(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) **1-0035799**

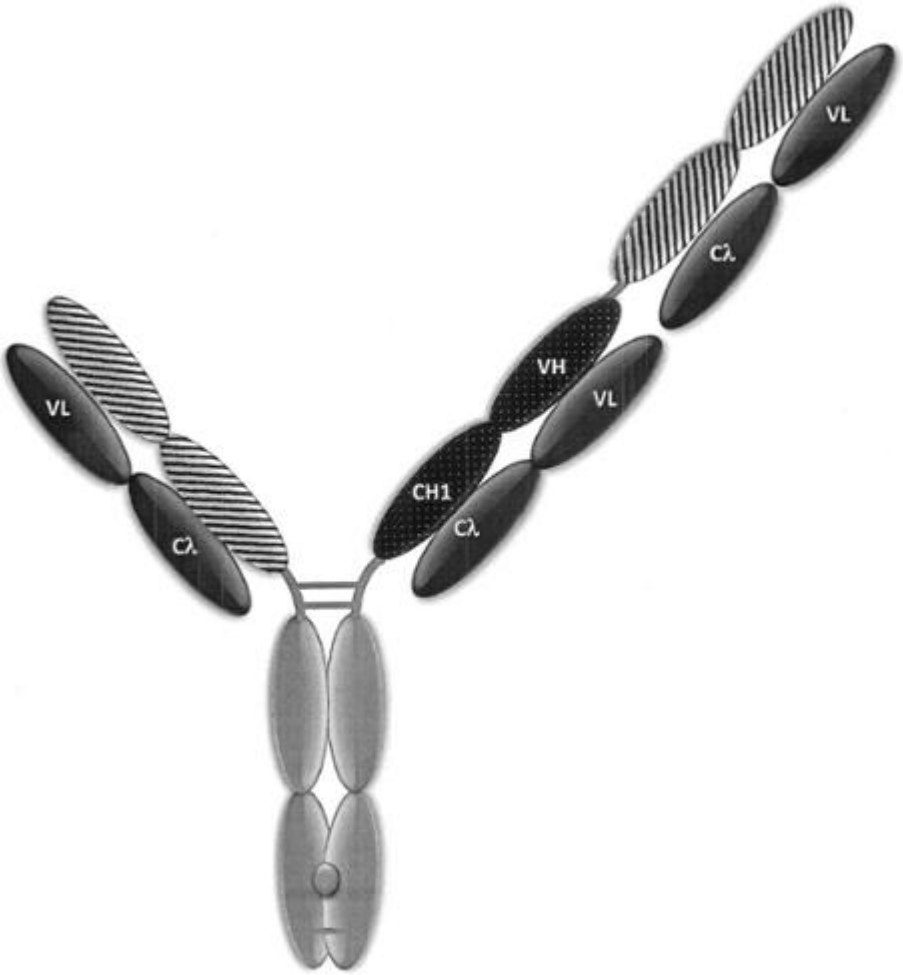
(51)[7] **C07K 16/28**; C07K 16/46; A61K 39/395; A61P 35/00

(13) **B**

(21) 1-2017-01879
(22) 17/11/2015
(86) PCT/EP2015/076739 17/11/2015
(87) WO2016/079076 26/05/2016
(30) 14194147.6 20/11/2014 EP
(45) 25/05/2023 422
(43) 25/09/2017 354A
(73) F. Hoffmann-La Roche AG (CH)
Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basel, Switzerland
(72) BACAC, Marina (IT); BRUENKER, Peter (DE); PREIMOSER-GRUNDSCHOBER, Anne (CH); HOSSE, Ralf (DE); KLEIN, Christian (DK); MOESSNER, Ekkehard (DE); UMANA, Pablo (CR); WEINZIERL, Tina (DE).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHÂN TỬ GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN ĐẶC HIỆU KÉP HOẠT HÓA TẾ BÀO T, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PHÂN TỬ NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập chung đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép để hoạt hóa tế bào T và đổi hướng đến các tế bào đích đặc hiệu. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này, và vectơ và tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit này. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế.


VL
Cλ
VH
VL
CH1
Cλ
VL
Cλ

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép để hoạt hóa tế bào T, cụ thể là kháng thể đặc hiệu kép hướng đích CD3 và thụ thể folat 1 (FolR1). Ngoài ra, sáng chế đề cập đến polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này, và các vectơ và tế bào vật chủ chứa polynucleotit này. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế, và phương pháp sử dụng các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này để điều trị bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc phá hủy có chọn lọc đối với một tế bào riêng rẽ hoặc một kiểu tế bào cụ thể thường được mong đợi trong các thiết lập lâm sàng khác nhau. Ví dụ, đây là mục tiêu chính của liệu pháp ung thư nhằm phá hủy chọn lọc các tế bào khối u, trong khi để lại một cách nguyên vẹn và không gây tổn thương đến tế bào và mô khỏe mạnh.

