điều khiển quá trình phiên mã đặc hiệu tế bào.

Các gen khởi đầu và vùng kiểm soát phiên mã khác thích hợp được bộc lộ trong bản mô tả này. Một loạt vùng kiểm soát phiên mã là đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vùng này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng kiểm soát phiên mã, hoạt động ở tế bào động vật có xương sống, như là, không chỉ giới hạn ở, gen khởi đầu và đoạn tăng cường từ các virus cự bào (ví dụ gen khởi đầu sớm trung gian, kết hợp với intron-A), virus simian 40 (ví dụ gen khởi đầu sớm), và các retrovirus (ví dụ virus Rous sarcoma). Các vùng kiểm soát phiên mã khác bao gồm các vùng thu được từ gen động vật có xương sống như là actin, protein sốc nhiệt, hormon tăng trưởng của bò và α -globin của thỏ, cũng như các trình tự khác có khả năng kiểm soát việc biểu hiện gen ở các tế bào có nhân điển hình. Các vùng kiểm soát

phiên mã thích hợp bổ sung bao gồm các đoạn khởi đầu và đoạn tăng cường đặc hiệu mô cũng như các đoạn khởi đầu cảm ứng (ví dụ đoạn khởi đầu cảm ứng bởi các tetracyclin). Tương tự, nhiều yếu tố kiểm soát dịch mã là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các yếu tố này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vị trí gắn kết ribosom, các codon khởi đầu và kết thúc dịch mã, và các yếu tố thu được từ hệ virus (cụ thể là vị trí nhập ribosom nội bào, hoặc IRES, còn được gọi là trình tự CITE). Catxet biểu hiện có thể còn bao gồm các đặc tính khác như là điểm gốc sao chép, và/hoặc các yếu tố hợp nhất nhiễm sắc thể như là các đoạn lặp đầu tận cùng kéo dài của retrovirus (LTRs), hoặc các đoạn lặp đầu tận cùng đảo ngược (ITR) của virus loại adenovirus (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, mà điều khiển việc bài tiết của polypeptit được mã hoá bởi polynucleotit của sáng chế. Ví dụ, nếu cần bài tiết kháng thể hoặc các mảnh polypeptit của chúng, ADN mã hoá trình tự tín hiệu có thể được đặt phía trước axit nucleic mã hoá một kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó. Theo giả thuyết tín hiệu, các protein do các tế bào động vật có vú bài tiết có peptit tín hiệu hoặc trình tự dẫn đầu bài tiết được phân cắt từ protein trưởng thành khi bắt đầu quá trình tiết xuất chuỗi protein đang tăng trưởng này qua màng lưới nội chất. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết là các polypeptit được bài tiết bởi các tế bào động vật có xương sống nhìn chung có peptit tín hiệu được dung hợp với đầu tận cùng N của polypeptit, mà được phân cắt từ polypeptit đã dịch mã để tạo ra dạng polypeptit được bài tiết hoặc "trưởng thành". Theo các phương án nhất định, sử dụng peptit tín hiệu nguyên thủy, ví dụ peptit tín hiệu chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, hoặc dẫn xuất hoạt động của trình tự đó mà vẫn giữ được khả năng điều khiển bài tiết của polypeptit đó, được liên kết theo cách 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 đầu kiểu hoang có thể được thay thế bằng trình tự dẫn đầu của chất hoạt hoá plasminogen mô của người (TPA) hoặc β -glucuronidaza của chuột.

ADN mã hoá trình tự protein đoạn ngắn có thể được sử dụng để tạo điều kiện cho việc tinh chế sau đó (ví dụ gắn nhãn histidin) hoặc hỗ trợ đánh dấu protein dung

hợp có thể được đưa vào trong đoạn hoặc ở các đầu của đoạn polynucleotit mã hoá một kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit của sáng chế. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ bao gồm một hoặc nhiều vật truyền của sáng chế. Các polynucleotit và các vật truyền có thể kết hợp đặc tính bất kỳ trong số các đặc tính, một cách đơn lẻ hoặc tổ hợp, được mô tả trong bản mô tả này liên quan tương ứng đến các polynucleotit và các vật truyền. Theo một khía cạnh, tế bào vật chủ bao gồm (ví dụ đã được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với) vật truyền bao gồm một polynucleotit mã hoá (một phần của) kháng thể của sáng chế. Như sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào vật chủ" chỉ bất kỳ loại hệ thống tế bào mà có thể được xử lý bằng công nghệ di truyền để tạo ra các protein dung hợp của sáng chế hoặc các mảnh của chúng. Các tế bào vật chủ thích hợp để sao chép và hỗ trợ việc biểu hiện của các phân tử gắn kết kháng nguyên là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các tế bào này có thể được chuyển nhiễm hoặc tải nạp thích hợp với vật truyền biểu hiện cụ thể và những lượng lớn các tế bào chứa vật truyền có thể được nuôi cấy để nhân giống quy mô lớn nhằm thu được phân tử gắn kết kháng nguyên với khối lượng đủ cho các ứng dụng trên lâm sàng. Các tế bào vật chủ thích hợp bao gồm các vi sinh vật tiền nhân, như là *E. coli*, hoặc nhiều loại tế bào có nhân điển hình, như là tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO), các tế bào côn trùng, hoặc các tế bào tương tự. Ví dụ, các polypeptit có thể được sản xuất ở vi khuẩn đặc biệt là khi không cần phải glycosyl hoá. Sau khi biểu hiện, có thể phân lập polypeptit từ khối dịch tế bào vi khuẩn trong phân dịch hoà tan và có thể tinh chế tiếp. Ngoài các vi sinh vật tiền nhân, có nhân điển hình như là nấm dạng sợi hoặc nấm men là các tế bào chủ biểu hiện hoặc tách dòng thích hợp đối với các vật truyền mã hoá polypeptit, kể cả các chủng nấm và nấm men mà chu trình glycosyl hoá của chúng đã được làm tương thích với người, dẫn đến sản xuất polypeptit có kiểu glycosyl hoá một phần hoặc hoàn toàn giống của người. Tham khảo Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004) của Gerngross, và Nat Biotech 24, 210-215 (2006) của Li và các đồng tác giả.

Các tế bào vật chủ thích hợp để biểu hiện các polypeptit (glycosyl hoá) cũng thu được từ các sinh vật đa bào (không có xương sống và có xương sống). Ví dụ các tế bào sinh vật không có xương sống bao gồm tế bào thực vật và côn trùng. Đã xác

định được nhiều chủng baculovirus mà có thể sử dụng kết hợp với các tế bào côn trùng, cụ thể là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*. Cũng có thể sử dụng dịch nuôi cấy tế bào thực vật làm sinh vật chủ. Ví dụ tham khảo các bằng 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 tạo ra kháng thể ở thực vật chuyển gen). Cũng có thể sử dụng tế bào động vật có xương sống làm vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú được làm thích hợp để sinh trưởng trong hỗn dịch cũng có thể hữu ích. Các ví dụ khác về dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 tế bào thận của khỉ được biến nạp với SV40 (COS-7); dòng tế bào thận phôi người (các tế bào 293 hoặc 293T như được mô tả trong, ví dụ, J Gen Virol 36, 59 (1977) của Graham và các đồng tác giả), tế bào thận của chuột đồng con (BHK), các tế bào sertoli của chuột (các tế bào TM4 như được mô tả trong, ví dụ, Biol Reprod 23, 243-251 (1980) của Mather), tế bào thận của khỉ (CV1), tế bào thận của khỉ xanh Châu Phi (VERO-76), tế bào caxinom cổ tử cung của người (HELA), tế bào thận của giống chó (MDCK), tế bào gan của chuột Buffalo (BRL 3A), tế bào phổi của người (W138), tế bào gan của người (Hep G2), tế bào khối u tuyến vú của chuột (MMT 060562), các tế bào TRI (như được mô tả trong, ví dụ, 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 khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO), kể cả các tế bào dhfr⁻ CHO (Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980) của Urlaub và các đồng tác giả); và dòng tế bào tuỷ như là YO, NS0, P3X63 và Sp2/0. Để tổng kết về các dòng tế bào vật chủ thích hợp để sản xuất protein, tham khảo, ví dụ, Methods in Molecular Biology, Tập 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), trang 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 được nuôi cấy của 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, chỉ là một vài ví dụ, ngoài ra còn các tế bào có 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 CHO, tế bào thận phôi của người (HEK) hoặc tế bào lympho (ví dụ, tế bào YO, NS0, Sp20). Các công nghệ tiêu chuẩn để biểu hiện các gen lạ trong các hệ này là đã biết trong lĩnh vực. Các tế bào biểu hiện polypeptit bao gồm chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của một globulin miễn dịch,

có thể được xử lý bằng công nghệ di truyền để biểu hiện một trong hai chuỗi còn lại của globulin miễn dịch đó sao cho sản phẩm được biểu hiện là một globulin miễn dịch có cả hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó, trong đó phương pháp này bao gồm nuôi cấy tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit mã hoá kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó, như được đề xuất trong bản mô tả này, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó, và thu hồi kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó từ tế bào vật chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào vật chủ).

Theo các phương án nhất định, các gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích (ví dụ các mảnh Fab) tạo thành một phần của phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm ít nhất một vùng biến đổi của globulin miễn dịch có khả năng gắn kết với kháng nguyên. Các vùng biến đổi có thể tạo thành một phần và có thể thu được từ các kháng thể có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên và các mảnh của chúng. Các phương pháp để tạo ra các kháng thể đa dòng và các kháng thể đơn dòng là đã biết trong lĩnh vực (tham khảo 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 tạo bằng cách sử dụng quá trình tổng hợp peptit pha rắn, có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp (ví dụ như mô tả trong bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 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 biến đổi.

Globulin miễn dịch của bất kỳ loài động vật nào có thể được sử dụng theo sáng chế. Các globulin miễn dịch không giới hạn mà hữu ích theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ chuột, động vật linh trưởng hoặc người. Nếu protein dung hợp nhằm để sử dụng cho người, có thể sử dụng dạng khảm của globulin miễn dịch, trong đó các vùng ổn định của globulin miễn dịch là của người. Dạng globulin miễn dịch hoàn toàn của người hoặc được làm tương thích với người cũng có thể điều chế theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực (tham khảo, ví dụ bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 5,565,332 cấp cho Winter). Có thể làm tương thích với người bằng nhiều phương pháp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (a) ghép các CDR không phải của người (ví dụ, kháng thể cho) vào các khung và ổn định của người (ví dụ kháng thể nhận) có

hoặc không giữ lại các gốc vùng khung quan trọng (ví dụ các gốc đóng vai trò quan trọng để giữ lại ái lực gắn kết kháng nguyên hoặc các chức năng kháng thể tốt), (b) chỉ ghép các vùng xác định tính đặc hiệu không phải của người (các SDR hoặc a-CDR); các gốc quan trọng đối với tương tác kháng thể-kháng nguyên vào các vùng khung và các vùng ổn định của người, hoặc (c) cấy ghép toàn bộ các miền biến đổi không phải của người, nhưng "bao bọc" các miền này bằng các đoạn giống của người bằng cách thay thế các gốc bề mặt. Các kháng thể được làm tương thích với người và các phương pháp chế tạo chúng được tổng kết trong, ví dụ, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008) của Almagro và Fransson, và còn được mô tả trong, 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 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 Verhoeven và các đồng tác giả; Molec Immun 31(3), 169-217 (1994) của Padlan; Methods 36, 25-34 (2005) của Kashmiri và các đồng tác giả (mô tả ghép SDR (a-CDR)); Mol Immunol 28, 489-498 (1991) của Padlan (mô tả "tái tạo bề mặt"); Methods 36, 43-60 (2005) của Dall'Acqua và các đồng tác giả (mô tả "xáo trộn khung"); và Methods 36, 61-68 (2005) của Osbourn và các đồng tác giả, và Br J Cancer 83, 252-260 (2000) của Klimka và các đồng tác giả (mô tả phương pháp "chọn lọc có định hướng" để xáo trộn khung). Các globulin miễn dịch cụ thể theo sáng chế là các globulin miễn dịch của người. 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 kỹ thuật này. Các kháng thể của người được mô tả trong 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 và thu được từ các kháng thể đơn dòng của người được tạo ra bằng phương pháp tế bào lai (tham khảo ví dụ Monodòng vô tính Antibody Production Techniques and Applications, trang 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Kháng thể của người và các vùng biến đổi của người cũng có thể được điều chế bằng cách cho động vật chuyển gen dùng chất gây miễn dịch mà đã được cải biến để sản xuất kháng thể của người nguyên vẹn hoặc các kháng thể nguyên vẹn có các vùng biến đổi của người

đáp ứng với kích thích kháng nguyên (tham khảo ví dụ Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005) của Lonberg. Kháng thể của người và các vùng biến đổi của người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập các trình tự vùng biến đổi dòng vô tính Fv được chọn lọc từ thư viện bộc lộ thực khuẩn thể thu được từ người (tham khảo trong ví dụ, Methods in Molecular Biology 178, 1-37 của Hoogenboom và các đồng tác giả (O'Brien và các đồng tác giả, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); 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 mảnh kháng thể thông thường bộc lộ của thực khuẩn thể, là các mảnh Fv đơn chuỗi (scFv) hoặc các mảnh Fab.

Theo các khía cạnh nhất định, các kháng thể được xử lý bằng công nghệ di truyền để có ái lực gắn kết tăng cường theo, ví dụ, các phương pháp được bộc lộ trong Công bố đơn PCT: WO 2012/020006 (tham khảo phần Ví dụ đề cập đến làm trưởng thành ái lực) hoặc Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2004/0132066. Khả năng gắn kết với vị trí quyết định tính kháng nguyên đặc hiệu của của các phân tử gắn kết kháng nguyên của sáng chế có thể được xác định bằng ELISA hoặc các kỹ thuật khác tương tự đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (Glyco J 17, 323-329 (2000) của Liljeblad, và các đồng tác giả), và các thử nghiệm gắn kết truyền thống (Endocr Res 28, 217-229 (2002) của Heeley). Có thể sử dụng các thử nghiệm cạnh tranh để nhận dạng một phân tử gắn kết kháng nguyên cạnh tranh với kháng thể tham chiếu gắn kết với một kháng nguyên cụ thể. Theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên cạnh tranh này gắn kết cùng epitop (ví dụ epitop mạch thẳng hoặc cấu dạng) mà phân tử gắn kết kháng nguyên tham chiếu gắn kết. Các phương pháp minh họa chi tiết để lập bản đồ một epitop mà phân tử gắn kết kháng nguyên gắn kết được đề cập trong Morris (1996) "Epitop Mapping Protocols", trong Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Trong thử nghiệm cạnh tranh minh họa, ủ kháng nguyên được cố định trong dung dịch bao gồm một phân tử gắn kết kháng nguyên được đánh dấu thứ nhất mà gắn kết với kháng nguyên và phân tử gắn kết kháng nguyên không được đánh dấu thứ hai mà được thử nghiệm về khả năng cạnh tranh với phân tử gắn kết kháng nguyên thứ nhất về khả năng gắn kết với kháng nguyên. Phân tử gắn kết kháng nguyên thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi tế bào lai. Để làm đối chứng, ủ kháng nguyên được cố định trong dung dịch bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên được đánh dấu thứ nhất mà

không phải là phân tử gắn kết kháng nguyên 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 không gắn kết còn dư, và xác định lượng chất đánh dấu kết hợp với kháng nguyên được cố định. Nếu lượng chất đánh dấu kết hợp với kháng nguyên được cố định về cơ bản giảm đi trong mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng, thì chúng tỏ là phân tử gắn kết kháng nguyên thứ hai cạnh tranh với phân tử gắn kết kháng nguyên thứ nhất về khả năng gắn kết với kháng nguyên. Tham khảo Antibodies: A Laboratory Manual chương 14, của Harlow và Lane (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) (1988).

Các kháng thể của sáng chế được điều chế như được mô tả trong bản mô tả này có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như là sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký trao đổi ion, điện di gel, sắc ký ái lực, sắc ký loại trừ theo kích cỡ, và kỹ thuật tương tự. Các điều kiện thực tế được sử dụng để tinh chế một protein cụ thể sẽ tùy thuộc, một phần vào các yếu tố như là điện tích thực, tính không ưa nước, tính ưa nước v.v. và là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực. Để tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký ái lực, có thể sử dụng kháng thể, phối tử, thụ thể hoặc kháng nguyên mà phân tử gắn kết kháng nguyên có chứa-trime phối tử TNF gắn kết với. Ví dụ, để tinh chế các protein dung hợp của sáng chế bằng sắc ký ái lực, có thể sử dụng chất nền với protein A hoặc protein G. Có thể sử dụng sắc ký ái lực Protein A hoặc protein G và sắc ký loại trừ theo kích cỡ để phân lập phân tử gắn kết kháng nguyên về cơ bản như mô tả trong phần Ví dụ của sáng chế. Có thể xác định độ tinh khiết của phân tử gắn kết kháng nguyên có chứa-trime phối tử TNF hoặc các mảnh của nó bằng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp phân tích đã biết, bao gồm điện di gel, sắc ký lỏng hiệu năng cao, và các phương pháp tương tự. Ví dụ, các phân tử gắn kết kháng nguyên được biểu hiện như mô tả trong phần Ví dụ của sáng chế đã chứng tỏ là còn nguyên vẹn và được lắp ráp đúng cách được chứng tỏ theo SDS-PAGE khử và không khử.

Các thử nghiệm

Các phân tử gắn kết kháng nguyên được đề xuất trong bản mô tả này có thể được nhận dạng, sàng lọc hoặc xác định các tính chất vật lý/hoá học của chúng và/hoặc các hoạt tính sinh học bằng nhiều loại thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

1. Các thử nghiệm ái lực

Ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên đối với kháng nguyên tế bào 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. Phương án minh họa cụ thể và nêu ví dụ để xác định ái lực gắn kết được mô tả dưới đây và trong phần Ví dụ 4. Theo một khía cạnh, xác định K_D bằng cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng máy BIACORE® T100 (GE Healthcare) ở 25°C.

2. Các thử nghiệm gắn kết và các thử nghiệm khác

Theo một khía cạnh, một kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này được thử nghiệm về hoạt tính gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng cách phương pháp đã biết như ELISA, phương pháp thẩm tách Western, v.v.

3. Các thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các thử nghiệm để nhận dạng kháng thể kháng-CD19 của người có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, ức chế tăng sinh tế bào B hoặc giết các tế bào B. Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể có hoạt tính sinh học này in vivo và/hoặc in vitro.

Theo các phương án nhất định, một kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này được thử nghiệm về hoạt tính sinh học này.

Các dược phẩm, chế phẩm và đường dùng

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất các dược phẩm bao gồm kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp điều trị nêu dưới đây. Theo một phương án, dược phẩm bao gồm một kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này và ít nhất một tá dược được dùng. Theo một phương án khác, dược phẩm bao gồm kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này và ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ như được mô tả dưới đây.

Dược phẩm của sáng chế bao gồm lượng hữu hiệu điều trị của một hoặc nhiều kháng thể được hoà tan hoặc phân tán trong tá dược được dùng. Thuật ngữ "dược

phẩm hoặc được dụng" chỉ các phân tử và thành phần nhìn chung không độc đối với đối tượng tiếp nhận ở các mức liều và nồng độ được sử dụng, có nghĩa là không gây ra phản ứng bất lợi, dị ứng hoặc không mong muốn khác khi sử dụng cho động vật, ví dụ như người, khi thích hợp. Việc bào chế được phẩm chứa ít nhất một kháng thể và tùy ý một thành phần hoạt tính bổ sung là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ tham khảo Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, được viện dẫn ở đây bằng cách tham khảo. Cụ thể là, các chế phẩm là chế phẩm đông khô hoặc dung dịch nước. Như sử dụng trong bản mô tả này, "tá được dụng" bao gồm bất kỳ và mọi dung môi, chất đệm, môi trường phân tán, chất bao, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hoá, chất bảo quản (ví dụ các chất kháng khuẩn, các chất chống nấm), các chất đẳng trương, các muối, các chất làm ổn định và hỗn hợp của chúng như đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

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 vết thương, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong bắp cơ, trong tuỷ sống hoặc trong màng bụng. Để tiêm, các phân tử gắn kết kháng nguyên của sáng chế có thể được tạo thành chế phẩm ở dạng dung dịch nước, tốt hơn là trong các chất đệm tương hợp về mặt sinh lý như là dung dịch Hanks', dung dịch Ringer's, hoặc dung dịch nước muối sinh lý. Dung dịch này có thể chứa các chất bào chế như là các chất tạo hỗn dịch, làm ổn định và/hoặc phân tán. Theo cách khác, các protein dung hợp có thể ở dạng bột để hoàn nguyên với chất dẫn thích hợp, ví dụ, nước vô khuẩn không có chí nhiệt tố trước khi sử dụng. Dung dịch để tiêm vô khuẩn được bào chế bằng cách kết hợp các protein dung hợp của sáng chế với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với nhiều loại thành phần nêu trên, nếu cần. Có thể dễ dàng đạt được độ vô khuẩn, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô khuẩn. Nhìn chung, các hệ phân tán được bào chế bằng cách kết hợp nhiều thành phần hoạt tính được làm vô khuẩn vào chất dẫn vô khuẩn có chứa môi trường phân tán cơ bản và/hoặc các thành phần khác. Trong trường hợp các bột vô khuẩn để pha thành dung dịch, hỗn dịch hoặc nhũ tương để tiêm vô khuẩn các phương pháp bào chế được ưu tiên là sấy chân không hoặc sấy đông khô tạo ra bột thành phần hoạt tính và thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ môi trường lỏng được lọc-vô khuẩn trước đó của chúng. Môi trường lỏng cần phải được tạo đệm thích hợp nếu cần và

chất pha loãng trước hết phải được làm đẳng trương trước khi tiêm bằng dung dịch nước muối hoặc glucoza với lượng vừa đủ. Chế phẩm cần phải ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản, và được bảo quản chống lại tác dụng gây ô nhiễm của các vi sinh vật, như là vi khuẩn và nấm mốc. Cần phải hiểu rằng nhiễm nội độc tố cần phải giữ tối thiểu ở mức an toàn, ví dụ, $< 0,5$ ng/mg protein. Các tá dược được dùng thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ 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 octadexyldimethylbenzyl ammonium clorua; hexamethonium clorua; benzalkonium clorua; benzethonium clorua; phenol, rượu butylic hoặc benzylic; các alkyl paraben như là metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); các protein, như là albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme thân nước như là polyvinylpyrrolidon; các axit amin như là glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; các monosacarit, các disacarit, và các hydrat cacbon khác kể cả glucoza, mannoza, hoặc các dextrin; các chất tạo phức kim loại 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 hợp Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như là polyetylen glycol (PEG). Các hỗn dịch tiêm trong nước có thể chứa các hợp chất làm tăng độ nhớt của hỗn dịch này, như là natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, dextran, hoặc các chất tương tự. Tuy chọn, hỗn dịch này cũng có thể chứa các chất làm ổn định thích hợp hoặc các chất làm tăng độ tan của các hợp chất để cho phép bào chế các dung dịch có độ đậm đặc cao. Ngoài ra, các hỗn dịch chứa các hợp chất có hoạt tính có thể được bào chế dưới dạng hỗn dịch tiêm trong 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 các liposom.