Một biện pháp có khả năng thực hiện được điều này là gây cảm ứng đáp ứng miễn dịch kháng khối u, khiến cho các tế bào tác động miễn dịch như tế bào diệt tự nhiên (NK) hoặc tế bào lympho T gây độc tế bào (CTL) tấn công và phá hủy các tế bào khối u. CTL góp phần tạo nên các tế bào tác động có hoạt lực lớn nhất của hệ miễn dịch, tuy nhiên chúng không thể được hoạt hóa bằng cơ chế tác động được điều tiết bởi miền Fc của kháng thể trị liệu thông thường.

Về mặt này, kháng thể đặc hiệu kép được thiết kế để gắn kết bằng một "nhánh" với kháng nguyên bề mặt trên tế bào đích, và bằng "nhánh" thứ hai với thành phần hoạt hóa, không thay đổi của phức hợp thụ thể tế bào T (TCR), đã nhận được nhiều sự quan tâm trong những năm gần đây. Việc gắn kết đồng thời của kháng thể này với cả hai đích của nó sẽ thúc đẩy tương tác tạm thời giữa tế bào đích và tế bào T, gây hoạt hóa tế bào T gây độc tế bào bất kỳ và sau đó làm tan tế bào đích. Do đó, đáp ứng miễn dịch được đổi hướng đến tế bào đích và không phụ thuộc vào sự trình diện kháng nguyên peptit của tế bào đích hoặc tính đặc hiệu của tế bào T như trường hợp hoạt hóa CTL giới hạn MHC

thông thường. Trong trường hợp này, chủ yếu là CTL chỉ được hoạt hóa khi tế bào đích trình diện kháng thể đặc hiệu kép với chúng, tức là xi-náp miễn dịch được bắt chước. Điều đặc biệt mong muốn là kháng thể đặc hiệu kép không cần tế bào lympho điều hòa trước hoặc cùng kích thích để làm tan các tế bào đích một cách hiệu quả.

FOLR1 được biểu hiện trên tế bào u biểu mô có nhiều nguồn gốc khác nhau, ví dụ, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư trực tràng ruột kết, bệnh ung thư nội mạc tử cung. Một vài phương pháp để hướng đích FOLR1 bằng kháng thể trị liệu, như farletuzumab, thể tiếp hợp kháng thể thuốc, hoặc liệu pháp tế bào T thích ứng để chụp ảnh khối u đã được mô tả (Kandalaft et al., J Transl Med. 2012 Aug 3;10:157. doi: 10.1186/1479-5876-10-157; van Dam et al., Nat Med. 2011 Sep 18;17(10):1315-9. doi: 10.1038/nm.2472; Cliftonet al., Hum Vaccin. 2011 Feb;7(2):183-90. Epub 2011 Feb 1; Kelemen et al., Int J Cancer. 2006 Jul 15;119(2):243-50; Vaitilingam et al., J Nucl Med. 2012 Jul;53(7); Teng et al., 2012 Aug;9(8):901-8. doi: 10.1517/17425247.2012.694863. Epub 2012 Jun 5. Cũng đã có một số nỗ lực nhằm hướng đích khối u dương tính với thụ thể folat bằng các cấu trúc hướng đích thụ thể folat và CD3 (Kranz et al., Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 26, 1995; 92(20): 9057–9061; Roy et al., Adv Drug Deliv Rev. 2004 Apr 29;56(8):1219-31; Huiting Cui et al Biol Chem. Aug 17, 2012; 287(34): 28206–28214; Lamers et al., Int. J. Cancer. 60(4):450 (1995); Thompson et al., MAbs. 2009 Jul-Aug;1(4):348-56. Epub 2009 Jul 19; Mezzanzanca et al., Int. J. Cancer, 41, 609–615 (1988). Tuy nhiên, tính đến thời điểm hiện tại thì các phương pháp này có nhiều nhược điểm. Các phân tử được sử dụng trong các phương pháp nêu trên hiện nay chưa có thể sản xuất được một cách dễ dàng và đáng tin do chúng cần liên kết ngang hóa học. Tương tự, phân tử lai không thể được tạo ra với số lượng lớn dưới dạng protein người và cần sử dụng protein chuột cống, chuột hoặc các protein khác mà có tính sinh miễn dịch ở mức độ cao khi được dùng cho người và, do đó, có giá trị trị liệu bị hạn chế. Hơn nữa, nhiều phân tử hiện nay vẫn giữ lại liên kết FcgR.

Do đó, vẫn có nhu cầu về kháng thể đặc hiệu kép mới được cải tiến dùng cho liệu pháp miễn dịch qua trung gian tế bào T đã được hướng đích. Sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép được thiết kế để hoạt hóa tế bào T đã được hướng đích, cụ thể là, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép thích hợp dưới dạng chất điều trị bệnh hữu hiệu và an toàn mà có thể dễ dàng được sản xuất và định liều.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm ít nhất một trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34; và

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1).