Các thành phần hoạt tính có thể được bẫy trong các vi nang, ví dụ, bằng cách kỹ thuật đông ngưng tụ hoặc bằng cách polyme hoá bề mặt phân cách, ví dụ, hydroxymethylxenluloza hoặc các vi nang-gelatin và poly-(metylmetyxylat), trong các hệ phân tán thuốc thể keo (ví dụ, các liposom, vi cầu albumin, vi nhũ hương, các hạt nano và các nang kích thước nano) hoặc trong các nhũ tương kích thước pha phân tán lớn. Các kỹ thuật này được đề cập trong Remington's Pharmaceutical Sciences (18th

Ed. Mack Printing Company, 1990). Có thể bào chế các chế phẩm giải phóng kéo dài. Ví dụ thích hợp các chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm các hệ phân tán bán thấm của các polyme dạng rắn ưa dầu chứa polypeptit, hệ phân tán này ở dạng các chất có hình dạng nhất định, ví dụ các màng hay vi nang. Theo các phương án cụ thể, có thể có được sự hấp thu kéo dài từ chế phẩm tiêm bằng cách sử dụng các chất làm chậm quá trình hấp thu trong các chế phẩm này ví dụ, nhôm monostearat, gelatin hoặc hỗn hợp của chúng.

Các tá dược được dùng minh họa trong bản mô tả này còn bao gồm các chất phân tán thuốc kể tế bào như các glycoprotein hyaluronidaza hoạt tính-trung tính hoà tan (sHASEGP), ví dụ, glycoprotein hyaluronidaza PH-20 hoà tan của người, như rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Các sHASEGP và phương pháp sử dụng, bao gồm rHuPH20, ví dụ được mô tả trong các Công bố đơn sáng chế của Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza bổ sung như chondroitinaza.

Các chế phẩm kháng thể đông khô ví dụ được mô tả trong bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 6,267,958. Chế phẩm kháng thể trong nước bao gồm các chế phẩm được mô tả trong bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 6,171,586 và Công bố Đơn sáng chế quốc tế số WO2006/044908, chế phẩm trong tài liệu này bao gồm chất đệm histidin-axetat.

Ngoài các chế phẩm nêu trên, cũng có thể bào chế các protein dung hợp dưới dạng chế phẩm 'depot'. Các chế phẩm tác dụng kéo dài này có thể sử dụng bằng cách cấy (ví dụ dưới da hoặc trong bắp cơ) hoặc bằng cách tiêm bắp. Do đó, ví dụ, các protein dung hợp có thể được bào chế với các chất polyme hoặc ưa dầu thích hợp (ví dụ dưới dạng nhũ tương trong dầu được dùng) hoặc các nhựa trao đổi, hoặc dưới dạng các dẫn xuất ít tan, ví dụ, dưới dạng một muối ít tan.

Các dược phẩm bao gồm các protein dung hợp của sáng chế có thể được sản xuất bằng cách trộn, hoà tan, nhũ hoá, tạo nang, sấy tạo vi nang hoặc đông khô thông thường. Có thể bào chế các dược phẩm theo cách thức thông thường sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc các chất phụ trợ chấp nhận được về mặt sinh lý, các chất này tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình xử lý chế biến các

protein thành các chế phẩm có thể sử dụng như dược phẩm. Chế phẩm thích hợp tùy thuộc vào đường dùng được chọn.

Kháng thể này của sáng chế có thể được bào chế thành chế phẩm ở dạng axit hoặc bazơ tự do, dạng trung tính hoặc dạng muối. Các muối được dùng là các muối về cơ bản vẫn giữ được hoạt tính sinh học của axit hoặc bazơ tự do. Các muối này bao gồm muối cộng axit, ví dụ các muối được tạo thành với các nhóm amin tự do của chế phẩm protein, hoặc được tạo thành với các axit vô cơ ví dụ, axit clohydric hoặc phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như axit axetic, oxalic, tartaric hoặc mandelic. Các muối được tạo thành với các nhóm carboxyl tự do cũng có thể thu được từ các bazơ vô cơ như là natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt hydroxit; hoặc bazơ hữu cơ như là isopropylamin, trimetylamin, histidin hoặc procain. Các muối được dùng có xu hướng dễ tan hơn trong nước và các dung môi phân cực khác so với dạng bazơ tự do tương ứng.

Chế phẩm trong bản mô tả này cũng có thể chứa nhiều hơn một thành phần có hoạt tính nếu cần thiết cho một chỉ định cụ thể đang điều trị, tốt hơn là các thành phần có hoạt tính bổ trợ không gây ảnh hưởng bất lợi lẫn nhau. Các thành phần hoạt tính này là có mặt thích hợp với lượng kết hợp hữu hiệu cho mục đích dự định.

Các chế phẩm để sử dụng *in vivo* nhìn chung là vô khuẩn. Có thể đạt được độ vô khuẩn, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô khuẩn.

Các chế phẩm và phương pháp điều trị

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng-CD19 của người được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị, đơn độc hoặc kết hợp với, dưới dạng kháng thể đơn đặc hiệu hoặc dưới dạng kháng thể đa đặc hiệu.

CD19 được biểu hiện trên phần lớn các tế bào B (chất đánh dấu tế bào B-pan) ngoại trừ các tế bào gốc và các tương bào, và thường được biểu hiện trên phần lớn các bệnh ác tính tế bào B của người (kháng nguyên liên quan đến khối u), như u lympho và các bệnh bạch cầu trừ đa u tủy, ví dụ trong u lympho không-Hodgkin và bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính.

Các kháng thể lưỡng đặc hiệu nhận biết hai protein bề mặt tế bào ở các quần thể tế bào khác nhau hứa hẹn tái điều khiển các tế bào miễn dịch độc tính tế bào đến phá huỷ các tế bào đích gây bệnh.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng-CD19 của người để sử dụng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng-CD19 của người để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư tế bào B. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng-CD19 của người để sử dụng trong phương pháp điều trị. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng-CD19 của người để sử dụng trong phương pháp điều trị cá thể mắc bệnh ung thư tế bào B bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng-CD19 của người. Theo một phương án này, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng-CD19 của người để sử dụng làm suy kiệt các tế bào B. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng-CD19 của người để sử dụng trong phương pháp làm suy kiệt các tế bào B ở một cá thể bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng-CD19 của người để làm suy kiệt các tế bào B. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên tốt hơn là người. Bệnh ung thư tế bào B theo một phương án là u lympho tế bào B hoặc bệnh bạch cầu tế bào B. Theo một phương án, bệnh ung thư tế bào B là u lympho không-Hodgkin hoặc bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng-CD19 của người để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch ung thư. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng-CD19 của người để sử dụng trong phương pháp liệu pháp miễn dịch ung thư. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng-CD19 của người trong sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc này là để điều trị bệnh ung thư tế bào B. Theo một phương án khác, thuốc này là để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh ung thư tế bào B bao gồm việc cho cá thể mắc bệnh ung thư tế bào B dùng lượng hữu hiệu của thuốc này. Theo một phương án này, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, như được mô tả dưới đây. Theo một phương án khác,

thuốc này là để làm suy kiệt các tế bào B. Theo một phương án khác, thuốc này là để sử dụng trong phương pháp làm suy kiệt các tế bào B ở một cá thể bao gồm việc cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu của thuốc để làm suy kiệt các tế bào B. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là người. Bệnh ung thư tế bào B theo một phương án là u lympho tế bào B hoặc bệnh bạch cầu tế bào B. Theo một phương án, bệnh ung thư tế bào B là u lympho không-Hodgkin hoặc bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư tế bào B. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể mắc bệnh ung thư tế bào B này dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể kháng-CD19 của người. Theo một phương án này, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, như được mô tả dưới đây. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là người. Bệnh ung thư tế bào B theo một phương án là u lympho tế bào B hoặc bệnh bạch cầu tế bào B. Theo một phương án, bệnh ung thư tế bào B là u lympho không-Hodgkin hoặc bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp để làm suy kiệt các tế bào B ở một cá thể. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng-CD19 của người để làm suy kiệt các tế bào B. Theo một phương án, “cá thể” là người. Bệnh ung thư tế bào B theo một phương án là u lympho tế bào B hoặc bệnh bạch cầu tế bào B. Theo một phương án, bệnh ung thư tế bào B là u lympho không-Hodgkin hoặc bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất các dược phẩm bao gồm kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng-CD19 của người như được báo cáo trong bản mô tả này, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp điều trị nêu trên. Theo một phương án, dược phẩm bao gồm kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng-CD19 của người như được báo cáo trong bản mô tả này và chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm bao gồm kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng-CD19 của người như được báo cáo trong bản mô tả này và ít nhất một chất trị liệu bổ sung.

Các kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này có thể được sử dụng đơn độc hoặc kết hợp với các chất khác trong một liệu pháp. Ví dụ, một kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này có thể được cho dùng với ít nhất một chất trị liệu bổ sung.

Các liệu pháp kết hợp nêu trên bao gồm sử dụng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều chất trị liệu được bao gồm trong cùng chế phẩm hoặc các chế phẩm riêng rẽ), và sử dụng riêng rẽ, trong trường hợp này, sử dụng kháng thể này như được báo cáo trong bản mô tả này có thể là trước khi, đồng thời và/hoặc sau khi sử dụng chất hoặc các chất trị liệu bổ sung. Theo một phương án, sử dụng kháng thể kháng-CD19 của người và sử dụng chất trị liệu bổ sung có thể cách nhau một tháng, hoặc cách nhau khoảng một, hai hoặc ba tuần hoặc cách nhau khoảng một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu ngày.

Một kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này (và chất trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể được sử dụng theo cách thích hợp bất kỳ, bao gồm sử dụng ngoài đường tiêu hoá, trong phổi, và trong mũi, và, nếu muốn để sử dụng điều trị tại chỗ, trong chỗ tổn thương. Sử dụng tiêm truyền ngoài đường tiêu hoá bao gồm sử dụng trong bắp cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong màng bụng hoặc dưới da. Có thể qua đường dùng thích hợp bất kỳ, ví dụ bằng cách tiêm, như tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, tùy thuộc một phần vào việc sử dụng là trong thời gian ngắn hay mãn tính. Nhiều phác đồ dùng liều khác nhau bao gồm nhưng không giới hạn ở, sử dụng liều đơn nhất hoặc nhiều liều tại các thời điểm khác nhau, sử dụng liều cao, và tiêm truyền theo nhịp cũng được dự định trong bản mô tả này.

Các kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này sẽ được bào chế, định liều, và sử dụng theo cách phù hợp với thực hành y học tốt. Các yếu tố cần cân nhắc trong bối cảnh này bao gồm rối loạn bệnh cụ thể sẽ điều trị, động vật có vú cụ thể sẽ điều trị, tình trạng lâm sàng của cá thể bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn bệnh này, vị trí chuyển vận tác nhân trị liệu, phương pháp sử dụng, lịch trình sử dụng, và các yếu tố khác đã biết đối với bác sỹ hành nghề. Kháng thể này không nhất thiết, nhưng tùy ý được bào chế với một hoặc nhiều chất hiện được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị rối loạn bệnh quan tâm. Lượng hữu hiệu của các chất khác này tùy thuộc vào liều lượng của kháng thể có mặt trong chế phẩm, loại bệnh hoặc rối loạn bệnh điều trị, và các yếu tố khác nêu trên. Các chất này nhìn chung được sử dụng với liều lượng và

đường dùng như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc trong khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được mô tả trong bản mô tả này, hoặc với liều lượng bất kỳ và đường dùng bất kỳ được xác định trên thực tiễn/lâm sàng là thích hợp.

Để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của của một kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này (khi được sử dụng đơn độc hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác) sẽ tùy thuộc vào loại bệnh sẽ điều trị, loại kháng thể, mức độ nghiêm trọng và tiến trình của bệnh, việc kháng thể này được sử dụng nhằm mục đích ngăn ngừa hoặc trị liệu, liệu pháp trước đó, bệnh sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với kháng thể này và quyết định của bác sĩ điều trị. Kháng thể này được sử dụng thích hợp cho bệnh nhân ở một thời điểm hoặc qua các đợt điều trị. Tùy thuộc vào loại bệnh và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng từ 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 15 mg/kg (ví dụ 0,5 mg/kg -10 mg/kg) kháng thể này có thể là liều lượng thăm dò ban đầu để sử dụng cho bệnh nhân ví dụ, bằng cách sử dụng một hoặc nhiều lần riêng rẽ, hoặc bằng cách tiêm truyền liên tục. Liều lượng hàng ngày thông thường nằm trong khoảng từ 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg hoặc cao hơn, tùy thuộc vào các yếu tố nêu trên. Để sử dụng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị nhìn chung sẽ được duy trì cho đến khi đạt được mức ức chế các triệu chứng bệnh mong muốn. Liều lượng ví dụ của kháng thể này nằm trong khoảng từ 0,05 mg/kg đến 10 mg/kg . Do đó, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5 mg/kg , 2,0 mg/kg , 4,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc kết hợp bất kỳ các liều này) 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 hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ khoảng sáu liều kháng thể này). Liều tấn công cao hơn ban đầu, tiếp đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được sử dụng. Tuy nhiên, các phác đồ liều lượng khác có thể là hữu ích. Tiến triển của liệu pháp này được theo dõi dễ dàng bằng các kỹ thuật và thử nghiệm đã biết.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp để điều trị bệnh viêm nhiễm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh vẩy nến, và bệnh về xương, bao gồm cho bệnh nhân đã được chẩn đoán mắc bệnh này (và do đó cần liệu pháp này) dùng một kháng thể gắn kết đặc hiệu với CD19 của người như được báo cáo trong bản mô tả này. Kháng thể này có thể được sử dụng đơn độc, trong một dược phẩm, hoặc theo cách khác kết hợp với các thuốc khác để điều trị bệnh viêm nhiễm, bệnh tự miễn,

viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương. Kháng thể này được sử dụng với lượng hữu hiệu được dụng.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng một kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này để điều trị bệnh viêm nhiễm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh vẩy nến hoặc bệnh về xương, và để sản xuất được phẩm bao gồm một kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp để sản xuất được phẩm bao gồm một kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này

Sáng chế còn đề xuất một kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này để điều trị bệnh viêm nhiễm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng một kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này để sản xuất được phẩm để điều trị bệnh viêm nhiễm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương. Kháng thể này được sử dụng với lượng hữu hiệu được dụng.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng một kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này để sản xuất được phẩm để điều trị bệnh viêm nhiễm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, bệnh luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương. Kháng thể này được sử dụng với lượng hữu hiệu được dụng.

Nên hiểu là chế phẩm hoặc phương pháp bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc các phương pháp điều trị nêu trên có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể tiếp hợp miễn dịch như được báo cáo trong bản mô tả này thay cho hoặc ngoài kháng thể kháng-CD19 của người.

Các chất khác và điều trị

Các phân tử gắn kết kháng nguyên của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất khác trong một liệu pháp. Ví dụ, một phân tử gắn kết kháng nguyên 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 mà có thể 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 một chất chống ung thư khác.

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

Các liệu pháp 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 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.

Chế phẩm

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất chế phẩm có chứa các chất hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn nêu trên. Chế phẩm bao gồm bao gói và nhãn hoặc hướng dẫn sử dụng hoặc kết hợp với bao gói này. Bao gói thích hợp, bao gồm, ví dụ, chai, lọ, xi-ranh, túi dịch truyền tĩnh mạch, v.v. Các bao gói có thể được làm từ nhiều loại vật liệu như là thủy 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 tình 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 trime phối tử TNF của sáng chế.

Nhãn hoặc hướng dẫn sử dụng chỉ rõ chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý chọn lựa. Hơn nữa, chế 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 của sáng chế; và (b) bao gói thứ hai có chứa một chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm này còn bao gồm tác nhân trị liệu gây độc tế bào hoặc tác nhân trị liệu khác.

Chế 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, chế phẩm còn có thể bao gồm bao gói thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm chất đệm được dụng, như là nước kim khuẩn để tiêm (BWFI), nước muối được đệm-phosphat, dung dịch Ringer's 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, pha loãng, màng lọc, kim tiêm và xi-ranh khác.

Bảng C (Các trình tự):

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
1	ngoại miền CD19 của người	UniProt no. P15391, AA
2	ngoại miền CD19 của khí đầu chó	AA
3	Trình tự nucleotit của chuỗi lỗ Fc	xem Bảng 2
4	Trình tự nucleotit của chuỗi nốt phòng Fc kháng nguyên CD19 của người nhân Avi	xem Bảng 2
5	Chuỗi lỗ Fc	xem Bảng 2
6	chuỗi nốt phòng Fc kháng nguyên CD19 của người nhân avi	xem Bảng 2
7	Trình tự nucleotit của chuỗi nốt phòng Fc kháng	xem Bảng 2

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
	nguyên CD19 của khỉ đầu chó nhãn Avi	
8	chuỗi nốt phòng Fc kháng nguyên CD19 của khỉ đầu chó nhãn Avi	xem Bảng 2
9	Trình tự nucleotit của CD19 (8B8) VH Dòng vô tính gốc	CAAGTTCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAA GTAAAAAACC GGCGCTTCCGTTAAAGT GAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTTCAC TGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGC CCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCT ACATTAACCCATACAACGACGGTTCCAAA TATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCAC GATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGC GTACATGGAAGTGTCTAGACTGCGTTCTGA CGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGG TACTTACTACTACGGTTCCGCCCTCTTTGA TTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCG TAAGCTCT
10	Trình tự nucleotit của CD19 (8B8) VL Dòng vô tính gốc	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCT CTGTCCGTGACCCCGGGTCAGCCAGCGAG CATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCTGGA AAACTCCAACGGCAACACGTACCTGAACT GGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCG CAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGC TTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCAGCGGT TCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAA ATCAGCCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGG

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		CGTCTACTATTGTCTGCAGTTGACCCACGT TCCGTACACCTTCGGTCAAGGAACTAACT GGAAATTAAA
11	CD19 L1 ngẫu nhiên ngược chiều	xem Bảng 4
12	CD19 L2 ngẫu nhiên xuôi chiều	xem Bảng 4
13	CD19 H1 ngẫu nhiên ngược chiều	xem Bảng 4
14	CD19 H2 ngẫu nhiên xuôi chiều	xem Bảng 4
15	CD19 H3 ổn định ngược chiều	xem Bảng 4
16	LMB3	xem Bảng 4
17	CD19 L1 ổn định xuôi chiều	xem Bảng 5
18	CD19 L3 ngẫu nhiên ngược chiều	xem Bảng 5
19	CD19 L3 ổn định xuôi chiều	xem Bảng 5
20	CD19 H3 ngẫu nhiên ngược chiều	xem Bảng 5

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
21	Trình tự nucleotit của SNAP nhân CD19 của người ECD- PDGFR	GGCCGCCGCTAGCGGCATCGACTACAAGG ACGACGATGACAAGGCCGGCATCGATGCC ATCATGGACAAAGACTGCGAAATGAAGCG CACCACCCTGGATAGCCCTCTGGGCAAGC TGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTG CACGAGATCAAGCTGCTGGGCAAAGGAAC ATCTGCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCCTG CCCCAGCCGCCGTGCTGGGCGGACCAGAG CCACTGATGCAGGCCACCGCCTGGCTCAA CGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCCATCGA GGAGTTCCCTGTGCCAGCCCTGCACCACCC AGTGTTCCAGCAGGAGAGCTTTACCCGCC AGGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGTG AAGTTCGGAGAGGTCATCAGCTACCAGCA GCTGGCCGCCCTGGCCGGCAATCCCGCCG CCACCGCCGCCGTGAAAACCGCCCTGAGC GGAAATCCCGTGCCCATCTGATCCCCTGC CACCGGGTGGTGTCTAGCTCTGGCGCCGTG GGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGTGAA AGAGTGGCTGCTGGCCCACGAGGGCCACA GACTGGGCAAGCCTGGGCTGGGTGATATC CCCGAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGA AGAGGGCGACAATGCCGTGCTGCAGTGCC TGAAGGGCACCTCCGATGGCCCTACCCAG CAGCTGACCTGGTCCAGAGAGAGCCCCCT GAAGCCCTTCCTGAAGCTGTCTCTGGGCCT GCCTGGCCTGGGCATCCATATGAGGCCTCT GGCCATCTGGCTGTTTCATCTTCAACGTGTC