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm (iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm các trình tự của vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng và CDR của chuỗi nhẹ giống nhau. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba giống với gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai.

Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trong số các phương án nêu trên, ít nhất một trong số gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba là phân tử Fab. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trong số các phương án nêu trên, còn 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 số phương án, mỗi gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được nối ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo một số phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, tùy ý thông qua chất liên kết peptit.

Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trong số các phương án nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm ít nhất một trình tự axit amin của vùng xác

định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm ít nhất một trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 57 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 65. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64.

Theo một phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm ít nhất một trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 50 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm (a) trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ trợ của chuỗi nặng 1 (CDR-H1) của SEQ ID NO: 8; (b) trình tự axit amin của CDR-H2 của SEQ ID NO: 9; (c) trình tự axit amin của CDR-H3 của SEQ ID NO: 50; (d) trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ trợ của chuỗi nhẹ 1 (CDR-L1) của SEQ ID NO: 52; (e) trình tự axit amin của CDR-L2 của SEQ ID NO: 53, và (f) trình tự axit amin của CDR-L3 của SEQ ID NO: 54. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51.

Theo một phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm ít nhất một trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 275 và SEQ ID NO: 315 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34. Theo một phương án, gốc gắn

kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm (a) trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ trợ của chuỗi nặng 1 (CDR-H1) của SEQ ID NO: 16; (b) trình tự axit amin của CDR-H2 của SEQ ID NO: 275; (c) trình tự axit amin của CDR-H3 của SEQ ID NO: 315; (d) trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ trợ của chuỗi nhẹ 1 (CDR-L1) của SEQ ID NO: 32; (e) trình tự axit amin của CDR-L2 của SEQ ID NO: 33, và (f) trình tự axit amin của CDR-L3 của SEQ ID NO: 34. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 274 và miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL) bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trong số các phương án nêu trên gắn kết với FolR1 ở người. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trong số các phương án nêu trên gắn kết với FolR1 ở người và FolR1 ở khỉ đầu chó. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trong số các phương án nêu trên gắn kết với FolR1 ở người, FolR1 ở khỉ đầu chó và FolR1 ở chuột. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trong số các phương án nêu trên gắn kết với FolR1 ở người, FolR1 ở khỉ đầu chó và không gắn kết với FolR1 ở chuột.

Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi hoặc vùng hằng định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên bao gồm không nhiều hơn một gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3. Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai và miền Fc là một phần của phân tử globulin miễn dịch. Theo một phương án, miền Fc là globulin miễn dịch lớp IgG, cụ thể là miền Fc lớp IgG_1 hoặc IgG_4. Theo một phương án, miền Fc là miền Fc người.

Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Theo một phương án, trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra phần

lồi bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất mà được bố trí trong hốc bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra hốc bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai mà phần lồi bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất được bố trí trong đó. Theo một phương án, miền Fc bao gồm ít nhất một biến thể thay thế axit amin làm giảm khả năng gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động, so với miền Fc IgG_1 tự nhiên. Theo một phương án, mỗi cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bao gồm ba biến thể thay thế axit amin làm giảm khả năng gắn kết với thụ thể Fc hoạt hóa và/hoặc chức năng tác động trong đó biến thể thay thế axit amin nêu trên là L234A, L235A và P329G (đánh số theo Kabat). Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo một phương án, chức năng tác động là độ độc hại tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng sự tăng sinh của tế bào T dương tính với CD3 ở người *in vitro*. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người của tế bào khối u người biểu hiện FolR1 *in vitro*. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u người biểu hiện FolR1 *in vitro*. Theo một phương án, tế bào T là tế bào T CD8+. Theo một phương án, tế bào khối u người biểu hiện FolR1 là tế bào Hela, Skov-3, HT-29, hoặc HRCEpiC. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u người biểu hiện FolR1 *in vitro* với EC50 nằm trong khoảng từ 36pM đến 39573pM sau 24 giờ. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 *in vitro* với EC50 bằng khoảng 36pM sau 24 giờ. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 *in vitro* với EC50 bằng khoảng 178,4pM sau 24 giờ. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm

ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 *in vitro* với EC50 bằng khoảng 134,5pM hoặc lớn hơn sau 48 giờ.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên cảm ứng việc điều hòa tăng sự biểu hiện bề mặt tế bào của ít nhất một trong số CD25 và CD69 trên tế bào T như được đo bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Theo một phương án, tế bào T là tế bào T $CD4^+$ hoặc tế bào T $CD8^+$. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên gắn kết FolR1 ở người với K_D biểu kiến nằm trong khoảng từ 5,36pM đến 4nM. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó với K_D biểu kiến bằng khoảng 4nM. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở chuột với K_D biểu kiến bằng khoảng 1,5nM. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người với K_D gắn kết hóa trị một bằng ít nhất là khoảng 1000nM.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là đặc hiệu đối với FolR1 và không gắn kết với FolR2 hoặc FolR3. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có ái lực (gắn kết hóa trị một) bằng 1µM hoặc lớn hơn. Theo một phương án, ái lực này bằng khoảng 1,4µM đối với FolR1 ở người. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có ái tính (gắn kết hóa trị hai) bằng khoảng 1-100nM hoặc nhỏ hơn. Theo một phương án, ái tính bằng khoảng 10nM hoặc nhỏ hơn. Theo một phương án, ái tính bằng 10nM.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên gắn kết với FolR1 được biểu hiện trên tế bào khối u người. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên gắn kết với epitop cấu hình trên FolR1 ở người. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên không gắn kết với thụ thể folat 2 (FolR2) của người hoặc thụ thể folat 3 (FolR3) của

người. Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên gắn kết với polypeptit FolR1 bao gồm các axit amin ở vị trí từ 25 đến 234 của FolR1 ở người (SEQ ID NO:227). Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 gắn kết với polypeptit FolR1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:227, 230 và 231, và trong đó gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 không gắn kết với polypeptit FolR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:228 và 229.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm a) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất cạnh tranh để gắn kết với FolR1 ở người với kháng thể đối chiếu bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 49 và miền chuỗi nhẹ biến đổi của SEQ ID NO: 51; và b) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai cạnh tranh để gắn kết với CD3 ở người với kháng thể đối chiếu bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 36 và miền chuỗi nhẹ biến đổi của SEQ ID NO: 31, trong đó mức gắn kết cạnh tranh được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm a) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất cạnh tranh để gắn kết với FolR1 ở người với kháng thể đối chiếu bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 274 và miền chuỗi nhẹ biến đổi của SEQ ID NO: 31; và b) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai cạnh tranh để gắn kết với CD3 ở người với kháng thể đối chiếu bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 36 và miền chuỗi nhẹ biến đổi của SEQ ID NO: 31, trong đó mức gắn kết cạnh tranh được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1), trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với cùng một epitop trên FolR1 ở người giống như kháng thể đối chiếu thứ nhất bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 49 và miền chuỗi nhẹ biến đổi của SEQ ID NO: 51; và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với cùng một epitop trên CD3 ở người giống như kháng thể

đối chiếu thứ hai bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 36 và miền chuỗi nhẹ biến đổi của SEQ ID NO: 31.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1), trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với cùng một epitop trên FolR1 ở người giống như kháng thể đối chiếu thứ nhất bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 274 và miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL) của SEQ ID NO: 31; và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với cùng một epitop trên CD3 ở người giống như kháng thể đối chiếu thứ hai bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 36 và miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL) của SEQ ID NO: 31.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà cạnh tranh để gắn kết với FolR1 ở người với kháng thể bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 274 và miền chuỗi nhẹ biến đổi của SEQ ID NO: 31, trong đó mức gắn kết cạnh tranh được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm chuỗi polypeptit thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư và thứ năm tạo ra gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết với CD3 và mỗi gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết với thụ thể folat 1 (FolR1), trong đó a) chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai bao gồm, theo chiều từ đầu tận cùng (N) amin đến đầu tận cùng (C) carboxyl, VLD1 và CLD1; b) chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm, theo chiều từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, VLD2 và CH1D2; c) chuỗi polypeptit thứ tư bao gồm, theo chiều từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, VHD1, CH1D1, CH2D1 và CH3D1; d) chuỗi polypeptit thứ năm bao gồm VHD1, CH1D1, VHD2, CLD2, CH2D2 và CH3D2; trong đó VLD1 là miền biến đổi chuỗi nhẹ thứ nhất, VLD2 là miền biến đổi chuỗi nhẹ thứ hai, CLD1 là miền hằng định chuỗi nhẹ thứ nhất, CLD2 là miền hằng định chuỗi nhẹ thứ hai, VHD1 là miền biến đổi chuỗi nặng thứ nhất, VHD2 là miền biến đổi chuỗi nặng thứ hai, CH1D1 là miền hằng định chuỗi nặng 1 thứ nhất, CH1D2 là miền hằng định chuỗi nặng 1 thứ hai, CH2D1 là miền hằng

định chuỗi nặng 2 thứ nhất, CH2D2 là miền hằng định chuỗi nặng 2 thứ hai, CH3D1 là miền hằng định chuỗi nặng 3 thứ nhất, và CH3D2 là miền hằng định chuỗi nặng 3 thứ hai.

Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, (i) chuỗi polypeptit thứ ba và VHD2 và CLD2 của chuỗi polypeptit thứ năm tạo ra gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết với CD3; (ii) chuỗi polypeptit thứ nhất và VHD1 và CH1D1 của chuỗi polypeptit thứ tư tạo ra gốc gắn kết thứ hai có khả năng gắn kết với FolR1; và (iii) chuỗi polypeptit thứ hai và VHD1 và CH1D1 của chuỗi polypeptit thứ năm tạo ra gốc gắn kết thứ ba có khả năng gắn kết với FolR1. Theo một phương án, CH2D1, CH3D1, CH2D2 và CH3D2 tạo ra miền Fc của globulin miễn dịch lớp IgG. Theo một phương án, miền Fc là miền Fc người. Theo một phương án, miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Theo một phương án, CH3D2 bao gồm gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, được bố trí trong hốc bên trong CH3D1. Theo một phương án, miền Fc bao gồm ít nhất một biến thể thay thế axit amin làm giảm mức gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động, so với miền Fc IgG_1 tự nhiên. Theo một phương án, mỗi cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bao gồm ba biến thể thay thế axit amin làm giảm ít nhất một trong các gắn kết với thụ thể Fc hoạt hóa và chức năng tác động trong đó biến thể thay thế axit amin nêu trên là L234A, L235A và P329G theo cách đánh số theo Kabat. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng sự tăng sinh của tế bào T dương tính với CD3 ở người *in vitro*. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng sự tiêu diệt qua trung gian tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người của tế bào khối u người biểu hiện FolR1 *in vitro*. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u người biểu hiện FolR1 *in vitro*. Theo một phương án như vậy, tế bào khối u người biểu hiện FolR1 là tế bào Hela, Skov-3, HT-29, hoặc HRCEpiC. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 *in vitro* với EC50 nằm trong khoảng từ 36pM đến 39573pM sau 24 giờ. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 *in vitro* với

EC50 bằng khoảng 36pM sau 24 giờ. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 *in vitro* với EC50 bằng khoảng 178,4pM sau 24 giờ. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 *in vitro* với EC50 bằng khoảng 134,5pM hoặc lớn hơn sau 48 giờ. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc điều hòa tăng sự biểu hiện bề mặt tế bào của ít nhất một trong số CD25 và CD69 trên tế bào T như được đo bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Theo một phương án như vậy, tế bào T là tế bào T $CD4^+$ hoặc tế bào T $CD8^+$. Theo một trong số các phương án nêu trên, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với FolR1 ở người với K_D biểu kiến nằm trong khoảng từ 5,36pM đến 4nM. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó với K_D biểu kiến bằng khoảng 4nM. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với FolR1 ở chuột với K_D biểu kiến bằng khoảng 1,5nM. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với FolR1 ở người với K_D gắn kết hóa trị một bằng ít nhất là khoảng 1000nM. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với FolR1 được biểu hiện trên tế bào khối u người. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với epitop cấu hình trên FolR1 ở người. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T không gắn kết với thụ thể folat 2 (FolR2) của người hoặc thụ thể folat 3 (FolR3) của người. Theo một trong số các phương án nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên gắn kết với polypeptit FolR1 bao gồm các axit amin ở vị trí từ 25 đến 234 của FolR1 ở người (SEQ ID NO:227). Theo một trong số các phương án nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 gắn kết với polypeptit FolR1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:227, 230 và 231, và trong đó gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 không gắn kết với polypeptit FolR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:228 và 229. Theo một trong số các phương án nêu trên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu

kép hoạt hóa tế bào T là phân tử được nhân hóa hoặc phân tử khảm. Theo một trong số các phương án nêu trên, VHD2 và CH1D1 được liên kết qua chất liên kết peptit.

Theo một trong số các phương án nêu trên của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:230. Theo một trong số các phương án nêu trên của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:86. Theo một trong số các phương án nêu trên của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, chuỗi polypeptit thứ tư bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:309. Theo một trong số các phương án nêu trên của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, chuỗi polypeptit thứ năm bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:308. Theo một trong số các phương án nêu trên của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:230; chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:86; chuỗi polypeptit thứ tư bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:309; và chuỗi polypeptit thứ năm bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:308.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:308. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án trên đây còn bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:230 và của SEQ ID NO:86.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:308. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:309.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:276. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án trên đây còn bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:277 và của SEQ ID NO:35.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:277. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:276.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án được nêu trong bản mô tả. Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:169. Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:246. Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:247. Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:97. Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:198.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:287. Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:288. Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:289.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập được mã hóa bởi polynucleotit theo phương án trên đây. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vectơ, đặc biệt là vectơ biểu hiện, bao gồm polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án được nêu trong bản mô tả. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit hoặc vectơ theo phương án bất kỳ trong số các phương án được nêu trong bản mô tả.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 và kháng nguyên tế bào đích, bao gồm các bước gồm a) nuôi cấy tế bào vật chủ theo các phương án nêu trên trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng

nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và b) thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được sản xuất theo phương pháp theo phương án trên đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên và chất mang dược dụng. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên hoặc dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên để sử dụng làm thuốc.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên hoặc dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên để sử dụng để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một số phương án, bệnh này là bệnh ung thư. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên để sản xuất thuốc để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ở cá thể, bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của chế phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên ở dạng dược dụng. Theo một số phương án, bệnh nêu trên là bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp cảm ứng sự làm tan tế bào đích, bao gồm bước cho tế bào đích tiếp xúc với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên khi có mặt tế bào T.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất sáng chế như được mô tả trên đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A-I minh họa cấu hình minh họa của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (TCB) theo sáng chế. Tất cả các cấu trúc ngoại trừ mô hình kappa-

lambda trong (Fig.1I) có đột biến P329G LALA và bao gồm mảnh Fc phần phình thành phần lõm với cải biến phần phình thành phần lõm. (Fig.1A) minh họa "FolR1 TCB 2+1 nghịch chuyển (chuỗi nhẹ chung)". Chất gắn kết FolR1 được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc bao gồm cải biến phần phình. Các cấu trúc này không bị cắt và có cùng chuỗi nhẹ VLCL ba lần. (Fig.1B) minh họa "FolR1 TCB 1+1 đầu đến đuôi (chuỗi nhẹ chung)". Các cấu trúc này không bị cắt và có cùng chuỗi nhẹ VLCL hai lần. (Fig.1C) minh họa "FolR1 TCB 1+1 cổ điển (chuỗi nhẹ chung)". Các cấu trúc này không bị cắt và có cùng chuỗi nhẹ VLCL hai lần. (Fig.1D) minh họa "FolR1 TCB 2+1 cổ điển (chuỗi nhẹ chung)". Chất gắn kết CD3 được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc bao gồm cải biến phần phình. Các cấu trúc này không bị cắt và có cùng chuỗi nhẹ VLCL ba lần. (Fig.1E) minh họa "FolR1 TCB 2+1 crossfab cổ điển". Các cấu trúc này bao gồm chuỗi Ck-VH đối với chất gắn kết CD3 thay vì chuỗi CH1-VH thông thường. Chất gắn kết CD3 được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc bao gồm cải biến phần phình. (Fig.1F) minh họa "FolR1 TCB 2+1 crossfab nghịch chuyển". Các cấu trúc này bao gồm chuỗi Ck-VH đối với chất gắn kết CD3 thay vì chuỗi CH1-VH thông thường. Chất gắn kết FolR1 được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc bao gồm cải biến phần phình. (Fig.1G) minh họa "FolR1 TCB 1+1 crossfab đầu đến đuôi". Các cấu trúc này bao gồm chuỗi Ck-VH đối với chất gắn kết CD3 thay vì chuỗi CH1-VH thông thường. (Fig.1H) minh họa "FolR1 TCB 1+1 crossfab cổ điển". Các cấu trúc này bao gồm chuỗi Ck-VH đối với chất gắn kết CD3 thay vì chuỗi CH1-VH thông thường. Fig.1I minh họa mô hình kháng thể CD3/FolR1 kappa-lambda. Các cấu trúc này bao gồm chuỗi nhẹ chung được liên kết VLCH1 và một chuỗi VHCL được liên kết đặc hiệu đối với CD3 và một chuỗi VHCL được liên kết đặc hiệu đối với FolR1.

Fig.2A-C là biểu đồ tóm tắt sự gắn kết của chất gắn kết FoLR1 IgG với tế bào HeLa. Mức gắn kết chất gắn kết FolR1 vừa được tạo ra với FolR1 được biểu hiện trên tế bào HeLa được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Các kháng thể gắn kết được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp kháng người được đánh dấu huỳnh quang.

Fig.3A-B là biểu đồ tóm tắt độ đặc hiệu của chất gắn kết FolR1 đối với FolR1. Việc gắn kết của FolR1 IgG với tế bào HEK được chuyển nhiễm tạm thời bằng FolR1

hoặc FolR2 được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy để nhận biết các dòng vô tính gắn kết đặc hiệu với FolR1 và không gắn kết đặc hiệu với FolR2. Các kháng thể được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp kháng người được đánh dấu huỳnh quang.

Fig.4A-B là biểu đồ tóm tắt độ phản ứng chéo của chất gắn kết FolR1 với cyFoLR1. Độ phản ứng chéo của kháng thể FolR1 với cyno FolR1 được phân tích trên tế bào HEK được chuyển nhiễm tạm thời với cyFolR1 bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Các kháng thể được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp kháng người được đánh dấu huỳnh quang.