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		CCAGCAGATGGGCGGCTTCTACCTGTGTCA GCCTGGCCCCCATCTGAGAAGGCTTGGC AGCCTGGCTGGACCGTGAACGTGGAAGGA TCCGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGTGTCC GATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAA GAACAGATCTAGCGAGGGCCCCAGCAGCC CCAGCGGCAAACCTGATGAGCCCCAAGCTG TACGTGTGGGCCAAGGACAGACCCGAGAT CTGGGAGGGCGAGCCTCCTTGCCTGCCCCC TAGAGACAGCCTGAACCAGAGCCTGAGCC AGGACCTGACAATGGCCCCTGGCAGCACA CTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACCCGA CTCTGTGTCTAGAGGCCCTCTGAGCTGGAC CCACGTGCACCCTAAGGGCCCTAAGAGCC TGCTGAGCCTGGAACCTGAAGGACGACAGG CCCGCCAGAGATATGTGGGTCATGGAAAC CGGCCTGCTGCTGCCTAGAGCCACAGCCC AGGATGCCGGCAAGTACTACTGCCACAGA GGCAACCTGACCATGAGCTTCCACCTGGA AATCACCGCCAGACCCGTGCTGTGGCACT GGCTGCTGAGAACAGGCGGCTGGAAGGTC GACGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGA TCTGAATGCTGTGGGCCAGGACACGCAGG AGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCT TTAAGGTGGTGGTGATCTCAGCCATCCTGG CCCTGGTGGTGCTCACCATCATCTCCCTTA TCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGC CACGT

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
22	Trình tự nucleotit của SNAP nhãn CD19 của khí đầu chó ECD- PDGFR	CCGGCCGCCGCTAGCGGCATCGACTACAA GGACGACGATGACAAGGCCGGCATCGATG CCATCATGGACAAAGACTGCGAAATGAAG CGCACCACCCTGGATAGCCCTCTGGGCAA GCTGGAAGTGTCTGGGTGCGAACAGGGCC TGCACGAGATCAAGCTGCTGGGCAAAGGA ACATCTGCCGCCGACGCCGTGGAAGTGCC TGCCCCAGCCGCCGTGCTGGGCGGACCAG AGCCACTGATGCAGGCCACCGCCTGGCTC AACGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCCATC GAGGAGTTCCCTGTGCCAGCCCTGCACCA CCCAGTGTTCCAGCAGGAGAGCTTTACCC GCCAGGTGCTGTGGAAACTGCTGAAAGTG GTGAAGTTCGGAGAGGTCATCAGCTACCA GCAGCTGGCCGCCCTGGCCGGCAATCCCG CCGCCACCGCCGCCGTGAAAACCGCCCTG AGCGGAAATCCCGTGCCCATCTGATCCCC TGCCACCGGGTGGTGTCTAGCTCTGGCGCC GTGGGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGT GAAAGAGTGGCTGCTGGCCACGAGGGCC ACAGACTGGGCAAGCCTGGGCTGGGTGAT ATCCCCCAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGT GGAAGAGGGCGACAATGCCGTGCTCCAGT GTCTCGAGGGCACCTCCGATGGCCCTACA CAGCAGCTCGTGTGGTGCAGAGACAGCCC CTTGAGCCCTTCCTGAACCTGTCTCTGGG CCTGCCTGGCATGGGCATCAGAATGGGCC CTCTGGGCATCTGGCTGCTGATCTTCAACG

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		TGTCCAACCAGACCGGCGGCTTCTACCTGT GTCAGCCTGGCCTGCCAAGCGAGAAGGCT TGGCAGCCTGGATGGACCGTGTCCGTGGA AGGATCTGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACG TGTCCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGC CTGAAGAACAGAAGCAGCGAGGGGCCCTAG CAGCCCCAGCGGCAAGCTGAATAGCAGCC AGCTGTACGTGTGGGCCAAGGACAGACCC GAGATGTGGGAGGGCGAGCCTGTGTGTGG CCCCCCTAGAGATAGCCTGAACCAGAGCC TGAGCCAGGACCTGACAATGGCCCCTGGC AGCACACTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCC ACCCGACTCTGTGTCCAGAGGGCCCTCTGAG CTGGACACACGTGCGGCCTAAGGGGCCCTA AGAGCAGCCTGCTGAGCCTGGAAGTGAAG GACGACCGGCCCCGACCGGGATATGTGGGT GGTGGATACAGGCCTGCTGCTGACCAGAG CCACAGCCCAGGATGCCGGCAAGTACTAC TGCCACAGAGGCAACTGGACCAAGAGCTT TTACCTGGAAATCACCGCCAGACCCGCCCT GTGGCACTGGCTGCTGAGAATCGGAGGCT GGAAGGTCGACGAGCAGAAGCTGATCTCC GAAGAGGACCTGAACGCCGTGGGCCAGGA TACCCAGGAAGTGATCGTGGTGCCCCACA GCCTGCCCTTCAAGGTGGTTCGTGATCAGCG CCATTCTGGCCCTGGTGGTGCTGACCATCA TCAGCCTGATCATCCTGATTATGCTGTGGC AGAAAAAGCCCCGC

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
23	SNAP nhãn CD19 của người ECD- PDGFR	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCEMKR TTLDSPLGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTS ADAVEVPAPAAVLGGPEPLMQATAWLNAY FHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLW KLLKVVKFGEVISYQQLAALAGNPAATAAV KTALSGNPVPILIPCHRVVSSSGAVGGYEGG LAVKEWLLAHEGHRLGKPGGLGDIPEEPLVV KVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRES PLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVS QQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEG SGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPS GKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRD SLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSR GPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDM WVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTM SFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVDEQKLI SEEDLNAVGGQDTQEIVVPHSLPFKVVVISAI LALVVLTHSLIILIMLWQKKPR
24	SNAP nhãn của khí đầu chó CD19 ECD- PDGFR	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCEMKR TTLDSPLGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTS ADAVEVPAPAAVLGGPEPLMQATAWLNAY FHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLW KLLKVVKFGEVISYQQLAALAGNPAATAAV KTALSGNPVPILIPCHRVVSSSGAVGGYEGG LAVKEWLLAHEGHRLGKPGGLGDIPEEPLVV KVEEGDNAVLQCLEGTSDGPTQQLVWCRDS PFEPFLNLSLGLPGMGIRMGPLGIWLLIFNVS NQTGGFYLCQPGLPSEKAWQPGWTVSVEGS

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		GELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSG KLNSSQLYVWAKDRPEMWEGETVCGPPRDS LNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRG PLSWTHVRPKGPKSSLLSLELKDDRPDRDM WVVDLTGLLLTRATAQDAGKYYCHRGJWT KSFYLEITARPALWHWLLRIGGWKVDEQKLI SEEDLNAVVGQDTQEIVVPHSLPFFKVVVISAI LALVVLTHSLIILIMLWQKKPR
25	CD19 (8B8-5H09) CDR- L1	xem Bảng 7
26	CD19 (8B8-5H09) CDR- L2	xem Bảng 7
27	CD19 (8B8-5H09) CDR- L3	xem Bảng 7
28	CD19 (8B8-5H09) CDR- H1	xem Bảng 8
29	CD19 (8B8-5H09) CDR- H2	xem Bảng 8
30	CD19 (8B8-5H09) CDR- H3	xem Bảng 8
31	CD19 (8B8-7H07) CDR- L1	xem Bảng 7
32	CD19 (8B8-7H07) CDR- L2	xem Bảng 7

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
33	CD19 (8B8-7H07) CDR-L3	xem Bảng 7
34	CD19 (8B8-7H07) CDR-H1	xem Bảng 8
35	CD19 (8B8-7H07) CDR-H2	xem Bảng 8
36	CD19 (8B8-7H07) CDR-H3	xem Bảng 8
37	CD19 (8B8-2B03) CDR-L1	xem Bảng 7
38	CD19 (8B8-2B03) CDR-L2	xem Bảng 7
39	CD19 (8B8-2B03) CDR-L3	xem Bảng 7
40	CD19 (8B8-2B03) CDR-H1	xem Bảng 8
41	CD19 (8B8-2B03) CDR-H2	xem Bảng 8
42	CD19 (8B8-2B03) CDR-H3	xem Bảng 8
43	CD19 (8B8-2B11) CDR-L1	xem Bảng 7

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
44	CD19 (8B8-2B11) CDR-L2	xem Bảng 7
45	CD19 (8B8-2B11) CDR-L3	xem Bảng 7
46	CD19 (8B8-2B11) CDR-H1	xem Bảng 8
47	CD19 (8B8-2B11) CDR-H2	xem Bảng 8
48	CD19 (8B8-2B11) CDR-H3	xem Bảng 8
49	CD19 (8B8-5A07) CDR-L1	xem Bảng 7
50	CD19 (8B8-5A07) CDR-L2	xem Bảng 7
51	CD19 (8B8-5A07) CDR-L3	xem Bảng 7
52	CD19 (8B8-5A07) CDR-H1	xem Bảng 8
53	CD19 (8B8-5A07) CDR-H2	xem Bảng 8
54	CD19 (8B8-5A07) CDR-H3	xem Bảng 8

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
55	CD19 (8B8-5B08) CDR-L1	xem Bảng 7
56	CD19 (8B8-5B08) CDR-L2	xem Bảng 7
57	CD19 (8B8-5B08) CDR-L3	xem Bảng 7
58	CD19 (8B8-5B08) CDR-H1	xem Bảng 8
59	CD19 (8B8-5B08) CDR-H2	xem Bảng 8
60	CD19 (8B8-5B08) CDR-H3	xem Bảng 8
61	CD19 (8B8-5D08) CDR-L1	xem Bảng 7
62	CD19 (8B8-5D08) CDR-L2	xem Bảng 7
63	CD19 (8B8-5D08) CDR-L3	xem Bảng 7
64	CD19 (8B8-5D08) CDR-H1	xem Bảng 8
65	CD19 (8B8-5D08) CDR-H2	xem Bảng 8

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
66	CD19 (8B8-5D08) CDR-H3	xem Bảng 8
67	trình tự nucleotit của CD19 (8B8) chuỗi nhẹ gốc	xem Bảng 9
68	trình tự nucleotit của CD19 (8B8) chuỗi nặng gốc	xem Bảng 9
69	CD19 (8B8) chuỗi nhẹ gốc	xem Bảng 9
70	CD19 (8B8) chuỗi nặng gốc	xem Bảng 9
71	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-2B11) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
72	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-2B11) chuỗi nặng	xem Bảng 10
73	CD19 (8B8-2B11) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
74	CD19 (8B8-2B11) chuỗi nặng	xem Bảng 10
75	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-7H07) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
76	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-7H07) chuỗi nặng	xem Bảng 10

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
77	CD19 (8B8-7H07) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
78	CD19 (8B8-7H07) chuỗi nặng	xem Bảng 10
79	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-2B03) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
80	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-2B03) chuỗi nặng	xem Bảng 10
81	CD19 (8B8-2B03) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
82	CD19 (8B8-2B03) chuỗi nặng	xem Bảng 10
83	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-5A07) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
84	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-5A07) chuỗi nặng	xem Bảng 10
85	CD19 (8B8-5A07) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
86	CD19 (8B8-5A07) chuỗi nặng	xem Bảng 10
87	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-5D08) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
88	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-5D08) chuỗi nặng	xem Bảng 10
89	CD19 (8B8-5D08) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
90	CD19 (8B8-5D08) chuỗi nặng	xem Bảng 10
91	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-5B08) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
92	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-5B08) chuỗi nặng	xem Bảng 10
93	CD19 (8B8-5B08) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
94	CD19 (8B8-5B08) chuỗi nặng	xem Bảng 10
95	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-5H09) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
96	trình tự nucleotit của CD19 (8B8-5H09) chuỗi nặng	xem Bảng 10
97	CD19 (8B8-5H09) chuỗi nhẹ	xem Bảng 10
98	CD19 (8B8-5H09) chuỗi nặng	xem Bảng 10

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
99	CD19 (8B8-2B11) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSK YTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTV SS
100	CD19 (8B8-2B11) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETST GTTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQ LLEDPTYTFGQGTKLEIK
101	CD19 (8B8-7H07) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSK YTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGSELFYWGQGTTVTV SS
102	CD19 (8B8-7H07) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETST GNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQ ATHIPYTFGQGTKLEIK
103	CD19 (8B8-2B03) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYITHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSK YTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGPDYWGQGTTVTV SS
104	CD19 (8B8-2B03) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETST GNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVP

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQ LTHVPYTFGQGKLEIK
105	CD19 (8B8-5A07) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSK YTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTV SS
106	CD19 (8B8-5A07) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETST GNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQ PGHYPGTFGQGTKLEIK
107	CD19 (8B8-5D08) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSK YTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGSELFDYWGQGTTVTV SS
108	CD19 (8B8-5D08) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETS TGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC LQLTHEPYTFGQGTKLEIK
109	CD19 (8B8-5B08) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSK YTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTV SS

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
110	CD19 (8B8-5B08) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETST GNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQ LDSYPNTFGQGTKLEIK
111	CD19 (8B8-5H09) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSK YTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRRLSDD TAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTV SS
112	CD19 (8B8-5H09) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLESST GNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQ LIDYPVTFGQGTKLEIK
113	CD19 (8B8) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT DYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSK YTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRRLSDD TAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTV SS
114	CD19 (8B8) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENS NGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC LQLTHVPYTFGQGTKLEIK
115	CD19 của người	UniProt no. P15391

Thông tin chung về các trình tự nucleotit của các globulin miễn dịch của người, các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được đề cập trong: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) của Kabat, E.A., và các đồng tác giả. Axit amin của các chuỗi kháng thể được đánh số và được tham chiếu theo hệ thống đánh số theo Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) của Kabat, E.A., và các đồng tác giả) như được xác định ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây là các ví dụ về các phương pháp và chế phẩm của sáng chế. Nên hiểu là có thể thực hiện các phương án khác, với phần mô tả chung nêu trên.

Các 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 globulin 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, Đức) 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 mỗi 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 vật truyền 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 vật truyền biểu hiện tương ứng. Tất cả các cấu trúc được thiết kế với trình tự AND đầu 5' mã hoá peptit dẫn nhằm đích các protein bài tiết ở các tế bào sinh vật có nhân điển hình.

Các kỹ thuật nuôi cấy tế bào

Các kỹ thuật nuôi cấy tế bào tiêu chuẩn được sử dụng như được mô tả trong: Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. và Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Tinh chế Protein

Các protein được tinh chế từ các dịch nổi nuôi cấy tế bào đã lọc theo các quy trình tiêu chuẩn. Vắn tắt là, cho các kháng thể vào cột Protein A Sepharose (GE healthcare) và rửa bằng PBS. Rửa giải các kháng thể ở độ pH 2,8 tiếp đó trung hoà ngay mẫu này. Phân tách protein kết tụ từ các kháng thể monome bằng sắc ký loại trừ kích cỡ (Superdex 200, GE Healthcare) trong PBS hoặc trong 20 mM Histidin, 150 mM NaCl độ pH 6,0. Gộp các phân đoạn kháng thể monome, cô (nếu cần) bằng cách sử dụng thiết bị cô ly tâm MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), làm đông lạnh và bảo quản ở -20°C hoặc -80°C. Một phần của các mẫu này được cung cấp để phân tích protein và xác định đặc tính phân tích sau đó ví dụ bằng SDS-PAGE, sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC) hoặc đo phổ khối.

SDS-PAGE

Hệ thống gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể là, các gel Novex® Bis-TRIS Pre-Cast 10% hoặc 4-12% NuPAGE® (độ pH 6,4) và sử dụng đệm chạy NuPAGE® MES (các gel đã khử, với phụ gia đệm chạy chống oxy hoá NuPAGE®) hoặc MOPS (các gel không được khử).

Sắc ký loại trừ kích cỡ phân tích

Sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC) để xác định trạng thái kết tụ và oligome của các kháng thể được tiến hành bằng sắc ký HPLC. Vắn tắt là, cho các kháng thể đã tinh chế Protein A vào cột Tosoh TSKgel G3000SW trong 300 mM NaCl, 50 mM

$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, độ pH 7,5 trên hệ thống Agilent HPLC 1100 hoặc vào cột Superdex 200 (GE Healthcare) trong 2 x PBS trên hệ thống Dionex HPLC. Định lượng protein đã rửa giải bằng độ hấp thụ UV và lấy tích phân diện tích pic. BioRad Gel Filtration Standard 151–1901 dùng làm chất chuẩn.

Xác định khả năng gắn kết và ái lực gắn kết của các kháng thể với các kháng nguyên tương ứng bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (BIAcore)

Khảo sát gắn kết của các kháng thể đã tạo ra với các kháng nguyên tương ứng bằng cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng máy BIAcore (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden). Vắn tắt là, để xác định ái lực, các kháng thể JIR 109-005-098 IgG của dê-kháng người được cố định trên chip CM5 bằng cách ngẫu hợp amin để trình diện các kháng thể để kháng nguyên tương ứng. Xác định mức gắn kết trong đệm HBS (HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% Tween 20, độ pH 7,4), 25°C (hoặc theo cách khác ở 37°C). Thêm kháng nguyên (R&D Systems hoặc đã tinh chế nội bộ) vào ở các nồng độ khác nhau trong dung dịch. Xác định mức kết hợp bằng cách tiêm kháng nguyên trong từ 80 giây đến 3 phút; xác định mức phân ly bằng cách rửa bề mặt chip bằng dịch đệm HBS trong từ 3 đến 10 phút và ước tính giá trị KD bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir 1:1. Trừ dữ liệu đối chứng âm tính (ví dụ các đường cong dịch đệm) ra khỏi các đường cong mẫu thử để hiệu chỉnh độ lệch đường nền nội tại của hệ thống và để giảm tín hiệu nhiễu. Sử dụng phần mềm đánh giá của Biacore tương ứng để phân tích đồ thị cảm biến và để tính toán dữ liệu ái lực.

Ví dụ 1

Điều chế, tinh chế và xác định đặc tính của các kháng nguyên dung hợp Fc cho quy trình bộc lộ thực khuẩn thể

Để biểu hiện và tinh chế ngoại miền CD19 của người và của khỉ đầu chó (Bảng 1) ở trạng thái monome, dung hợp mảnh ADN tương ứng với đoạn gen Fc của IgG1 của người có chứa các đột biến “nốt phòng” (của người: SEQ ID NO: 4; của khỉ đầu chó: SEQ ID NO: 7) và chuyển nhiễm bản sao “lỗ-Fc” (SEQ ID NO: 3) (Nat Biotechnol 16, 677-681 của Merchant và các đồng tác giả (1998)). Vị trí phân cắt IgA (PTPPTP) được đưa vào giữa ngoại miền kháng nguyên và chuỗi nốt phòng Fc. Nhãn

Avi cho quá trình biotin hoá được điều khiển được đưa vào ở đầu tận cùng C của chuỗi nốt phồng Fc-kháng nguyên và các đột biến H435R và Y436F được đưa vào lỗ Fc cho mục đích tinh chế (J. Immunological methods, 1997 của Jendeberg L. và các đồng tác giả). Kết hợp của chuỗi nốt phồng Fc-kháng nguyên có chứa các đột biến S354C/T366W (của người: SEQ ID NO: 6; của khí đầu chó: SEQ ID NO: 8), với chuỗi lỗ Fc có chứa các đột biến Y349C/T366S/L368A/ Y407V (SEQ ID NO: 5) cho phép tạo ra mảnh dung hợp Fc heterodime mà bao gồm một bản sao đơn nhất của ngoại miền CD19. Bảng 2 liệt kê ADN bổ trợ và các trình tự axit amin của cấu trúc dung hợp-Fc kháng nguyên.

Bảng 1: Đánh số axit amin các ngoại miền (ECD) kháng nguyên và nguồn gốc của chúng

SEQ ID NO:	Cấu trúc	Nguồn gốc	ECD
1	ECD CD19 của người	Được tổng hợp theo Uniprot# P15391	aa 20-292
2	ECD của CD19 của khí đầu chó	Được tổng hợp theo dữ liệu nội bộ	aa 20-293

Bảng 2: ADN bổ trợ và các trình tự axit amin của phân tử dung hợp Fc(kih) CD19 của người và của khí đầu chó monome

SEQ ID NO:	Kháng nguyên	Trình tự
3	Trình tự nucleotit chuỗi lỗ Fc	GACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCAC CTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA

		CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTG GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGC TTCACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
4	Trình tự nucleotit CD19 của người chuỗi nốt phỏng Fc kháng nguyên nhân Avi	CCCGAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGG GCGACAATGCCGTGCTGCAGTGCCTGAAGGGCAC CTCCGATGGCCCTACCCAGCAGCTGACCTGGTCC AGAGAGAGCCCCCTGAAGCCCTTCCTGAAGCTGT CTCTGGGCCTGCCTGGCCTGGGCATCCATATGAG GCCTCTGGCCATCTGGCTGTTTCATCTTCAACGTGT CCCAGCAGATGGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCC TGGCCCCCATCTGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGC TGGACCGTGAACGTGGAAGGATCCGGCGAGCTGT TCCGGTGGAAACGTGTCCGATCTGGGCGGCCTGGG ATGCGGCCTGAAGAACAGATCTAGCGAGGGCCCC AGCAGCCCCAGCGGCAAACTGATGAGCCCCAAGC TGTACGTGTGGGCCAAGGACAGACCCGAGATCTG GGAGGGCGAGCCTCCTTGCCTGCCCCCTAGAGAC AGCCTGAACCAGAGCCTGAGCCAGGACCTGACAA TGGCCCCTGGCAGCACACTGTGGCTGAGCTGTGG

		CGTGCCACCCGACTCTGTGTCTAGAGGCCCTCTGA GCTGGACCCACGTGCACCCTAAGGGCCCTAAGAG CCTGCTGAGCCTGGAACTGAAGGACGACAGGCCC GCCAGAGATATGTGGGTCATGGAAACCGGCCTGC TGCTGCCTAGAGCCACAGCCCAGGATGCCGGCAA GTACTACTGCCACAGAGGCAACCTGACCATGAGC TTCCACCTGGAAATCACCGCCAGACCCGTGCTGT GGCACTGGCTGCTGAGAACAGGCGGCTGGAAGGT CGACGCTAGCGGTGGTAGTCCGACACCTCCGACA CCCGGGGGTGGTTCTGCAGACAAAACCTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCAGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT CTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAAC GACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACG AG
--	--	---

5	Trình tự polypeptit chuỗi lỗ Fc	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFITPKSLSLSPGK
6	Trình tự polypeptit chuỗi nốt phồng Fc kháng nguyên CD19 của người nhận Avi	PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSSQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKD DRPARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVDASGGSPTPPTPGGGSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
7	Trình tự nucleotit chuỗi nốt phồng Fc kháng nguyên CD19 của	CCCCAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAATGCCGTGCTCCAGTGCCTGGAAGGCACCTCCGATGGCCCTACACAGCAGCTCGTGTGGTGAGAGACAGCCCCTTCGAGCCCTTCCTGAACCTGTCTCTGGGCCTGCCTGGCATGGGCATCAGAATGGGCCCTCTGGGCATCTGGCTGCTGATCTTCAACGTGTCCAACCAGACCGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCC TGGCCTGCCAAGCGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGA

	khí đầu chó nhãn Avi	TGGACCGTGTCCGTGGAAGGATCTGGCGAGCTGT TCCGGTGGAAACGTGTCCGATCTGGGCGGCCTGGG ATGCGGCCTGAAGAACAGAAGCAGCGAGGGCCC TAGCAGCCCCAGCGGCAAGCTGAATAGCAGCCAG CTGTACGTGTGGGCCAAGGACAGACCCGAGATGT GGGAGGGCGAGCCTGTGTGTGGCCCCCCTAGAGA TAGCCTGAACCAGAGCCTGAGCCAGGACCTGACA ATGGCCCCTGGCAGCACACTGTGGCTGAGCTGTG GCGTGCCACCCGACTCTGTGTCCAGAGGCCCTCT GAGCTGGACACACGTGCGGCCAAAGGGCCCTAAG AGCAGCCTGCTGAGCCTGGAAGTGAAGGACGACC GGCCCGACCGGGATATGTGGGTGGTGGATACAGG CCTGCTGCTGACCAGAGCCACAGCCCAGGATGCC GGCAAGTACTACTGCCACAGAGGCAACTGGACCA AGAGCTTTTACCTGGAAATCACCGCCAGACCCGC CCTGTGGCACTGGCTGCTGAGAATCGGAGGCTGG AAGGTGACGCTAGCGGTGGTAGTCCGACACCTC CGACACCCGGGGGTGGTTCTGCAGACAAAACCTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
--	-------------------------	---

		GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCT GAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGG CACGAG
8	Trình tự polypeptit chuỗi nốt phồng Fc kháng nguyên CD19 của khí đầu chó nhãn Avi	PQEPLVVKVEEGDNAVLQCLEGTSDGPTQQLVWCR DSPFEPFLNLSLGLPGMGIRMGPLGIWLLIFNVSNT GGFYLCQPGLPSEKAWQPGWTVSVEGSGELFRWN VSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLNSSQLYVWA KDRPEMWEGETVCGPPRDSL NQSL SQDL TMAPGST LWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVRPKGPKSSLLSLEL KDDRPDRDMWVVD TGLLL TRATA QDAG KY YCHR GNWTKSFYLEITARPALWHWLLRIGGWKVDASGGS PTPPTPGGGSADKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDELTKNQLVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEA QKIEWHE

Để sản xuất các phân tử dung hợp kháng nguyên/Fc monome, đồng chuyển nhiễm các tế bào CHO trong huyền phù tăng trưởng theo cấp số mũ với hai plasmit mã hoá hai thành phần của protein dung hợp (các chuỗi nốt phồng và lỗ) bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn.

Tinh chế protein đã bài tiết từ dịch nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực bằng cách sử dụng Protein A, tiếp đó bằng sắc ký loại trừ kích cỡ. Cho sắc ký ái lực, nạp

dịch nổi này vào cột MabSelect Sure thể tích (CV) = 5-15 mL, nhựa của (GE Healthcare) đã cân bằng bằng natri Phosphat (20 mM), natri xitrat (20 mM), dịch đệm 0,5M natri clorua (độ pH 7,5). Loại bỏ protein không gắn kết bằng cách rửa bằng ít nhất 6 thể tích cột cùng dịch đệm này. Rửa giải protein đã gắn kết bằng cách sử dụng gradien tuyến tính; bước 1, 10 CV từ 0 đến 60% dịch đệm rửa giải (20 mM natri xitrat, dịch đệm 500 mM natri clorua (độ pH 2,5)); bước 2, 2 CV từ 60 đến 100% dịch đệm rửa giải. Cho gradien tuyến tính áp dụng bước rửa giải 2 thể tích cột bổ sung với 100% dịch đệm rửa giải.

Điều chỉnh độ pH của các phân đoạn đã gộp lại bằng cách thêm vào 1/40 (thể tích/thể tích) 2M Tris, độ pH 8,0. Cô protein và lọc trước khi nạp vào cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) đã cân bằng bằng 2mM MOPS, 150 mM natri clorua, 0,02% (trọng lượng/thể tích) dung dịch natri azit có độ pH 7,4.

Bảng 3 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của protein dung hợp Fc(kih) CD19 của người và của khỉ đầu chó monome.

Bảng 3 – Phân tích hoá sinh của protein dung hợp Fc(kih) CD19 của người và của khỉ đầu chó monome

Cấu trúc	Monome [%] (SEC)	Hiệu suất [mg/l]
protein dung hợp Fc(kih) CD19 của người monome	91	0,2
protein dung hợp Fc(kih) CD19 của khỉ đầu chó monome	95	3,56

Biotin hoá *in vitro* một phần của kháng nguyên đã tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit phản ứng chuẩn ligaza biotin-protein BirA (Avidity, Cat. # BirA500) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mức độ biotin hoá đối với thể dung hợp có chứa-CD19 của người là 94%, đối với cấu trúc của CD19 của khỉ đầu chó tương ứng là 100%. Protein đã biotin hoá tiếp đó được sử dụng để chọn lọc, sàng lọc và xác định đặc tính

của các dòng vô tính thu được từ-8B8 đã làm trưởng thành ái lực không có các điểm nóng khử amit hoá N27d và N28.

Ví dụ 2

Chọn lọc các kháng thể đặc hiệu-CD19 đã làm trưởng thành ái lực CD19

Khử amit hoá các gốc asparagin ở các vị trí 27d và 28, trong CDR1 của chuỗi nhẹ của dòng vô tính đã làm tương thích với người 8B8 (được mô tả trong WO 2011/147834), dẫn đến giảm đáng kể hoạt tính sinh học. Do đó, 2 thư viện bọc lộ thực khuẩn thể được tạo ra trong đó a) loại bỏ cả hai gốc asparagin ở các vị trí 27d và 28 và b) chọn ngẫu nhiên các CDR bổ sung của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ để chọn lọc các biến thể 8B8 với ái lực đã cải thiện.

2.1 Tạo ra các thư viện 8B8 làm trưởng thành ái lực không có các điểm nóng LCDR1

Tiến hành tạo ra các kháng thể thu được từ-8B8 đã làm trưởng thành ái lực không có các vị trí khử amit hoá N27d và N28, ở LCDR1, bằng cách bọc lộ thực khuẩn thể bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn (Silacci và các đồng tác giả, 2005). Trong bước thứ nhất, các trình tự ADN VL và VH của dòng vô tính 8B8 gốc đã làm tương thích với người (SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10) được tách dòng vào plasmit-thực khuẩn thể, tiếp đó được sử dụng làm khuôn mẫu để chọn ngẫu nhiên. Trong bước tiếp theo, tạo ra hai thư viện để chọn lọc các dòng vô tính thuận lợi bằng cách bọc lộ thực khuẩn thể. Để loại bỏ các vị trí điểm nóng nêu trên, sử dụng đoạn môi chọn ngẫu nhiên LCDR1 (SEQ ID NO: 11) mà chỉ cho phép axit amin S T Q E ở các vị trí 27d và 28 cho cả hai thư viện. Chọn ngẫu nhiên thư viện làm trưởng thành 1 trong CDR1 và 2 của cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, đồng thời chọn ngẫu nhiên thư viện làm trưởng thành 2 trong CDR1 và 3 của chuỗi nhẹ và trong CDR3 của chuỗi nặng. Các vị trí được chọn ngẫu nhiên trong các vùng CDR tương ứng được thể hiện trên Fig.1. Để tạo ra thư viện làm trưởng thành 1, đã chọn ngẫu nhiên trong CDR1 và 2 của cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, ba mảnh được lắp ghép bằng cách PCR “cắt-nối bằng cách kéo dài mạch trùng lặp” (SOE) và tách dòng vào vật truyền thực khuẩn thể (Fig.2). Các tổ hợp đoạn môi sau đây đã được sử dụng để tạo ra các mảnh thư viện: mảnh 1 (LMB3 (SEQ ID NO: 16) và CD19 L1 ngẫu nhiên ngược chiều (SEQ ID NO: 11), mảnh 2 (CD19 L2 ngẫu nhiên xuôi chiều (SEQ ID NO: 12) và CD19 H1 ngẫu nhiên

nguyên ngược chiều (SEQ ID NO: 13), và mảnh 3 (CD19 H2 ngẫu nhiên xuôi chiều (SEQ ID NO: 14) và CD19 H3 ổn định ngược chiều (SEQ ID NO: 15) (Bảng 4). Sau khi lắp ghép lượng đủ của mảnh đã chọn ngẫu nhiên độ dài đầy đủ, thủy phân bằng *NcoI/NheI* cùng với vật truyền plasmit-thực khuẩn thể tiếp nhận đã xử lý giống hệt. Lượng mol dư 3 lần của đoạn cài xen thư viện được nối với 10 µg vật truyền plasmit-thực khuẩn thể. Sử dụng các mảnh nối đã tinh chế cho 20 lần biến nạp thu được 2×10^9 thể biến nạp. Thu hồi các hạt plasmit-thực khuẩn thể bọc lộ thư viện làm trưởng thành ái lực 8B8 và tinh chế bằng PEG/NaCl để sử dụng cho chọn lọc.

Tiến hành tạo ra thư viện thứ hai, được chọn ngẫu nhiên trong CDR1 và 3 của chuỗi nhẹ và trong CDR3 của chuỗi nặng theo cách tương tự. Các tổ hợp đoạn nối sau đây đã được sử dụng để tạo ra các mảnh thư viện: mảnh 1 (LMB3 (SEQ ID NO: 16) và CD19 L1 ngẫu nhiên ngược chiều (SEQ ID NO: 11), mảnh 2 (CD19 L1 ổn định xuôi chiều (SEQ ID NO 223) và CD19 L3 ngẫu nhiên ngược chiều (SEQ ID NO 224), và mảnh 3 (CD19 L3 ổn định xuôi chiều (SEQ ID NO: 225) và CD19 H3 ngẫu nhiên ngược chiều (SEQ ID NO: 226) (Bảng 5). Sau khi lắp ghép lượng đủ của mảnh đã chọn ngẫu nhiên độ dài đầy đủ, thủy phân bằng *NcoI/KpnI* cùng với vật truyền plasmit-thực khuẩn thể tiếp nhận đã xử lý giống hệt. Lượng mol dư 3 lần của đoạn cài xen thư viện được nối với 20 µg vật truyền plasmit-thực khuẩn thể. Sử dụng các mảnh nối đã tinh chế cho 40 lần biến nạp thu được 2×10^9 thể biến nạp. Thu hồi các hạt plasmit-thực khuẩn thể bọc lộ thư viện làm trưởng thành ái lực 8B8 và tinh chế bằng PEG/NaCl để sử dụng cho chọn lọc.

Bảng 4: Các đoạn nối để làm trưởng thành ái lực 8B8 và thư viện loại bỏ điểm nóng L1_L2 / H1_H2

SEQ ID	Tên	Trình tự
11	CD19 L1 ngẫu nhiên ngược chiều	CAG CTG CGG GCT CTG ACC CGG TTT CTG GAG ATA CCA GTT CAG 1 CGT 2 GCC 3 GGA 4 TTC CAG AGA TTG GCT GGA TTT GCA AGA AAT G 1: 40% Y, 6% A/S/T/G/P/D/N/E/Q/V

		2: 40% N, 6% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V 3: 25% S/T/Q/E 4: 25% S/T/Q/E
12	CD19 L2 ngẫu nhiên xuôi chiều	CTC CAG AAA CCG GGT CAG AGC CCG CAG CTG CTG ATC TAC 5 GTA TCT 6 CGC 7 8 GGC GTT 9 GAT CGT TTC AGC GGT TCT GGA TCC GGC ACC 5: 30% R, 20% E, 5% A/S/T/Y/G/P/D/N/Q/V 6: 30% K, 20% S, 5% A/N/T/Y/G/P/D/E/Q/V 7: 40% F, 5% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V/I/L 8: 40% S, 6,6% A/T/Y/G/P/D/E/Q/V 9: 50% P, 50% L
13	CD19 H1 ngẫu nhiên ngược chiều	CAT CCA CTC CAG ACC CTG GCC CGG GGC CTG ACG AAC CCA 10 CAT 11 12 13 14 GAA 15 GTA ACC AGA TGC TTT GCA GCT CAC TTT AAC GGA AGC 10: 52% H, 4% G/A/S/P/T/N/Y/D/E/Q/V/I 11: 30% I, 15% Y, 5% G/A/S/T/P/N/H/D/E/Q/V 12: 52% Y, 4% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I 13: 30% D, 15% G, 5% A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I 14: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I 15: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I
14	CD19 H2 ngẫu nhiên xuôi chiều	CAG GCC CCG GGC CAG GGT CTG GAG TGG ATG GGC 16 ATT 17 CCA 18 19 20 21 TCC 22 TAT ACC 23 AAA TTC CAG GGC CGC GTC ACG ATG ACC

		16: 45% Y, 5% A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I 17: 52% N, 4% G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I 18: 40% Y, 5% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I 19: 30% N, 15% S, 5% G/A/T/P/Y/H/D/E/Q/V/I 20: 30% D, 15% G, 5% A/S/T/P/Y/N/H/E/Q/V/I 21: 52% G, 4% N/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I 22: 30% K, 15% N, 4% G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I 23: 30% E, 15% Q, 5% G/A/S/T/P/Y/N/H/D/V/I
15	CD19 H3 ổn định ngược chiều	CGTCACCGGTTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAG
16	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC

Bảng 5: Các đoạn môi để làm trưởng thành ái lực 8B8 và thư viện loại bỏ điểm nóng L1_L3 / H3

SEQ ID	Tên	Trình tự
17	D19 L1 ổn định xuôi chiều	TGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAG
11	CD19 L1 ngẫu nhiên ngược chiều	Xem Bảng 4

18	CD19 L3 ngẫu nhiên ngược chiều	TTT AAT TTC CAG TTT AGT TCC TTG ACC GAA GGT 24 25 26 27 28 29 CTG CAG ACA ATA GTA GAC GCC AAC GTC TTC AGC 24: 52% Y, 4% G/A/S/T/N/P/D/E/Q/V/L/I 25: 52% P, 4% G/A/S/T/Y/N/H/D/E/Q/V/I 26: 42% V, 10% L, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I 27: 52% H, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I 28: 42% T, 10% I, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/L 29: 45% L, 11% G, 4% A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I
19	CD19 L3 ổn định xuôi chiều	ACCTTCGGTCAAGGAACTAACTGGAAATTAAACG
20	CD19 H3 ngẫu nhiên ngược chiều	TT GGT GCT AGC AGA GCT TAC GGT CAC CGT GGT ACC TTG GCC CCA GTAATC AAA 30 31 32 33 34 35 36 37 38 GCG TGC ACA ATA GTA AAC AGC GGT GTC 30: 50% L, 3,8% G/A/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I 31: 50% A, 4,2% G/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I 32: 50% S, 4,2% G/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I 33: 50% G, 4,2% S/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I 34: 50% Y, 4,2% G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I 35: 50% Y, 4,2% G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I 36: 50% Y, 4,2% G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I 37: 50% T, 4,2% G/A/Y/P/H/S/N/D/E/Q/V/I 38: 50% G, 4,2% Y/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I
16	LMB3	Xem Bảng 4

2.2 Chọn lọc các dòng vô tính thu được từ-8B8 đã làm trưởng thành ái lực không có điểm nóng N27d và N28 của LCDR1

Để chọn lọc các dòng vô tính đã làm trưởng thành ái lực không có các điểm nóng N27d và N28 của LCDR1, tiến hành hai cách thức chọn lọc bằng cách bọc lọ thực khuẩn thể:

Theo cách thứ nhất, tiến hành chọn lọc protein dung hợp CD19 của người-Fc bằng cách sử dụng cả hai thư viện bọc lọ thực khuẩn thể. Thực hiện các lượt đãi trong dung dịch theo mô hình: 1. Việc gắn kết của $\sim 10^{12}$ hạt plasmit-thực khuẩn thể với 30nM protein CD19-Fc đã biotin hoá trong 0,5 giờ trong thể tích tổng cộng 1ml, 2. Bắt giữ protein CD19-Fc đã biotin hoá và các hạt thực khuẩn thể đã gắn kết đặc hiệu bằng cách bổ sung thêm $5,4 \times 10^7$ các hạt từ tính đã phủ-streptavidin trong 10 phút, 3. Rửa các hạt bằng cách sử dụng 5x 1ml PBS/Tween20 và 5x 1ml PBS, 4. Rửa giải các hạt thực khuẩn thể bằng cách bổ sung thêm 1ml 100mM TEA trong 10 phút và trung hoà bằng cách bổ sung thêm 500ul 1M Tris/HCl độ pH 7,4, 5. Tái nhiễm vi khuẩn *E. coli* TG1 tăng trưởng theo số mũ, và 6. Lây nhiễm helperphage VCSM13 và tiếp đó kết tủa bằng PEG/NaCl các hạt plasmit-thực khuẩn thể để sử dụng trong các lượt chọn lọc sau đó. Tiến hành chọn lọc 3 lượt bằng cách sử dụng các nồng độ kháng nguyên giảm dần (30×10^{-9} M, 10×10^{-9} M, và 3×10^{-9} M). Trong lượt 2 và 3, tiến hành bắt giữ các phức hợp kháng nguyên:thực khuẩn thể bằng cách sử dụng các đĩa neutravidin thay vì các hạt streptavidin. Rửa các đĩa neutravidin bằng 5x PBS/Tween20 và 5x PBS. Trong lượt 3, ủ đĩa neutravidin qua đêm trong 2 l PBS để chọn lọc “phân ly” trước khi rửa giải thực khuẩn thể từ đĩa. Hơn nữa, sử dụng protein CD19-Fc của khỉ trong lượt 2 để làm giàu các chất gắn kết phản ứng chéo.

Trong cách thức chọn lọc thứ hai, thực hiện đãi thực khuẩn thể đối với các tế bào biểu hiện nhất thời ECD CD19 của người hoặc của khỉ đầu chó. Để chuyển nhiễm nhất thời các tế bào HEK, tạo ra các plasmit biểu hiện mang các trình tự ADN (từ đầu 5' đến 3') cho các đoạn protein sau: nhãn Flag, nhãn SNAP, ECD CD19 nguồn gốc của người hoặc khỉ đầu chó, và vùng xuyên màng của thụ thể yếu tố tăng trưởng thu được từ-tiểu cầu (PDGFR) (SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22). Kháng định biểu hiện của các protein tương ứng (SEQ ID NO: 23 và SEQ ID NO: 24) trên bề mặt tế bào bằng cách đếm tế bào dòng chảy bằng cách sử dụng kháng thể kháng-Flag để phát hiện. Cả hai thư viện được phối nhiễm trong lượt chọn lọc thứ nhất với các tế

bào biểu hiện thể dung hợp protein có chứa-ECD CD19 của người hoặc khỉ đầu chó. Cho các lượt quét đĩa sau đó, các loại ECD CD19 được luân phiên. Các tế bào được chuyển nhiễm nhất thời với protein màng không liên quan được sử dụng để sàng lọc sơ bộ.

Thực hiện các lượt đĩa trong dung dịch theo mô hình: 1. Chuyển nhiễm các tế bào HEK bằng các cấu trúc biểu hiện ECD CD19 hoặc protein xuyên màng không liên quan theo quy trình chuẩn được mô tả ở trên, 2. ủ các tế bào này trong tổng cộng 48 giờ ở 37°C trong tủ ẩm có khí quyển 5% CO₂, 3. Phân lập các tế bào bằng cách ly tâm (3 phút ở 250×g) và tương ứng tái tạo huyền phù 1×10⁷ các tế bào dương tính-ECD và 1×10⁷ các tế bào âm tính trong PBS/5% BSA, 3. Sàng lọc sơ bộ thực khuẩn thể không đặc hiệu bằng cách ủ thư viện thực khuẩn thể với 1×10⁷ tế bào âm tính-CD 19 trong 60 phút ở 4°C bằng cách sử dụng máy quay ống nghiệm quay tròn nhẹ nhàng, 4. Ly tâm các tế bào ở 250×g trong 3 phút và chuyển dịch nổi vào ống nghiệm mới. Bổ sung thêm 1×10⁷ tế bào dương tính-CD19 và ủ trong 60 phút ở 4°C bằng cách quay tròn nhẹ nhàng trên máy quay ống nghiệm, 5. Rửa các tế bào bằng cách ly tâm trong 1 phút ở 250×g, hút lấy dịch nổi, và tái tạo huyền phù trong 1 ml PBS (8 lần), 6. Rửa giải thực khuẩn thể bằng 1 ml 100mM TEA, ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng, và trung hoà dịch rửa giải bằng 500 ul 1M Tris-HCl, độ pH 7,6, 7. Tái nhiễm vi khuẩn *E. coli* TG1 tăng trưởng theo số mũ, và 8. lây nhiễm với helperphage VCSM13 và kết tủa bằng PEG/NaCl tiếp đó các hạt plasmit-thực khuẩn thể để sử dụng cho các lượt chọn lọc sau này. Tiến hành 3 lượt chọn lọc.