Fig.5 thể hiện biểu đồ minh họa sự tiếp nhận của FolR1 TCB sau khi gắn kết. Việc tiếp nhận FolR1 TCB thứ tư sau khi gắn kết với FolR1 được thử nghiệm trên tế bào HeLa. FolR1 TCB còn lại trên bề mặt được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp kháng người được đánh dấu huỳnh quang sau các thời điểm ủ được chỉ định ở nhiệt độ 37°C. Phần trăm tiếp nhận được tính.

Fig.6A-E là biểu đồ tóm tắt khả năng gắn kết của FolR1 IgG với các tế bào có các mức độ biểu hiện FolR1 khác nhau. Việc gắn kết của 9D11, 16D5 và Mov19 IgG với tế bào khối u có các mức độ biểu hiện FolR1 khác nhau được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. DP47 IgG được bao gồm làm đối chứng isotyp và MKN-45 được bao gồm làm dòng tế bào FolR1 âm. Các kháng thể được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp kháng người được đánh dấu huỳnh quang.

Fig.7A-L là biểu đồ tóm tắt việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào HT-29 và tế bào SKOV3. FolR1 TCB được sử dụng để thử nghiệm việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u HT-29 và SKOV3 và việc điều hòa tăng chỉ thị hoạt hóa trên tế bào T khi tiêu diệt. (Fig.7A-D) thể hiện việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào HT-29 và tế bào SKOV3 khi có mặt 9D11 FolR1 TCB và 16D5 FolR1 TCB được đo bằng cách giải phóng LDH sau 24 giờ và 48 giờ. DP47 TCB được bao gồm làm đối chứng âm. Sau 48 giờ ủ, mức điều hòa tăng chỉ thị hoạt hóa CD25 và CD69 trên tế bào T CD8 và tế bào T CD4 khi tiêu diệt tế bào khối u SKOV3 (Fig.7E-H) hoặc HT-29 (Fig.7I-L) được đánh giá bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

Fig.8 thể hiện biểu đồ cho thấy không có sự gắn kết kháng FolR1 với hồng cầu. Hồng cầu được chặn dưới dạng tập hợp CD235a dương và mức gắn kết của 9D11 IgG, 16D5 IgG, Mov19 IgG và DP47 IgG với tập hợp này được xác định bằng kỹ thuật đếm tế

bào theo dòng chảy. Các kháng thể được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp kháng người được đánh dấu huỳnh quang.

Fig.9A-D là biểu đồ tóm tắt việc điều hòa tăng chỉ thị hoạt hóa trong máu nguyên vẹn. Việc điều hòa tăng chỉ thị hoạt hóa CD25 và CD69 của tế bào T CD4 và tế bào T CD8 24 giờ sau khi bổ sung 9D11 FolR1 TCB, 16D5 FolR1 TCB, TCB Mov19 FolR1 và DP47 TCB được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

Fig.10 sự gắn kết của biến thể 9D11 TCB a-glyco với tế bào HeLa. Sự gắn kết của biến thể 9D11 FolR1 TCB a-glyco với tế bào HeLa được so sánh với sự gắn kết của 9D11 TCB gốc trên tế bào HeLa. Các kháng thể được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp kháng người được đánh dấu huỳnh quang và mức độ gắn kết được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

Fig.11A-F là biểu đồ tóm tắt việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T với biến thể 9D11 FolR1 TCB a-glyco của tế bào khối u. Biến thể 9D11 FolR1 TCB a-glyco được sử dụng để thử nghiệm việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u (Fig.11A-D) SKOV3, MKN-45 (làm đối chứng FolR1 âm) và (Fig.11E-F) HT-29 so với việc tiêu diệt bằng 9D11 FolR1 TCB gốc. Dưới dạng số liệu hiển thị, giải phóng LDH sau 24 giờ và 48 giờ được sử dụng.

Fig.12A-X là biểu đồ tóm tắt việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào biểu mô sơ cấp. Tế bào biểu mô sơ cấp có nồng độ FolR1 rất thấp được sử dụng để thử nghiệm việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T với 16D5 FolR1 TCB và 9D11 FolR1 TCB, DP47 TCB được bao gồm làm đối chứng âm và tế bào HT29 được bao gồm làm đối chứng dương. (Fig.12A-H) mức giải phóng LDH của tế bào sắc tố võng mạc người (HRP), vỏ thận người (HRC), phế quản người (HB) và của tế bào HT29 được xác định sau 24 giờ và 48 giờ. Việc điều hòa tăng chỉ thị hoạt hóa CD25 và CD69 trên tế bào T CD4 và tế bào T CD8 khi tiêu diệt (Fig.12I-L) HRP, (Fig.12M-P) HRC, (Fig.12Q-T) HB và (Fig.12 U-X) HT29 được xác định sau 48 giờ bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

Fig.13A-C cho thấy sự so sánh giữa các mô hình TCB khác nhau với 16D5. Bốn mô hình TCB khác nhau chứa chất gắn kết FolR1 16D5 được so sánh trên Fig.13A gắn kết với tế bào HeLa, trên Fig.14 B việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào

SKOV3 sau 24 giờ và 48 giờ và trên Fig.14C việc điều hòa tăng chỉ thị hoạt hóa CD25 và CD69 trên tế bào T CD4 và tế bào T CD8 48 giờ sau khi tiêu diệt.