Đối với cả hai cách thức chọn lọc, nhận dạng các chất gắn kết đặc hiệu bằng ELISA như sau: dịch protein CD19-Fc đã biotin hoá 30 nM 100 ul/giếng được phủ lên các đĩa neutravidin. Thêm vào các dịch nổi vi khuẩn có chứa-Fab và phát hiện các Fab gắn kết thông qua các nhãn-Flag của chúng bằng cách sử dụng kháng thể thứ hai kháng-Flag/HRP.

Thử nghiệm tiếp các dòng vô tính mà dương tính-ELISA CD19 của người tái tổ hợp trong ELISA trên-tế bào bằng cách sử dụng các tế bào đã chuyển nhiễm nhất thời với plasmit biểu hiện có chứa-ECD của CD19 của người (SEQ ID NO: 227). Tiến hành phân tích này như sau: 48 giờ sau khi chuyển nhiễm, gom các tế bào HEK và ly tâm ở 250xg trong 5 phút. Các tế bào tiếp đó được tái tạo huyền phù trong PBS làm lạnh bằng đá BSA 2% đến mật độ 4 x 10⁶ tế bào/ml và ủ trong 20 phút trên đá để

phong bế các vị trí gắn kết không đặc hiệu. Phân bố 4×10^5 tế bào trong 100ul vào mỗi giếng trong đĩa 96 giếng và ly tâm ở 250xg và 4°C trong 3 phút. Hút lấy dịch nổi và 50ul dịch nổi vi khuẩn có chứa các mảnh Fab hoà tan được pha loãng với 50ul PBS làm lạnh bằng-đá/BSA 2%, được thêm vào đĩa này, trộn với các tế bào và ủ trong 1 giờ ở 4°C. Sau đó, rửa các tế bào 3 lần bằng PBS làm lạnh bằng-đá trước khi thêm vào 100ul PBS BSA 2%/có chứa dịch pha loãng 1:2000 của kháng thể kháng-Fab-HRP. Sau khi ủ trong 1 giờ, rửa lại các tế bào 3 lần bằng PBS làm lạnh bằng-đá. Để hiện kết quả, thêm vào 100ul cơ chất “1-step ultra TMB-ELISA”/giếng. Sau khi ủ trong 10 phút, chuyển dịch nổi vào đĩa 96-giếng mới có chứa 40ul H₂SO₄ 1M/giếng và đo độ hấp thụ ở 450 nM. Các dòng vô tính biểu hiện các tín hiệu đáng kể so với mức nền được cho thử nghiệm sàng lọc động học bằng cách phân tích-SPR sử dụng ProteOn XPR36.

2.3 Nhận dạng các biến thể thu được từ-8B8 đã làm trưởng thành ái lực bằng SPR

Để xác định đặc tính tiếp các dòng vô tính dương tính-ELISA, xác định tốc độ phân ly bằng cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng máy ProteOn XPR36 và so sánh với dòng vô tính đã làm tương thích với người gốc 8B8.

Cho thử nghiệm này, cố định 7000 RU của kháng thể kháng-Fab của người đa dòng vào toàn bộ 6 kênh của chip GLM bằng cách ngẫu hợp amin (Na Axetat độ pH 4,5, 25 µl/phút, 240 giây) (chiều dọc). Lọc dịch nổi vi khuẩn có chứa-kháng thể và pha loãng 2 lần với PBS, và tiếp đó tiêm trong 360 giây ở 25 µl/phút để đạt được mức cố định trong khoảng từ 100 đến 400 đơn vị đáp ứng (RU) theo chiều dọc. Tiêm CD19-Fc monome: Cho các chỉ số đo động học một lần tiêm, thay đổi hướng tiêm theo chiều ngang, các loạt dịch pha loãng 3-lần của CD19-Fc monome đã tinh chế (nồng độ thay đổi trong khoảng từ 150 đến 6 nM) được tiêm đồng thời ở 50 µl/phút dọc theo các kênh riêng rẽ 1-4, với thời gian kết hợp là 180 giây, và với thời gian phân ly là 300 giây. Mảnh Fc của IgG của người (150nM) được tiêm vào kênh 5 làm đối chứng âm tính cho gắn kết đặc hiệu với CD19-Fc monome. Tiêm dịch đệm (PBST) dọc theo kênh thứ sáu để cung cấp mẫu trắng “nội dòng” để tham chiếu. Tiến hành tái tạo bằng bằng hai nhịp của 10mM glyxin độ pH 1,5 và 50mM NaOH trong 30 giây ở 90ul/phút (chiều ngang). Các hằng số tốc độ phân ly (k_{off}) được tính toán bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một-với-một đơn giản trong phần mềm ProteOn Manager v3.1 bằng cách khớp số liệu đồng thời các đồ thị cảm biến. Các

dòng vô tính biểu hiện các Fab với các hằng số tốc độ phân ly chậm nhất được nhận diện (Bảng 6). Lưu ý, các hằng số tốc độ phân ly của các dòng vô tính 5A07 và 5B08 không thể xác định được do không đủ khớp số liệu. Mặc dù vậy, cả hai dòng vô tính được chọn do các kết quả thu được gợi ý có phân ly rất chậm. Các miền biến đổi của các plasmit-thực khuẩn thể tương ứng được xác định trình tự. Quan trọng là, cả hai gốc asparagin trong LCDR1 (vị trí 27d và 28) đã bị thay thế bằng serin hoặc threonin, chứng tỏ là cả hai vị trí khử amit hoá đã bị loại bỏ. Làm thẳng mạch được thể hiện trên Fig.3. Các CDR của các dòng vô tính tốt nhất được liệt kê trong Bảng 7 (các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ) và Bảng 8 (các vùng biến đổi của chuỗi nặng) (dòng vô tính 5H09: (SEQ ID NO:25-SEQ ID NO:30); dòng vô tính 7H07: (SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:36); dòng vô tính 2B03: (SEQ ID NO: 37-SEQ ID NO:42); dòng vô tính 2B11: (SEQ ID NO:43-SEQ ID NO:48); dòng vô tính 5A07: (SEQ ID NO:49-SEQ ID NO:54); dòng vô tính 5B08: (SEQ ID NO:55-SEQ ID NO:60); dòng vô tính 5D08: (SEQ ID NO:61-SEQ ID NO:66).

Bảng 6: Các hằng số phân ly của các dòng vô tính đã chọn thu được trong phân tích sàng lọc với dịch nổi vi khuẩn

dòng vô tính	Hằng số phân ly k_d (1/giây)
Parental 8B8	3,01E-4
5H09	2,58E-4
7H07	5,75E-5
2B03	3,24E-5
2B11	4,37E-6
5A07	Không xác định được
5B08	Không xác định được

5D08	1,95E-4
------	---------

Bảng 7: Các trình tự CDR của các chuỗi nhẹ 8B8 đã chọn

dòng vô tính	SEQ ID NO	CDR-L1	SEQ ID NO	CDR-L2	SEQ ID NO	CDR-L3
5H09	25	KSSQSLESSTGNTYLN	26	RVSKRFS	27	LQLIDYPVT
7H07	31	KSSQSLETSTGNTYLN	32	RVSKRFS	33	LQATHIPYT
2B03	37	KSSQSLETSTGNTYLN	38	RVSKRFS	39	LQLTHVPYT
2B11	43	KSSQSLETSTGTTYLN	44	RVSKRFS	45	LQLLEDPYT
5A07	49	KSSQSLETSTGNTYLN	50	RVSKRFS	51	LQPGHYPGT
5B08	55	KSSQSLETSTGNTYLN	56	RVSKRFS	57	LQLDSYPNT
5D08	61	KSSQSLETSTGNTYLN	62	RVSKRFS	63	LQLTHEPYT

Bảng 8: Các trình tự CDR của các chuỗi nặng 8B8 đã chọn

dòng vô tính	SEQ ID NO	CDR- H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
--------------------	-----------------	------------	-----------------	--------	-----------------	--------

5H09	28	DYIMH	29	YINPYNDGSKYTE KFQG	30	GTYYYYGSALF DY
7H07	34	DYIMH	35	YINPYNDGSKYTE KFQG	36	GTYYYYGSELF DY
2B03	40	DYITH	41	YINPYNDGSKYTE KFQG	42	GTYYYYGPDLF DY
2B11	46	DYIMH	47	YINPYNDGSKYTE KFQG	48	GTYYYYGPQLF DY
5A07	52	DYIMH	53	YINPYNDGSKYTE KFQG	54	GTYYYYGSALF DY
5B08	58	DYIMH	59	YINPYNDGSKYTE KFQG	60	GTYYYYGPQLF DY
5D08	64	DYIMH	65	YINPYNDGSKYTE KFQG	66	GTYYYYGSELF DY

Ví dụ 3

Xác định đặc tính của các kháng thể thu được từ-8B8 đã làm trưởng thành ái lực

3.1 Tách dòng các miền kháng thể thay đổi vào các vật truyền biểu hiện

Các vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các chất gắn kết kháng-CD19 đã chọn được tách dòng phụ trong khung với chuỗi nặng ổn định hoặc chuỗi nhẹ ổn định của IgG1 của người. Trong chuỗi nặng, các đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala đã được đưa vào để loại bỏ khả năng gắn kết với các thụ thể gamma Fc theo phương pháp được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 2012/130831 A1.

ADN bổ trợ và các trình tự axit amin của các IgG kháng-CD19 tương ứng được thể hiện trong Bảng 9 và Bảng 10. Tất cả các trình tự mã hoá-kháng thể được tách dòng vào vật truyền biểu hiện, mà điều khiển phiên mã của đoạn cài xen bằng gen khởi đầu MPSV khảm và có chứa trình tự tín hiệu polyA tổng hợp nằm ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, vật truyền này có chứa trình tự EBV OriP để duy trì thể bổ sung của plasmit này.

Bảng 9: ADN bổ trợ và trình tự axit amin của dòng vô tính 8B8 kháng-CD19 theo kiểu IgG1 của người P329GLALA

SEQ ID NO:	Dòng vô tính và chuỗi	Trình tự
67	Chuỗi nhẹ gốc của 8B8	GATGCTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCA GAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTATTTGAACTGG TACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAACCTCCTGATCT ACAGGGTTTCCAAACGATTTTCTGGGGTCCTAGACAGGTT CAGTGGTAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTTCTGCC TACAACTTACACATGTCCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGAC CAAGCTGGAAATAAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTC TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGT

68	chuỗi nặng gốc của 8B8	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGC CTGGGGCTTCAGTGAAGATGGCCTGCAAGGCTTCTGGATA CACATTCAGTACTATATTATGCACTGGGTGAAGCAGAAG ACTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTT ACAATGATGGTTCTAAGTACACTGAGAAGTTCAACGGCAA GGCCACACTGACTTCAGACAAATCTTCCATCACAGCCTAC ATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCT ATTACTGTGCAAGAGGGACCTATTATTATGGTAGCGCCCT CTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCC TCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGG GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGG CGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
----	---------------------------------	--

		TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
69	Chuỗi nhẹ gốc của 8B8	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENSNGNTYLNWYL QKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
70	chuỗi nặng gốc của 8B8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGGQTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Bảng 10: ADN bổ trợ và các trình tự axit amin của các dòng vô tính kháng-CD19
thuần thực ái lực theo kiểu IgG1 của người P329GLALA

SEQ ID NO:	Dòng vô tính và chuỗi	Trình tự
71	2B11 chuỗi nhẹ	GATATTGTCATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCACCACGTACCTGAACTGGT

		ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGCTGCTGGAAGATCCATACACCTTCGGTCAAGGAACGA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGT
72	2B11 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATA CAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGC GTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACA TGGAAGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTA CTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGCTG TTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGCT CTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATC

		ACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
73	2B11 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVG VYYCLQLLEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTK SFNRGEC
74	2B11 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSR LRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK

		ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
75	7H07 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGGCAACCCATATCCCATACACCTTCGGTCAAGGAACTA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGT
76	7H07 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATA CAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGC GTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACA TGGAAGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTA CTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTTCTGAACTGT TTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGCTC TGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT

		GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTC CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
77	7H07 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVG VYYCLQATHIPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC

78	7H07 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSELF DYWGQGT TVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
79	2B03 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAAC TCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAAC TGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGTTGACCCACGTTCCGTACACCTTCGGTCAAGGAANNA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC T GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT

80	2B03 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCACGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATAACCGAGAAATTCCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAAGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCAGATC TGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
----	-----------------------	--

		AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
81	2B03 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCLQLTHVPYTFGQGXXLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
82	2B03 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYITHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSLRSDDTAVYYCARGTYYYGPDLDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
83	5A07 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGCCAGGTCATTACCCAGGTACCTTCGGTCAAGGAACTA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC

		GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
84	5A07 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAAGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACTTACTACTACGGTTCGCCCCT CTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGC TCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT

		GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
85	5A07 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVIYCLQPGHYPGTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
86	5A07 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
87	5D08 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGT

		ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGCTGACCCATGAACCATAACCTTCGGTCAAGGAATA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
88	5D08 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAAGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTTCTGAAC TGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA

		CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
89	5D08 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCLQLTHEPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPV TKSFNRGEC
90	5D08 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSR LRSDDTAVYYCARGTYYYGSELFDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

		NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
91	5B08 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGCTGGATTCTTACCCAAACACCTTCGGTCAAGGAACTA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
92	5B08 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAAGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGC TGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA

		CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACC TCCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
93	5B08 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVIYYCLQLDSYPNTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

94	5B08 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	5H09 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAATCTTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGCTGATCGATTACCCAGTTACCTTCGGTCAAGGAACTA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT

96	5H09 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAAGTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTTCTGCACT GTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGC TCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
----	-----------------------	--

		ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
97	5H09 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLESSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVG VYYCLQLIDYPVTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSK DSTYSL SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
98	5H09 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSR LRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3.2 Xác định ái lực của các kháng thể đã chọn lọc bằng SPR

Để xác định chính xác các ái lực bằng SPR, các kháng thể kháng-CD19 đã chọn lọc được sản xuất bằng cách đồng chuyển nhiễm các tế bào HEK293-EBNA với các vật truyền biểu hiện động vật có vú bằng cách sử dụng polyetylenimin. Chuyển nhiễm các tế bào này với các vật truyền biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:1 (“vật truyền chuỗi nặng”: “vật truyền chuỗi nhẹ”) theo quy trình chuẩn. 7 ngày sau khi chuyển nhiễm, đo hiệu giá kháng thể trong dịch nổi và cân bằng các hiệu giá đến 10 µg/ml.

Ái lực (K_D) của kháng thể gốc 8B8 cũng như các dẫn xuất của nó được xác định bằng SPR sử dụng thiết bị ProteOn XPR36 (Biorad) ở 25°C. 7000 RU của kháng thể kháng-Fab của người đa dòng được cố định vào toàn bộ 6 kênh của chip GLM bằng

cách ngẫu hợp amine (NaAxetat độ pH 4,5, 25 μ l/phút, 240 giây) (chiều dọc). Lọc dịch nổi HEK có chứa kháng thể, pha loãng với PBST (10 mM phosphat, 150 mM natri clorua độ pH 7,4, 0,005% Tween 20) đến nồng độ = 10 μ g/ml, và tiếp đó tiêm trong 360 giây ở 25 μ l/phút để đạt được mức cố định trong khoảng từ 500 đến 800 đơn vị đáp ứng (RU) theo chiều dọc. Tiêm CD19-Fc monome: Cho các chỉ số đo động học một lần tiêm, thay đổi hướng tiêm theo chiều ngang, các loạt dịch pha loãng 3-lần của CD19-Fc monome đã tinh chế (nồng độ thay đổi trong khoảng từ 150 và 6 nM) được tiêm đồng thời ở 50 μ l/phút dọc theo các kênh riêng rẽ 1-4, với thời gian kết hợp là 180 giây, và với thời gian phân ly là 300 giây. Mảnh Fc của IgG của người (150nM) được tiêm vào kênh 5 làm đối chứng âm tính cho gắn kết đặc hiệu với CD19-Fc monome. Tiêm dịch đệm (PBST) dọc theo kênh thứ sáu để cung cấp mẫu trắng “nội dòng” để tham chiếu. Tổng quan đồ thị cảm biến tương ứng được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig. 4A đến Fig. 4H. Tiến hành tái tạo bằng hai nhịp của 10mM glyxin độ pH 1,5 và 50mM NaOH trong 30 giây ở 90 μ l/phút (chiều dọc). Các hằng số tốc độ kết hợp (k_{on}) và các hằng số tốc độ phân ly (k_{off}) được tính toán bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một-với-một đơn giản trong phần mềm ProteOn Manager v3.1 bằng cách khớp số liệu đồng thời các đồ thị cảm biến kết hợp và phân ly. Tính toán hằng số phân ly cân bằng (K_D) theo tỷ lệ k_{off}/k_{on} . Tóm tắt về các dữ liệu động học và nhiệt động học được thể hiện trong Bảng 11. Hằng số phân ly của tất cả các dòng vô tính đã làm trưởng thành ái lực đã cải thiện so với dòng vô tính gốc 8B8 của chúng.

Bảng 11: Tóm tắt về các dữ liệu động học và nhiệt động học cho tương tác giữa kháng-CD19 huIgG1 và CD19 của người

dòng vô tính	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
8B8 gốc	5,66E+4	1,34E-4	2,36E-9
5H09	7,91E+4	1,50E-5	1,89E-10
7H07	7,45E+4	5,57E-5	7,47E-10

2B03	6,02E+4	5,00E-5	8,31E-10
2B11	6,34E+4	3,14E-5	4,95E-10
5A07	6,98E+4	3,07E-5	4,40E-10
5B08	6,81E+4	5,26E-5	7,72E-10
5D08	8,88E+4	8,44E-5	9,51E-10

Ví dụ 4

Điều chế và tinh chế IgG1 kháng-CD19 P329G LALA

Các kháng thể kháng-CD19 đã chọn lọc được sản xuất bằng cách đồng chuyển nhiễm các tế bào HEK293-EBNA với các vật truyền biểu hiện động vật có vú bằng cách sử dụng polyetylenimin. Chuyển nhiễm các tế bào này với các vật truyền biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:1 (“vật truyền chuỗi nặng”: “vật truyền chuỗi nhẹ”).

Để sản xuất trong các bình lắc 500 mL, nhân giống 400 triệu tế bào HEK293 EBNA 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Trước khi chuyển nhiễm, ly tâm các tế bào trong 5 phút ở 210 x g, và thay thế dịch nổi bằng môi trường CD CHO đã ủ ấm trước. Trộn các vật truyền biểu hiện (200 µg ADN toàn phần) trong 20 mL môi trường CD CHO. Sau khi thêm vào 540 µL PEI, tạo xoáy dung dịch trong 15 giây và ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, trộn các tế bào với dung dịch ADN/PEI, chuyển vào bình lắc 500 mL và ủ trong 3 giờ ở 37°C trong tủ ấm với khí quyển 5% CO₂. Sau khi ủ, thêm vào 160 mL môi trường F17 và nuôi cấy các tế bào trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, thêm vào 1 mM axit valproic và 7% Feed kèm chất bổ sung. Sau khi nuôi cấy trong 7 ngày, gom dịch nổi bằng cách ly tâm trong 15 phút ở 210 x g. Lọc vô khuẩn dung dịch này (màng lọc cỡ 0,22 µm), bổ sung thêm natri azit đến nồng độ cuối cùng là 0,01% (trọng lượng/thể tích), và giữ ở 4°C.

Tiến hành tinh chế các phân tử kháng thể từ các dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực bằng cách sử dụng Protein A như mô tả ở trên cho tinh chế các thể dung

hợp Fc kháng nguyên. Cô protein này và lọc trước khi nạp vào cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) đã cân bằng bằng 20mM Histidin, 140mM dung dịch NaCl có độ pH 6,0.

Xác định nồng độ protein của các kháng thể đã tinh chế bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280 nm, sử dụng hệ số dập tắt mol được tính dựa trên trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của các kháng thể được phân tích bằng CE-SDS khi có mặt và không có mặt tác nhân khử hoá (Invitrogen, USA) sử dụng LabChipGXII (Caliper). Hàm lượng kết tụ của các mẫu kháng thể được phân tích bằng cách sử dụng cột loại trừ-theo kích cỡ loại phân tích TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) đã cân bằng trong 25 mM K_2HPO_4 , 125 mM NaCl, 200mM L-Arginin Monohydroclorua, 0,02% (trọng lượng/thể tích) NaN_3 , dịch đệm độ pH 6,7 ở 25°C (Bảng 12).

Bảng 12: Phân tích hoá sinh các dòng vô tính IgG1 kháng-CD19 P329G LALA

Dòng vô tính	Hiệu suất [mg/l]	Monome [%]	CE-SDS (không khử)
8B8 gốc	25,3	100	99,1
2B11	35,4	100	98,4
7H07	89,8	100	99,4
2B03	182	100	100
5A07	90,2	100	99,4
5D08	90,2	100	99,3
5B08	24,1	99,6	100
5H09	29,9	100	98,1

Để điều chế các cấu trúc lưỡng đặc hiệu chọn dòng vô tính 2B11 vì dòng vô tính này thiếu ba điểm nóng khử amit.

Ví dụ 5

Gắn kết trên các tế bào khối u biểu hiện-CD19

Để kiểm tra khả năng gắn kết của các dòng vô tính IgG1 với các tế bào biểu hiện-CD19, sử dụng các tế bào WSU-DLCL2 (DSMZ No. ACC 575) thu được từ dịch tràn màng phổi của một người đàn ông chủng tộc người da trắng 41 tuổi có u lympho tế bào B không-Hodgkin. $0,1 \times 10^6$ các tế bào khối u được tái tạo huyền phù trong DPBS (Gibco by Life Technologies, Cat. No. 14190 326) được thêm vào mỗi giếng đĩa 96-giếng đáy-tròn hỗn dịch tế bào (greiner bio-one, cellstar, Cat. No. 650185). Rửa các tế bào một lần bằng 200 μ L DPBS. Tái tạo huyền phù các tế bào trong 100 μ L/giếng dịch đệm DPBS lạnh ở 4°C có chứa 1:5000 Fixable Viability Dye eFluor 660 đã pha loãng (eBioscience, Cat. No. 65-0864-18) và ủ các đĩa trong 30 phút ở 4°C. Rửa các tế bào một lần bằng 200 μ L/giếng dịch đệm DPBS lạnh ở 4°C và tái tạo huyền phù trong 50 μ L/giếng dịch đệm FACS lạnh ở 4°C (DPBS được cung cấp kèm theo FBS 2%, 5 mM EDTA độ pH 8 (Amresco, Cat. No. E177) và 7,5 mM natri azit (Sigma-Aldrich S2002)) có chứa các chất gắn kết CD19 ở nồng độ pha loãng theo bậc, tiếp đó ủ trong 1 giờ ở 4°C. Sau khi rửa kỹ, nhuộm màu tiếp các tế bào bằng 50 μ L/giếng dịch đệm FACS lạnh ở 4°C có chứa 5 μ g/mL mảnh F(ab')₂ của dê đặc hiệu-kháng-mảnh-F(ab')₂ của IgG của người được tiếp hợp-PE (Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 109 116 098) trong 30 phút ở 4°C. Các tế bào sau đó được rửa hai lần bằng 200 μ L/giếng dịch đệm FACS lạnh ở 4°C và cố định các tế bào trong 50 μ L/giếng DPBS có chứa Formaldehyt 1% (Sigma, HT501320-9.5L). Tái tạo huyền phù các tế bào trong 100 μ L/giếng dịch đệm FACS bằng cách sử dụng FACS LSR II (BD Biosciences). Phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng FlowJo V10 (FlowJo, LLC) và GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, Inc).

Fig.5 thể hiện khả năng gắn kết của các dòng vô tính IgG1 CD19 với các tế bào WSU-DLCL2 biểu hiện-CD19 của người. Bảng 13 thể hiện các giá trị EC₅₀ như đã xác định được.

Bảng 13: Gắn kết với các tế bào khối u biểu hiện-FAP

Dòng vô tính	EC ₅₀ [pM] CD19 ⁺ WSU-DLCL2
2B11	34
5H09	20
2B03	41
5B08	14
7H07	34

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể gắn kết đặc hiệu với CD19 của người, trong đó kháng thể này bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:99 và miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:100.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.
3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người.
4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này là mảnh kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 của người.
5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, kháng thể này là kháng thể IgG1 có chiều dài đầy đủ.
6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc 5, kháng thể này là kháng thể IgG1 có chiều dài đầy đủ với các đột biến L234A, L235A và P329G (cách đánh số theo chỉ số EU của Kabat).
7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể này phản ứng chéo đối với CD19 của người và của khỉ đầu chó.
8. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể này là kháng thể đặc hiệu kép.
9. Polynucleotit mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.
10. Vector bao gồm polynucleotit theo điểm 9.
11. Tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit theo điểm 9 hoặc vector theo điểm 10.
12. Phương pháp sản xuất kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, phương pháp này bao gồm bước (i) nuôi cấy tế bào vật chủ theo điểm 11 trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể này, và (ii) thu hồi kháng thể này.
13. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và chất mang dược dụng.
14. Thuốc chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

Các CDR theo đánh số của Kabat

F	T	L	K	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	C	L	Q	L	T	H	V	P	Y	T	F	G	Q	T	K	L	E	I	K			
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	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107

CRD L3		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
--------	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

XXXXX

503

X X X X X X X X X X

$x = \text{vị trí ngẫu nhiên}$

Fig. 2

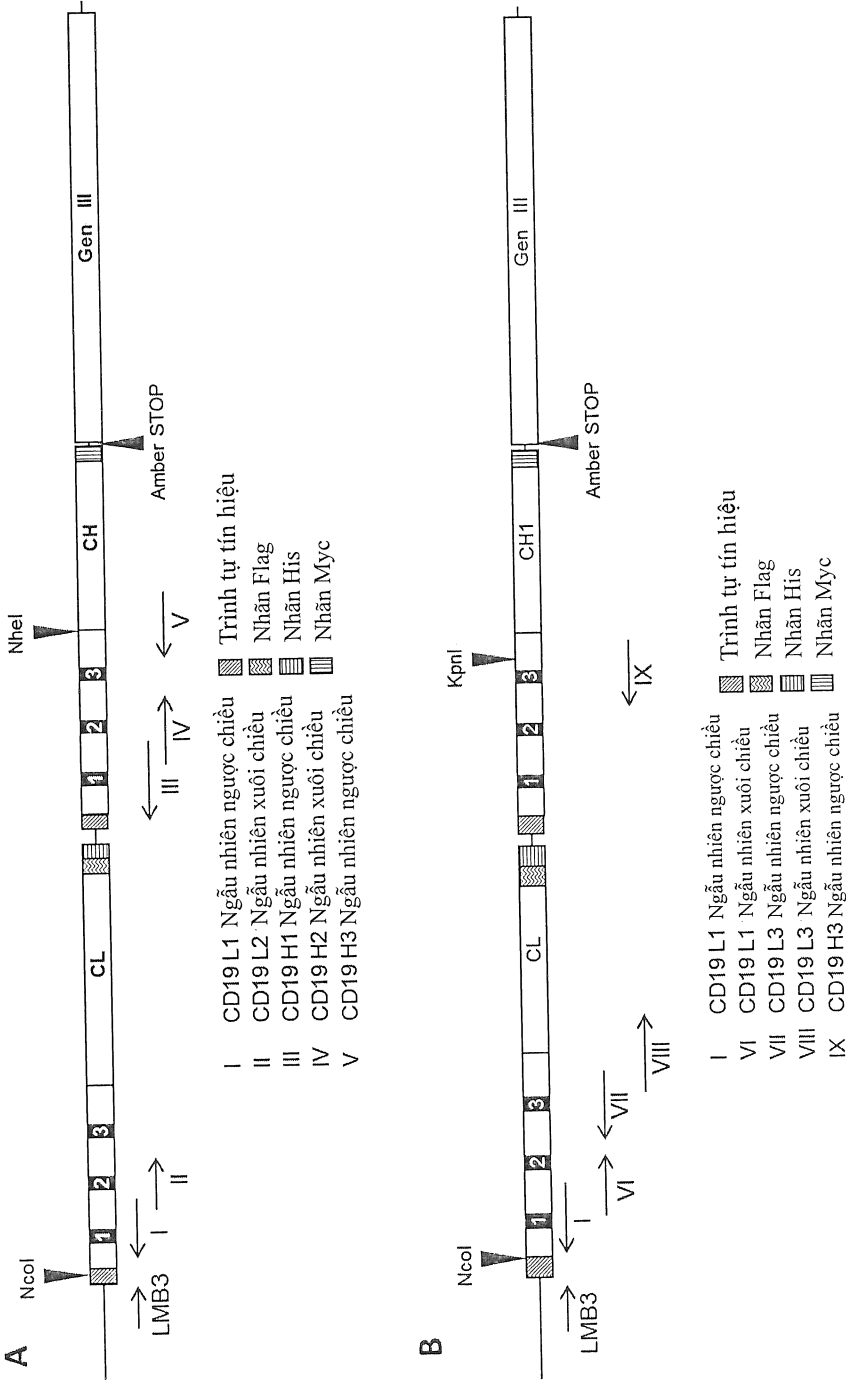


Fig. 3

	LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD19 LC	DI VMTQTPLSLSVTPGQ PASIS CKSSQ SLENSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYKRVSKRFSV PDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC		Q L T H V P Y T F G G T K L E I K
5H09	S.T.....		...IDY.V.....
7H07	T.T.....		...A..I.....
2B03	T.T.....		LED.....
2B11	T.T.T.....		...PG.Y.G.....
5A07	T.T.....		...DSY.N.....
5B08	T.T.....		E.....
5D08	T.T.....		E.....

	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD19 HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKRASGYTFDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFCQRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGT		Y Y Y Y G S A L F D Y W G G T T V T V S S
5H09	T.....		E.....
7H07	T.....		PD.....
2B03	T.....		PQ.....
2B11	T.....		PQ.....
5A07	T.....		PQ.....
5B08	T.....		E.....
5D08	T.....		E.....

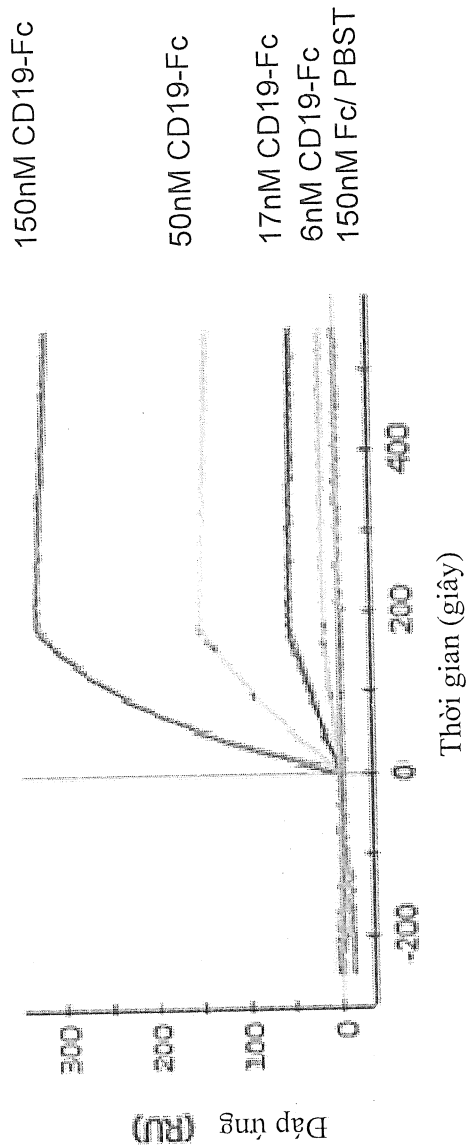


Fig. 4A
G6c

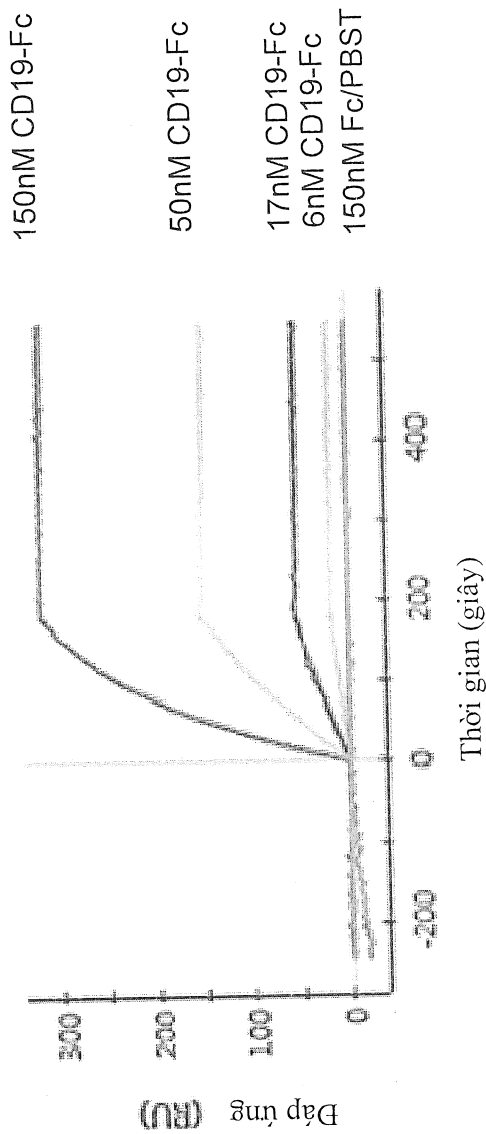


Fig. 4B
2B11

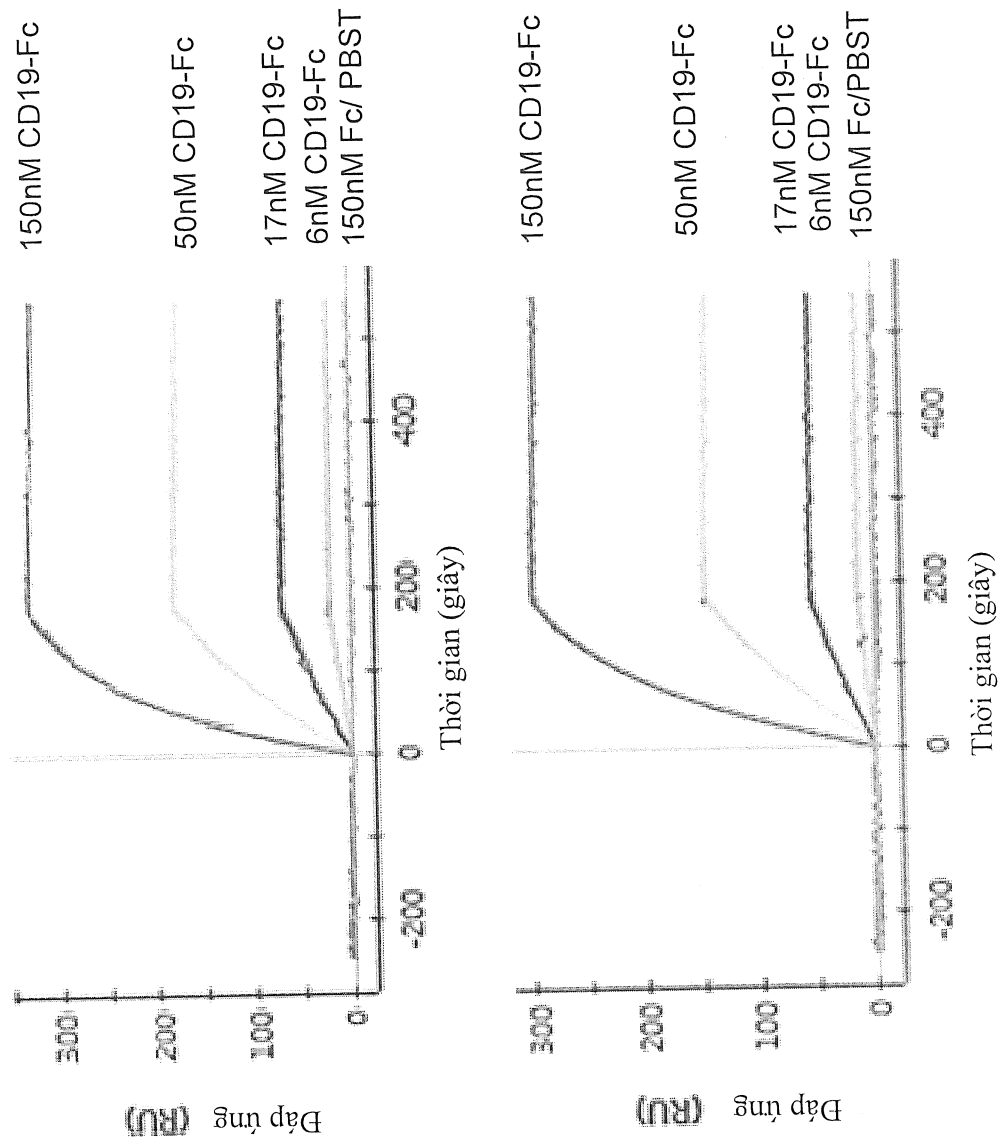


Fig. 4C
5D08

Fig. 4D
5B08

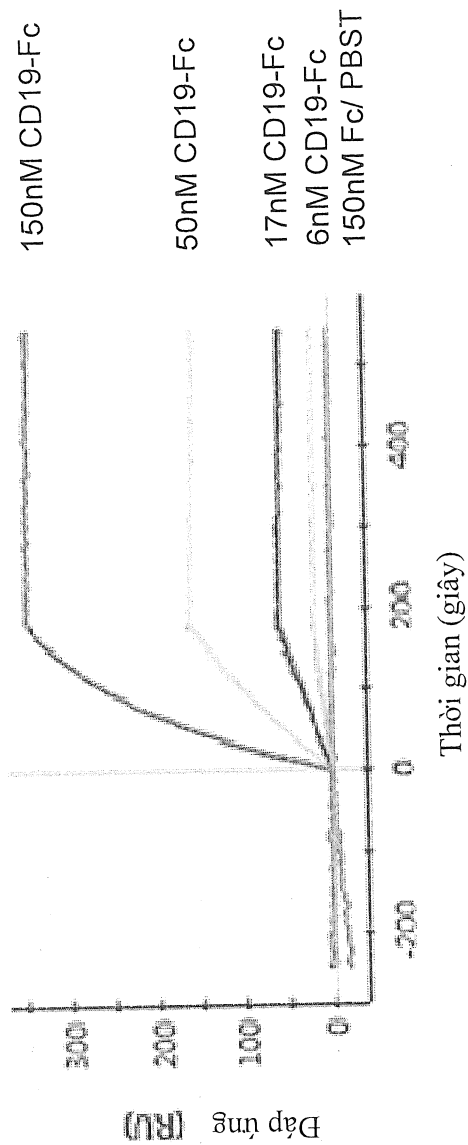


Fig. 4E
2B03

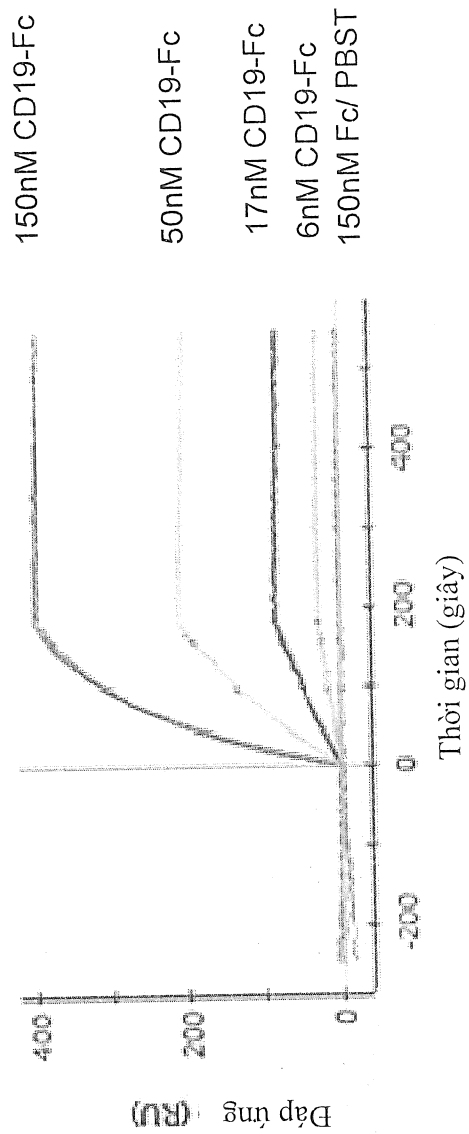


Fig. 4F
7H07

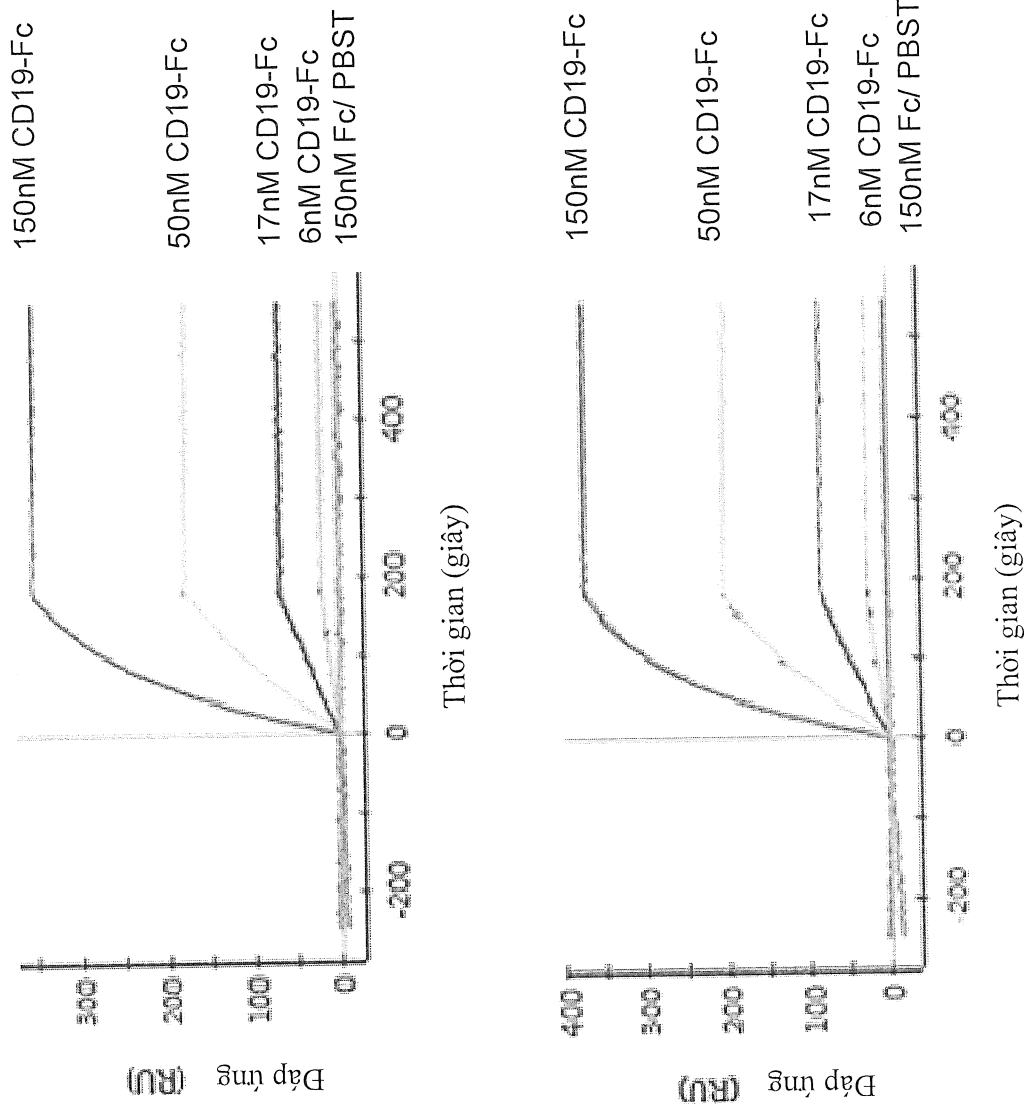
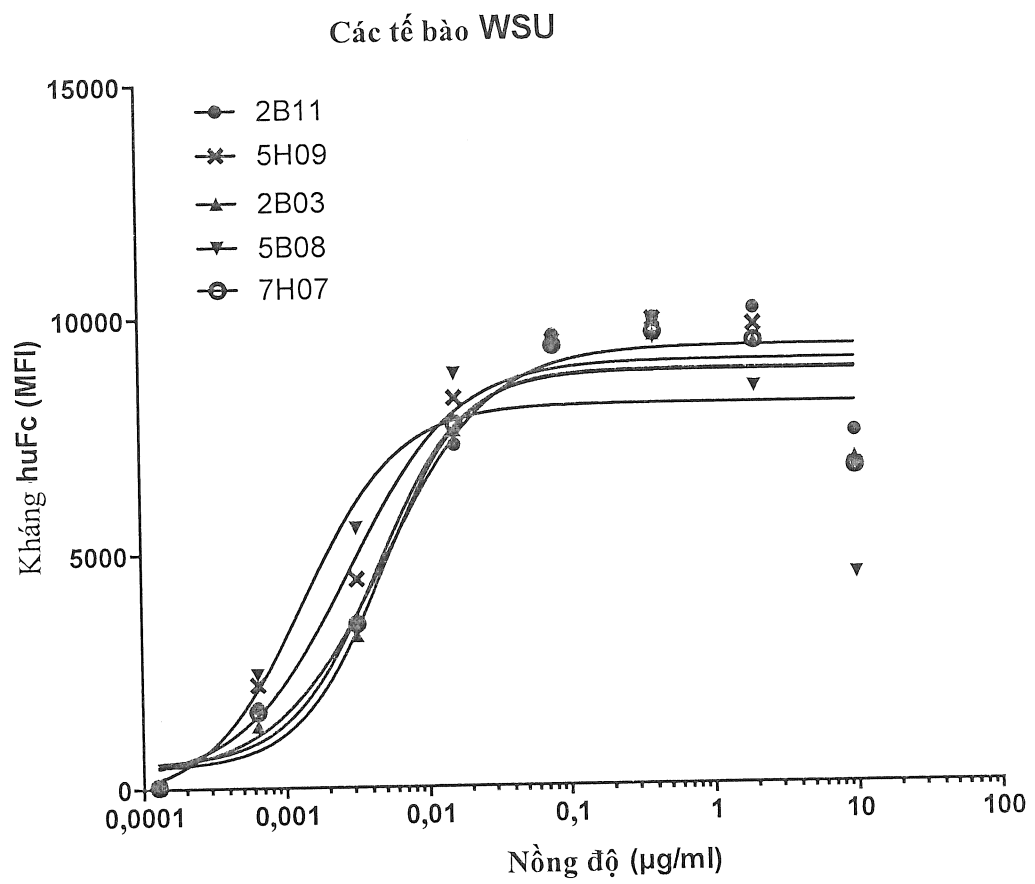


Fig. 4G
5A07

Fig. 4H
5H09

Fig. 5



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Kháng thể gắn kết đặc hiệu với CD19 của người, phương pháp sản xuất kháng thể và dược phẩm chứa kháng thể này, polynucleotit mã hóa kháng thể, vectơ và vật chủ chứa polynucleotit này

<130> P33118-WO

<150> EP15188262.8

<151> 2015-10-02

<150> EP16167893.3

<151> 2016-05-02

<160> 115

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 273

<212> PRT

<213> của người

<400> 1

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
1 5 10 15

Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
20 25 30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
35 40 45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
50 55 60

Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
65 70 75 80

Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
 115 120 125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
 130 135 140

Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
 145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
 165 170 175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
 180 185 190

Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser
 195 200 205

Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu
 210 215 220

Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr
 225 230 235 240

Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr
 245 250 255

Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
 260 265 270

Val

<210> 2
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> của khí đầu chó

<400> 2

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

Leu Gln Cys Leu Glu Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Val
 20 25 30

Trp Cys Arg Asp Ser Pro Phe Glu Pro Phe Leu Asn Leu Ser Leu Gly
 35 40 45

Leu Pro Gly Met Gly Ile Arg Met Gly Pro Leu Gly Ile Trp Leu Leu
 50 55 60

Ile Phe Asn Val Ser Asn Gln Thr Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
 65 70 75 80

Gly Leu Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Ser Val
 85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
 100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
 115 120 125

Ser Gly Lys Leu Asn Ser Ser Gln Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
 130 135 140

Pro Glu Met Trp Glu Gly Glu Pro Val Cys Gly Pro Pro Arg Asp Ser
 145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
 165 170 175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
 180 185 190

Leu Ser Trp Thr His Val Arg Pro Lys Gly Pro Lys Ser Ser Leu Leu
 195 200 205

Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Asp Arg Asp Met Trp Val Val
 210 215 220

Asp Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys
 225 230 235 240

Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Trp Thr Lys Ser Phe Tyr Leu Glu Ile
 245 250 255

Thr Ala Arg Pro Ala Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Ile Gly Gly Trp
 260 265 270

Lys Val

<210> 3
 <211> 681
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit của chuỗi lỗ Fc

<400> 3
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 60
 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420
 aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 540
 gacggctcct tcttctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgcttcac gcagaagagc 660
 ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 4
 <211> 1602
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit của chuỗi nốt phòng Fc kháng nguyên CD19 của người nhận avi

<400> 4

cccgaggaac ccctggtcgt gaaggtggaa gagggcgaca atgccgtgct gcagtgcctg 60
 aagggcacct ccgatggccc taccagcag ctgacctggt ccagagagag cccctgaag 120
 cccttctga agctgtctct gggcctgcct ggcctgggca tccatatgag gcctctggcc 180
 atctggctgt tcatcttcaa cgtgtcccag cagatgggag gcttctacct gtgtcagcct 240
 ggccccccat ctgagaaggc ttggcagcct ggctggaccg tgaacgtgga aggatccggc 300
 gagctgttcc ggtggaacgt gtccgatctg ggcggcctgg gatgcggcct gaagaacaga 360
 tctagcgagg gcccagcag cccagcggc aaactgatga gcccgaagct gtacgtgtgg 420
 gccaaggaca gaccgagat ctgggagggc gagcctcctt gcctgcccc tagagacagc 480
 ctgaaccaga gcctgagcca ggacctgaca atggcccctg gcagcacact gtggctgagc 540
 tgtggcgtgc caccgcactc tgtgtctaga ggccctctga gctggacca cgtgcaccct 600
 aagggcccta agagcctgct gagcctggaa ctgaaggacg acaggcccg cagagatatg 660
 tgggtcatgg aaaccggcct gctgctgcct agagccacag cccaggatgc cggcaagtac 720
 tactgccaca gaggcaacct gaccatgagc ttccacctgg aaatcaccgc cagaccctg 780
 ctgtggcact ggctgctgag aacaggcggc tggaaggctc acgctagcgg tggtagtccg 840
 acacctccga caccggggg tggttctgca gacaaaactc acacatgccc accgtgccc 900
 gcacctgaag ccgcaggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 960
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 1020
 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1080
 ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1140
 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc cctcggagcc 1200
 cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1260
 ctgcccccat gccgggatga gctgaccaag aaccaggctc gcctgtggtg cctggtcaaa 1320
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1380
 tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc 1440
 accgtggaca agagcagggt gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1500
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atccggaggc 1560
 ctgaacgaca tcttcgaggc ccagaagatt gaatggcacg ag 1602

<210> 5

<211> 227
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi lỗ Fc

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 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 Gly 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

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Ser Cys Ala 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 Val 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 Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 6
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nốt phòng Fc kháng nguyên CD19 của người nhân avi

<400> 6

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
 1 5 10 15

Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
 20 25 30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
 35 40 45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
 50 55 60

Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
 65 70 75 80

Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
 85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
 100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
 115 120 125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg

130		135		140
Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser				
145		150	155	160
Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr				
	165		170	175
Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro				
	180		185	190
Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser				
	195		200	205
Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu				
	210		215	220
Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr				
225		230	235	240
Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr				
	245		250	255
Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys				
	260		265	270
Val Asp Ala Ser Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly Gly				
	275		280	285
Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala				
	290		295	300
Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr				
305		310	315	320
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val				
	325		330	335
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val				
	340		345	350
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser				

355 360 365
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 370 375 380
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala
 385 390 395 400
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 405 410 415
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 420 425 430
 Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 435 440 445
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 450 455 460
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 465 470 475 480
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 485 490 495
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 500 505 510
 Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
 515 520 525
 Lys Ile Glu Trp His Glu
 530

<210> 7

<211> 1605

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nucleotit của chuỗi nốt phỏng Fc kháng nguyên CD19 của khí
 đầu chó nhĩn avi

<400> 7

```

ccccaggaac ccctggtcgt gaaggtggaa gagggcgaca atgccgtgct ccagtgcctg      60
gaaggcacct ccgatggccc tacacagcag ctcgtgtggt gcagagacag ccccttcgag      120
cccttcctga acctgtctct gggcctgcct ggcatgggca tcagaatggg ccctctgggc      180
atctggctgc tgatcttcaa cgtgtccaac cagaccggcg gcttctacct gtgtcagcct      240
ggcctgccaa gcgagaaggc ttggcagcct ggatggaccg tgtccgtgga aggatctggc      300
gagctgttcc ggtggaacgt gtccgatctg ggcggcctgg gatgcggcct gaagaacaga      360
agcagcgagg gccctagcag cccagcggc aagctgaata gcagccagct gtacgtgtgg      420
gccaaggaca gaccgagat gtgggagggc gagcctgtgt gtggcccccc tagagatagc      480
ctgaaccaga gcctgagcca ggacctgaca atggcccctg gcagcacact gtggctgagc      540
tgtggcgtgc caccgactc tgtgtccaga ggccctctga gctggacaca cgtgcggcca      600
aagggcccta agagcagcct gctgagcctg gaactgaagg acgaccggcc cgaccgggat      660
atgtgggtgg tggatacagg cctgctgctg accagagcca cagcccagga tgccggcaag      720
tactactgcc acagaggcaa ctggaccaag agcttttacc tggaaatcac cgccagaccc      780
gccctgtggc actggctgct gagaatcgga ggctggaagg tcgacgctag cggtggtagt      840
ccgacacctc cgacaccg ggggtggttct gcagacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc      900
ccagcacctg aagccgcagg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac      960
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa     1020
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca     1080
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg     1140
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcgga     1200
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac     1260
accctgcccc catgccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc     1320
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac     1380
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag     1440
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat     1500
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatccgga     1560
ggcctgaacg acatcttcga ggcccagaag attgaatggc acgag                       1605

```

<210> 8
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nốt phòng Fc kháng nguyên CD19 của khí đầu chó nhân avi

<400> 8

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

Leu Gln Cys Leu Glu Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Val
 20 25 30

Trp Cys Arg Asp Ser Pro Phe Glu Pro Phe Leu Asn Leu Ser Leu Gly
 35 40 45

Leu Pro Gly Met Gly Ile Arg Met Gly Pro Leu Gly Ile Trp Leu Leu
 50 55 60

Ile Phe Asn Val Ser Asn Gln Thr Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
 65 70 75 80

Gly Leu Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Ser Val
 85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
 100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
 115 120 125

Ser Gly Lys Leu Asn Ser Ser Gln Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
 130 135 140

Pro Glu Met Trp Glu Gly Glu Pro Val Cys Gly Pro Pro Arg Asp Ser
 145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
 165 170 175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
 180 185 190

Leu Ser Trp Thr His Val Arg Pro Lys Gly Pro Lys Ser Ser Leu Leu
 195 200 205

Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Asp Arg Asp Met Trp Val Val
 210 215 220

Asp Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys
 225 230 235 240

Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Trp Thr Lys Ser Phe Tyr Leu Glu Ile
 245 250 255

Thr Ala Arg Pro Ala Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Ile Gly Gly Trp
 260 265 270

Lys Val Asp Ala Ser Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly
 275 280 285

Gly Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 290 295 300

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 305 310 315 320

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 325 330 335

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 340 345 350

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 355 360 365

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 370 375 380

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
 385 390 395 400

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 405 410 415

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 420 425 430

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 435 440 445

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 450 455 460

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 465 470 475 480

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 485 490 495

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 500 505 510

Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala
 515 520 525

Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 530 535

<210> 9
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit ADN clon gốc VH CD19 (8B8)

<400> 9
 caagttcaat tggttcaatc tgggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgtaaagtg 60
 agctgcaaag catctgggta caccttcact gactatatca tgcaactgggt tcgtcaggcc 120
 ccggggccagg gtctggagtg gatgggctac attaaccat acaacgacgg ttccaaatat 180
 accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240
 atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtact 300
 tactactacg gttccgccct ctttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360
 tct 363

<210> 10
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit ADN clon gốc VL CD19 (8B8)

<400> 10
 gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccggttca gccagcgagc 60
 atttcttgca aatccagcca atctctggaa aactccaacg gcaacacgta cctgaactgg 120
 tatctccaga aaccgggtca gagcccgag ctgtgtgatc accgtgtatc taagcgcttc 180
 tccggcgcttc ctgatcggtt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240
 agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgct tactattgtc tgcagttgac ccacgttccg 300
 tacaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaa 336

<210> 11
 <211> 94
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 43-45: 40% Y, 6% A/S/T/G/P/D/N/E/Q/V, 49-51: 40% N, 6%
 A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 55-57: 25% S/T/Q/E, 61-63: 25% S/T/Q/E

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(45)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(51)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (55)..(57)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(63)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<400> 11
 cagctgcggg ctctgacccg gtttctggag ataccagttc agnnncgtnn ngccnnngga 60

nnnttcagaa gattggctgg atttgcaaga aatg

94

<210> 12
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 40-42: 30% R, 20% E, 5% A/S/T/Y/G/P/D/N/Q/V. 49-51: 30% K, 20% S,
 5% A/N/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 55-57: 40% F, 5% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V/I/L,
 58-60: 40% S, 6.6% A/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 67-69: 50% P, 50% L

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(42)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(51)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (55)..(57)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (58)..(60)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (67)..(69)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<400> 12
 ctccagaaac cgggtcagag cccgcagctg ctgatctacn nngtatctnn ncgcnnnnnn

60

ggcgttnnng atcgtttcag cggttctgga tccggcacc

99

<210> 13
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 40-42: 52% H, 4% G/A/S/P/T/N/Y/D/E/Q/V/I, 46-48: 30% I, 15% Y, 5%
 G/A/S/T/P/N/H/D/E/Q/V, 49-51: 52% Y, 4% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I,
 52-54: 30% D, 15% G, 5% A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 55-57: 52% T, 4%
 G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 61-63: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(42)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(48)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(51)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (52)..(54)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (55)..(57)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (61)..(63)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<400> 13
 catccactcc agaccctggc ccggggcctg acgaacccan nncatnnnnn nnnnnnngaa 60
 nnnngtaacca gatgctttgc agctcacttt aacggaagc 99

<210> 14
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 34-36: 45% Y, 5% axit amin khác, 40-42: 52% N, 4% axit amin khác,
 46-48: 40% Y,
 5% axit amin khác, 49-51: 30% N, 15% S, 5% axit amin khác, 52-54:
 30% D, 15% G,
 5% axit amin khác, 55-57: 52% G, 4% axit amin khác, 61-63: 30% K,
 15% N, 4%
 axit amin khác, 70-72: 30% E, 15% Q, 5% axit amin khác

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(36)

<223> n là a, c, g hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(42)

<223> n là a, c, g hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)..(48)

<223> n là a, c, g hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (49)..(51)

<223> n là a, c, g hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (52)..(54)

<223> n là a, c, g hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (55)..(57)

<223> n là a, c, g hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (61)..(63)

<223> n là a, c, g hoặc t

<220>

<221> misc_feature

<222> (70)..(72)

<223> n là a, c, g hoặc t

<400> 14

caggccccgg gccaggggtct ggagtggatg ggcnnnattn nccannnnn nnnnnntcc

60

nnntataccn nnaaattcca gggccgcgtc acgatgacc

99

<210> 15

<211> 33

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ổn định ngược chiều CD19 H3

<400> 15

cgtcaccgggt tcggggaagt agtccttgac cag

33

<210> 16

<211> 26
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LMB3

<400> 16
 caggaaacag ctatgaccat gattac

26

<210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 L1 ổn định xuôi chiều

<400> 17
 tggtatctcc agaaaccggg tcagagcccg cag

33

<210> 18
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 34-36: 52% Y, 4% axit amin khác, 37-39: 52% P, 4% axit amin khác,
 40-42: 42% V,
 10% L, 4% axit amin khác, 43-45: 52% H, 4% axit amin khác, 46-48:
 42% T, 10% I,
 4% axit amin khác, 49-51: 45% L, 11% G, 4% axit amin khác

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(36)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(39)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(42)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(45)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(48)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(51)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<400> 18
 tttaatttcc agtttagttc cttgaccgaa ggtnnnnnnnn nnnnnnnnnn nctgcagaca 60
 atagtagacg ccaacgtctt cagc 84

<210> 19
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 L3 ổn định xuôi chiều

<400> 19
 accttcggtc aaggaactaa actggaaatt aaacg 35

<210> 20
 <211> 107
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> pos. 59-61: 50% L, 3.8% axit amin khác, 62-64: 50% A, 4.2% axit
 amin khác, 65-67:
 50% S, 4.2% axit amin khác, 68-70: 50% G, 4.2% axit amin khác, 71-
 73: 50% Y, 4.2%
 axit amin khác, 74-76: 50% Y, 4.2% axit amin khác, 77-79: 50% Y,
 4.2% axit amin khác,
 80-82: 50% T, 4.2% axit amin khác, 83-85: 50% G, 4.2% axit amin
 khác.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (54)..(58)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (59)..(61)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature

<222> (62)..(64)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (65)..(67)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (68)..(70)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (71)..(73)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (74)..(76)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (77)..(79)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (80)..(82)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (83)..(85)
 <223> n là a, c, g hoặc t

<400> 20
 ttggtgctag cagagcttac ggtcaccgtg gtaccttggc cccagtaatc aaannnnnnn 60
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gcgtgcacaa tagtaaacag cggtgtc 107

<210> 21
 <211> 1615
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> nhãn SNAP ADN CD19 ECD- PDGFR của người

<400> 21
 ggccgccgct agcggcatcg actacaagga cgacgatgac aaggccggca tcgatgccat 60
 catggacaaa gactgcgaaa tgaagcgcac caccctggat agccctctgg gcaagctgga 120

actgtctggg tgcgaacagg gcctgcacga gatcaagctg ctgggcaaag gaacatctgc 180
 cgccgacgcc gtggaagtgc ctgccccagc cgccgtgctg ggccgaccag agccactgat 240
 gcaggccacc gcctgggtca acgcctactt tcaccagcct gaggccatcg aggagtcccc 300
 tgtgccagcc ctgcaccacc cagtgttcca gcaggagagc tttacccgcc aggtgctgtg 360
 gaaactgctg aaagtgggtga agttcggaga ggtcatcagc taccagcagc tggccgcctt 420
 ggccggcaat cccgccgcca ccgccgccgt gaaaaccgcc ctgagcggaa atcccgtgcc 480
 cattctgatc ccctgccacc ggggtggtgtc tagctctggc gccgtggggg gctacgaggg 540
 cgggctcgcc gtgaaagagt ggctgctggc ccacgagggc cacagactgg gcaagcctgg 600
 gctgggtgat atccccgagg aacccttggc cgtgaagggt gaagagggcg acaatgccgt 660
 gctgcagtgc ctgaagggca cctccgatgg ccctaccagc cagctgacct ggtccagaga 720
 gagccccctg aagcccttcc tgaagctgtc tctgggcctg cctggcctgg gcatccatat 780
 gaggcctctg gccatctggc tgttcatctt caacgtgtcc cagcagatgg gcggcttcta 840
 cctgtgtcag cctggcccc catctgagaa ggcttggcag cctggctgga ccgtgaacgt 900
 ggaaggatcc ggcgagctgt tccggtggaa cgtgtccgat ctgggcggcc tgggatgcgg 960
 cctgaagaac agatctagcg agggccccag cagccccagc ggcaaactga tgagcccaa 1020
 gctgtacgtg tgggccaagg acagaccga gatctgggag ggcgagcctc cttgcctgcc 1080
 ccctagagac agcctgaacc agagcctgag ccaggacctg acaatggccc ctggcagcac 1140
 actgtggctg agctgtggcg tgccaccga ctctgtgtct agaggccctc tgagctggac 1200
 ccacgtgcac cctaagggcc ctaagagcct gctgagcctg gaactgaagg acgacaggcc 1260
 cgccagagat atgtgggtca tggaaaccgg cctgctgctg cctagagcca cagcccagga 1320
 tgccggcaag tactactgcc acagaggcaa cctgaccatg agcttccacc tggaaatcac 1380
 cgccagaccc gtgctgtggc actggctgct gagaacaggc ggctggaagg tcgacgaaca 1440
 aaaactcatc tcagaagagg atctgaatgc tgtgggccag gacacgcagg aggtcatcgt 1500
 ggtgccacac tccttgccct ttaaggtggg ggtgatctca gccatcctgg ccctgggtgg 1560
 gctcaccatc atctccctta tcatoctcat catgctttgg cagaagaagc cacgt 1615

<210> 22
 <211> 1620
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> nhân SNAP ADN CD19 ECD- PDGFR của khi đầu chó

<400> 22

```

ccggccgccc ctagcgccat cgactacaag gacgacgatg acaaggccgg catcgatgcc      60
atcatggaca aagactgcga aatgaagcgc accaccctgg atagccctct gggcaagctg      120
gaactgtctg ggtgcgaaca gggcctgcac gagatcaagc tgctgggcaa aggaacatct      180
gccgccgacg ccgtggaagt gcctgcccca gccgccgtgc tgggcgacc agagccactg      240
atgcaggcca ccgcctgggt caacgcctac tttcaccagc ctgaggccat cgaggagttc      300
cctgtgccag ccctgcacca cccagtgttc cagcaggaga gctttaccgg ccagggtgctg      360
tggaactgct tgaaagtggg gaagttcgga gaggtcatca gctaccagca gctggccgcc      420
ctggccggca atccccggc caccgccgcc gtgaaaaccg ccctgagcgg aaatcccgtg      480
cccattctga tccccgcca ccgggtggtg tctagctctg gcgccgtggg gggctacgag      540
ggcgggctcg ccgtgaaaga gtggctgctg gccacgagg gccacagact gggcaagcct      600
gggctgggtg atatccccc ggaaccctg gtcgtgaagg tggaagaggg cgacaatgcc      660
gtgctccagt gtctcgagg cacctccgat ggccctacac agcagctcgt gtggtgcaga      720
gacagcccct tcgagccctt cctgaacctg tctctgggcc tgccctggcat gggcatcaga      780
atgggcccctc tgggcatctg gctgctgac ttcaacgtgt ccaaccagac cggcggcttc      840
tacctgtgtc agcctggcct gccaaagcag aaggcttggc agcctggatg gaccgtgtcc      900
gtggaaggat ctggcgagct gttccggtgg aacgtgtccg atctgggcgg cctgggatgc      960
ggcctgaaga acagaagcag cgagggccct agcagcccca gcggcaagct gaatagcagc     1020
cagctgtacg tgtgggcca ggacagacc gagatgtggg agggcgagcc tgtgtgtggc     1080
ccccctagag atagcctgaa ccagagcctg agccaggacc tgacaatggc ccctggcagc     1140
acactgtggc tgagctgtgg cgtgccaccc gactctgtgt ccagaggccc tctgagctgg     1200
acacacgtgc ggcctaaggg ccctaagagc agcctgctga gcctggaact gaaggacgac     1260
cggccccgacc gggatatgtg ggtggtggat acaggcctgc tgctgaccag agccacagcc     1320
caggatgccg gcaagtacta ctgccacaga ggcaactgga ccaagagctt ttacctggaa     1380
atcaccgcca gaccgcctt gtggcactgg ctgctgagaa tcggaggctg gaaggtcgac     1440
gagcagaagc tgatctccga agaggacctg aacgccgtgg gccaggatac ccaggaagtg     1500
atcgtggtgc cccacagcct gcccttcaag gtggtcgtga tcagcgccat tctggccctg     1560

```

gtgggtgctga ccatcatcag cctgatcatc ctgattatgc tgtggcagaa aaagccccgc

1620

<210> 23

<211> 539

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> nhãn SNAP CD19 ECD- PDGFR của người

<400> 23

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

Gly Ile Asp Ala Ile Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr
20 25 30

Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly
35 40 45

Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala
50 55 60

Val Glu Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu
65 70 75 80

Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala
85 90 95

Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln
100 105 110

Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys
115 120 125

Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn
130 135 140

Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val
145 150 155 160

Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val
165 170 175

Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His
 180 185 190

Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Asp Ile Pro Glu Glu
 195 200 205

Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val Leu Gln Cys
 210 215 220

Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr Trp Ser Arg
 225 230 235 240

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

Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe Ile Phe Asn
 260 265 270

Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly Pro Pro
 275 280 285

Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val Glu Gly Ser
 290 295 300

Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu Gly Cys
 305 310 315 320

Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser Gly Lys
 325 330 335

Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro Glu Ile
 340 345 350

Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser Leu Asn Gln
 355 360 365

Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp Leu
 370 375 380

Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro Leu Ser Trp
 385 390 395 400

Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser Leu Glu Leu
405 410 415

Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu Thr Gly Leu
420 425 430

Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr Tyr Cys His
435 440 445

Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr Ala Arg Pro
450 455 460

Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys Val Asp Glu
465 470 475 480

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ala Val Gly Gln Asp Thr
485 490 495

Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu Pro Phe Lys Val Val Val
500 505 510

Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu Ile
515 520 525

Ile Leu Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro Arg
530 535

<210> 24

<211> 540

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> nhãn SNAP CD19 ECD- PDGFR của khi đầu chó

<400> 24

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

Gly Ile Asp Ala Ile Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr
20 25 30

Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly
 35 40 45

Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala
 50 55 60

Val Glu Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu
 65 70 75 80

Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala
 85 90 95

Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln
 100 105 110

Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys
 115 120 125

Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn
 130 135 140

Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val
 145 150 155 160

Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val
 165 170 175

Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His
 180 185 190

Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Asp Ile Pro Gln Glu
 195 200 205

Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val Leu Gln Cys
 210 215 220

Leu Glu Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Val Trp Cys Arg
 225 230 235 240

Asp Ser Pro Phe Glu Pro Phe Leu Asn Leu Ser Leu Gly Leu Pro Gly
 245 250 255

Met Gly Ile Arg Met Gly Pro Leu Gly Ile Trp Leu Leu Ile Phe Asn
 260 265 270

Val Ser Asn Gln Thr Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly Leu Pro
 275 280 285

Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Ser Val Glu Gly Ser
 290 295 300

Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu Gly Cys
 305 310 315 320

Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser Gly Lys
 325 330 335

Leu Asn Ser Ser Gln Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro Glu Met
 340 345 350

Trp Glu Gly Glu Pro Val Cys Gly Pro Pro Arg Asp Ser Leu Asn Gln
 355 360 365

Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp Leu
 370 375 380

Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro Leu Ser Trp
 385 390 395 400

Thr His Val Arg Pro Lys Gly Pro Lys Ser Ser Leu Leu Ser Leu Glu
 405 410 415

Leu Lys Asp Asp Arg Pro Asp Arg Asp Met Trp Val Val Asp Thr Gly
 420 425 430

Leu Leu Leu Thr Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr Tyr Cys
 435 440 445

His Arg Gly Asn Trp Thr Lys Ser Phe Tyr Leu Glu Ile Thr Ala Arg
 450 455 460

Pro Ala Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Ile Gly Gly Trp Lys Val Asp
 465 470 475 480

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ala Val Gly Gln Asp
485 490 495

Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu Pro Phe Lys Val Val
500 505 510

Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu
515 520 525

Ile Ile Leu Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro Arg
530 535 540

```
<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> CD19 (8B8-5H09) CDR-L1

<400> 25

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Ser Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

```
<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> CD19(8B8-5H09) CDR-L2

<400> 26

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

```
<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> CD19(8B8-5H09) CDR-L3

<400> 27

Leu Gln Leu Ile Asp Tyr Pro Val Thr
1 5

<210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19(8B8-5H09) CDR-H1

<400> 28

Asp Tyr Ile Met His
 1 5

<210> 29
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19(8B8-5H09) CDR-H2

<400> 29

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

Gly

<210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDR(8B8-5H09) CDR-H3

<400> 30

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

<210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19(8B8-7H07) CDR-L1

<400> 31

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-7H07) CDR-L2

<400> 32

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-7H07) CDR-L3

<400> 33

Leu Gln Ala Thr His Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-7H07) CDR-H1

<400> 34

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-7H07) CDR-H2

<400> 35

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

Gly

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-7H07) CDR-H3

<400> 36

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-2B03) CDR-L1

<400> 37

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-2B03) CDR-L2

<400> 38

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B03) CDR-L3

<400> 39

Leu Gln Leu Thr His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B03) CDR-H1

<400> 40

Asp Tyr Ile Thr His
 1 5

<210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B03) CDR-H2

<400> 41

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

Gly

<210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B03) CDR-H3

<400> 42

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Asp Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B11) CDR-L1

<400> 43

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Thr	Gly	Thr	Thr	Tyr	Leu	Asn
1				5					10					15	

<210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B11) CDR-L2

<400> 44

Arg	Val	Ser	Lys	Arg	Phe	Ser
1			5			

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B11) CDR-L3

<400> 45

Leu	Gln	Leu	Leu	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr
1				5				

<210> 46
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B11) CDR-H1

<400> 46

Asp	Tyr	Ile	Met	His
1			5	

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

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B11) CDR-H2

<400> 47

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

Gly

<210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B11) CDR-H3

<400> 48

Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Pro	Gln	Leu	Phe	Asp	Tyr
1				5					10		

<210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-5A07) CDR-L1

<400> 49

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Thr	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Asn
1				5					10					15	

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-5A07) CDR-L2

<400> 50

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5A07) CDR-L3

<400> 51

Leu Gln Pro Gly His Tyr Pro Gly Thr
1 5

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5A07) CDR-H1

<400> 52

Asp Tyr Ile Met His
1 5

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

<220>
<223> CD19 (8B8-5A07) CDR-H2

<400> 53

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

Gly

<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5A07) CDR-H3

<400> 54

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

<210> 55

<211> 16

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-L1

<400> 55

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-L2

<400> 56

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-L3

<400> 57

Leu Gln Leu Asp Ser Tyr Pro Asn Thr
1 5

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-H1

<400> 58

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-H2

<400> 59

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

Gly

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-H3

<400> 60

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5D08) CDR-L1

<400> 61

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 62

<211> 7

<212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-5D08) CDR-L2

<400> 62

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
 1 5

<210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-5D08) CDR-L3

<400> 63

Leu Gln Leu Thr His Glu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 64
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-5D08) CDR-H1

<400> 64

Asp Tyr Ile Met His
 1 5

<210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-5D08) CDR-H2

<400> 65

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

Gly

<210> 66
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-5D08) CDR-H3

<400> 66

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 67
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8) parental ADN chuỗi nhẹ

<400> 67
 gatgctgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca ggtctagtca gagccttgaa aacagtaatg gaaacaccta tttgaactgg 120
 tacctccaga aaccaggcca gtctccacaa ctctgatct acagggtttc caaacgattt 180
 tctgggggtcc tagacaggtt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tatttctgcc tacaacttac acatgtcccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 360
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 68
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN chuỗi nặng gốc CD19 (8B8)

<400> 68
 gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 gcctgcaagg cttctggata cacattcact gactatatta tgcactgggt gaagcagaag 120
 actgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ttctaagtac 180
 actgagaagt tcaacggcaa ggccacactg acttcagaca aatcttccat cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcgggtct attactgtgc aagagggacc 300
 tattattatg gtagcgccct ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360
 tcggctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggte aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720
 ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 780
 cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1080
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca 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> 69
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ gốc CD19 (8B8)

<400> 69

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 70
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng gốc CD19 (8B8)

<400> 70

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe 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

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> 71
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN chuỗi nhẹ CD19 (8B8-2B11)

<400> 71
 gatattgtca tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60
 atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaccacgta cctgaactgg 120
 tatctccaga aaccgggtca gagcccgag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180
 tccggcggtc ctgacgtttt cagcgggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240
 agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgctc tactattgtc tgcagctgct ggaagatcca 300
 tacaccttcg gtcaaggaac gaaactggaa attaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 360
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 480
 tggggttaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc ctagcgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 72
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN chuỗi nặng CD19 (8B8-2B11)

<400> 72
caggtgcaat tggttcaatc tgggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60
agctgcaaag catctgggta caccttcaact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120
ccggggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180
accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240
atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300
tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggg gaccgtaagc 360
tctgctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 420
gggggacag cggccctggg ctgcctgggc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc 780
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
tgggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900
aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc 1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 73
<211> 219
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-2B11)

<400> 73

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
 20 25 30

Thr Gly Thr Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

```
<210> 74
<211> 451
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-2B11)

. <400> 74

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 Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe 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

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> 75
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN chuỗi nhẹ CD19 (8B8-7H07)

<400> 75
 gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccggtca gccagcgagc 60
 atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120
 tatctccaga aaccgggtca gagccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180
 tccggcggttc ctgatcggtt cagcgggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240
 agccgtgtgg aagctgaaga cggtggcgtc tactattgtc tgcaggcaac ccatatccca 300
 tacaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360
 ttcattcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc ctcagctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcccgcgc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 76
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN chuỗi nặng CD19 (8B8-7H07)

<400> 76
 caggtgcaat tggttcaatc tgggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60
 agctgcaaag catctgggta caccttcaact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120
 ccggggccagg gtctggagtg gatgggctac attaaccat acaacgacgg ttccaaatat 180
 accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240
 atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300
 tactactacg gttctgaact gtttgattac tggggccaag gtaccacggg gaccgtaagc 360
 tctgctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctgggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg 480
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720
 ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 780
 cctgaggtca catgctgggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tgggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1080
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 77
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-7H07)

<400> 77

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 78
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CD19 (8B8-7H07)

<400> 78

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe 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

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> 79
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN chuỗi nhẹ CD19 (8B8-2B03)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (320)..(321)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 79
 gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60
 atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120
 tatctccaga aaccgggtca gagcccgag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180
 tccggcggtc ctgatcggtt cagcgggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240
 agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgct tactattgtc tgcagttgac ccacgttccg 300
 tacaccttcg gtcaaggaan naaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360
 ttcattcttc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgct acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 80
 <211> 1353

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN chuỗi nặng CD19 (8B8-2B03)

<400> 80

```

caggtgcaat tggttcaatc tgggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg      60
agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca cgactgggt tcgtcaggcc      120
ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat      180
accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac      240
atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc      300
tactactacg gtccagatct gtttgattac tggggccaag gtaccacggg gaccgtaagc      360
tctgctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct      420
gggggcacag cggccctggg ctgcctgggc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg      480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc      540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag      600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag      660
cccaaattct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg      720
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc      780
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      840
tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac      900
aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc      960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc     1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat     1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac     1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc     1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcagtctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac     1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa                                  1353

```

<210> 81

<211> 219

<212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B03) chuỗi nhẹ

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (107)..(107)
 <223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ
 <400> 81

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Xaa Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 82
<211> 451
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-2B03)

<400> 82

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 Asp Tyr
20 25 30

Ile Thr His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Asp Leu Phe 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

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> 83
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5A07)

<400> 83	
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccggtca gccagcgagc	60
atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg	120
tatctccaga aaccgggtca gagccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc	180
tccggcggtc ctgatcggtt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc	240
agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagccagg tcattaccca	300
ggtaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggaggctgc accatctgtc	360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa	480
tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540
agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa	600

gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt

657

<210> 84

<211> 1353

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN chuỗi nặng CD19 (8B8-5A07)

<400> 84

caggtgcaat tgggttcaatc tgggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg	60
agctgcaaag catctgggta caccttact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc	120
ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaaccat acaacgacgg ttccaaatat	180
accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac	240
atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtact	300
tactactacg gttccgccct ctttgattac tggggccaag gtaccacggg gaccgtaagc	360
tctgctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct	420
gggggcacag cggccctggg ctgcctgggc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc	540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag	600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag	660
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg	720
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc	780
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840
tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	900
aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
aaggagtaca agtgcaagg ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc	1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat	1080
gagctgacca agaaccagg cagcctgacc tgcttgggtc aaggcttcta tcccagcgac	1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac	1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa

1353

<210> 85

<211> 219

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5A07)

<400> 85

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Pro
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 86

<211> 451

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-5A07)

<400> 86

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe 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

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> 87
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5D08)

<400> 87
 gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccggtca gccagcgagc 60
 atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120
 tatctccaga aaccgggtca gagccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180
 tccggcggtc ctgacggttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240
 agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagctgac ccatgaacca 300
 tacaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 360
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcttgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt

657

<210> 88

<211> 1353

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN chuỗi nặng CD19 (8B8-5D08)

<400> 88

caggtgcaat tgggtcaatc tgggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg	60
agctgcaaag catctgggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc	120
ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat	180
accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac	240
atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc	300
tactactacg gttctgaact gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc	360
tctgctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct	420
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc	540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag	600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag	660
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg	720
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc	780
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840
tgggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc	1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat	1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggtc aaggcttcta tcccagcgac	1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa

1353

<210> 89

<211> 219

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5D08)

<400> 89

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 90
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng CD19 (8B8-5D08)

<400> 90

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe 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

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> 91
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5B08)

<400> 91
 gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccggtca gccagcgagc 60
 atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120
 tatctccaga aaccgggtca gagcccgag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180
 tccggcgcttc ctgatcggtt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240
 agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagctgga ttcttacc 300
 aacaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 360
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt

657

<210> 92

<211> 1353

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN chuỗi nặng CD19 (8B8-5B08)

<400> 92

caggtgcaat tggttcaatc tgggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg	60
agctgcaaag catctgggta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc	120
ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat	180
accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac	240
atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc	300
tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggg gaccgtaagc	360
tctgctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct	420
gggggcacag cggccctggg ctgcctgggc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctgt cctacagtcc	540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag	600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag	660
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg	720
ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc	780
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840
tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	900
aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc	1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat	1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtc aaggcttcta tcccagcgac	1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa

1353

<210> 93

<211> 219

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5B08)

<400> 93

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 94

<211> 451

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-5B08)

<400> 94

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 Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe 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

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> 95
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> ADN chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5H09)

<400> 95
 gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60
 atttcttgca aatccagcca atctctggaa tcttccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120
 tatctccaga aaccgggtca gagcccgag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180
 tccggcgcttc ctgatcggtt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240
 agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagctgat cgattaccca 300
 gttaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 360
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcttgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt

657

<210> 96

<211> 1353

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN chuỗi nặng CD19 (8B8-5H09)

<400> 96

caggtgcaat tgggttcaatc tgggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg	60
agctgcaaag catctgggta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc	120
ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat	180
accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac	240
atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc	300
tactactacg gttctgcact gtttgattac tggggccaag gtaccacggg gaccgtaagc	360
tctgctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct	420
gggggcacag cggccctggg ctgcctgggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc	540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag	600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag	660
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg	720
ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	780
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840
tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac	900
aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc	1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat	1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggtc aaggcttcta tcccagcgac	1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa

1353

<210> 97

<211> 219

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5H09)

<400> 97

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Ser Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

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

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

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 98

<211> 451

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-5H09)

<400> 98

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe 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

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> 99
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8-2B11) VH

<400> 99

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

 $\langle 210 \rangle$ 100

$\langle 211 \rangle$ 112

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> CD19 (8B8-2B11) VL

 $\langle 400 \rangle \quad 100$

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Thr Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

 $\langle 210 \rangle$ 101

$\langle 211 \rangle$ 121

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-7H07) VH

<400> 101

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 102

<211> 112

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-7H07) VL

<400> 102

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 103

<211> 121

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-2B03) VH

<400> 103

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 Asp Tyr
 20 25 30

Ile Thr His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Asp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104
<211> 112
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B03) VL

<220>
<221> misc_feature
<222> (107)..(107)
<223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ

<400> 104

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Xaa Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 105
<211> 121
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5A07) VH

<400> 105

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 Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 106

<211> 112

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5A07) VL

<400> 106

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Pro
 85 90 95

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

<210> 107

<211> 121

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5D08) VH

<400> 107

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 108
<211> 112
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5D08) VL

<400> 108

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 109
<211> 121
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5B08) VH

<400> 109

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 110

<211> 112

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5B08) VL

<400> 110

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 111
<211> 121
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5H09) VH

<400> 111

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 Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 112
<211> 112
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5H09) VL

<400> 112

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Ser Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 113

<211> 121

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8) VH

<400> 113

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 Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 114
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD19 (8B8) VL

<400> 114

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 115
 <211> 556
 <212> PRT
 <213> của người

<400> 115

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
 1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
 20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
 35 40 45

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
 50 55 60

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
 65 70 75 80

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
 85 90 95

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
 100 105 110

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
 115 120 125

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
 130 135 140

Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
 145 150 155 160

Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
 165 170 175

Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
 180 185 190

Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
 195 200 205

Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
 210 215 220

Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
 225 230 235 240

Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
 245 250 255

Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
 260 265 270

Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
 275 280 285

Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
 290 295 300

Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
 305 310 315 320

Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
 325 330 335

Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
 340 345 350

Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
 355 360 365

Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
 370 375 380

Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
 385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
 405 410 415

Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu
 420 425 430

Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly
 435 440 445

Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu
 450 455 460

Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser
 465 470 475 480

Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly
 485 490 495

Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln
 500 505 510

Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala
 515 520 525

Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp
 530 535 540

Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
 545 550 555