Fig.14A-C thể hiện sự so sánh giữa các mô hình TCB khác nhau với 9D11. Ba mô hình TCB khác nhau chứa chất gắn kết FolR1 9D11 được so sánh trong A) gắn kết với tế bào HeLa, trong B) việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào SKOV3 sau 24 giờ và 48 giờ và trong C) việc điều hòa tăng chỉ thị hoạt hóa CD25 và CD69 trên tế bào T CD4 và tế bào T CD8 48 giờ sau khi tiêu diệt.

Fig.15 thể hiện profin PK của FolR1 TCB trong chuột nhắt NOG đối với ba liều lượng khác nhau.

Fig.16 minh họa phương pháp thử nghiệm dùng cho nghiên cứu độ hiệu nghiệm với FolR1 TCB.

Fig.17A-B thể hiện đường cong sinh trưởng khối u. (Fig.17A) giá trị trung bình và SEM của thể tích khối u trong các nhóm điều trị khác nhau. (Fig.17B). Sự sinh trưởng khối u ở chuột nhắt đơn lẻ trong tất cả các nhóm điều trị. TGI (ức chế sự sinh trưởng khối u) nếu phần trăm thể tích khối u trung bình so với nhóm chất dẫn.

Fig.18 thể hiện trọng lượng khối u ở cuối nghiên cứu.

Fig.19A-B thể hiện phân tích FACS của tế bào T thâm nhiễm khối u ở ngày nghiên cứu 32. (Fig.19A) huyền phù tế bào một khối u được nhuộm màu bằng kháng CD3/CD4/CD8 người và được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. (Fig.19B) giá trị trung bình và SEM của số tế bào T trong mỗi mg mô khối u trong các nhóm điều trị khác nhau.

Fig.20A-B thể hiện phân tích FACS để hoạt hóa/làm mất hạt tế bào T và tiết xytokin ở ngày nghiên cứu 32. Tế bào T thâm nhiễm khối u dương tính với CD4 (Fig.20A) và dương tính với CD8 (Fig.20B) được nhuộm màu đối với xytokin, chỉ thị hoạt hóa và làm mất hạt. Được biểu hiện là giá trị trung bình và SEM của số tế bào T trong mỗi mg mô khối u trong các nhóm điều trị khác nhau.

Fig.21A-B thể hiện phần trăm làm tan khối u. Tế bào SKOV3 được ủ với PBMC khi có mặt Kappa lambda FolR1 TCB hoặc DP47 TCB. Mức độ tiêu diệt tế bào khối u sau 24 giờ (Fig.21A) và 48 giờ (Fig.21B) được xác định bằng cách đo mức giải phóng LDH.

Fig.22A-D thể hiện việc điều hòa tăng CD25 và CD69 trên tế bào T CD4. Tế bào SKOV3 được ủ với PBMC khi có mặt Kappa lambda FolR1 TCB hoặc DP47 TCB. Sau 48 giờ, mức độ điều hòa tăng CD25 và CD69 trên tế bào T CD4 (Fig.22A-B) và tế bào T CD8 (Fig.22C-D) được đo bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

Fig.23A-B thể hiện phần trăm làm tan khối u. Việc tiêu diệt tế bào T của tế bào SKov-3 (FolR1 trung bình) được cảm ứng bằng 36F2 TCB, Mov19 TCB và 21A5 TCB sau 24 giờ (Fig.23A) và 48 giờ (Fig.23B) ủ (E:T = 10:1, PBMC người của tác nhân tác động).

Fig.24A-C thể hiện việc tiêu diệt tế bào T được cảm ứng bằng 36F2 TCB, 16D5 TCB, 16D5 TCB cổ điển, 16D5 TCB 1+1 và 16D5 TCB HT của tế bào khối u người Hela (FolR1 cao) (Fig.24A), Skov-3 (FolR1 trung bình) (Fig.24B) và HT-29 (FolR1 thấp) (Fig.24C) (E:T = 10:1, PBMC người của tác nhân tác động, thời gian ủ 24 giờ). DP47 TCB được bao gồm làm đối chứng không gắn kết.

Fig.25A-C thể hiện sự điều hòa tăng của CD25 và CD69 trên tế bào T CD8+ (Fig.25A, B) và dương tính với CD4 (Fig.25C) người sau khi tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào HeLa (FolR1 cao) (Fig.25A), tế bào SKov-3 (FolR1 trung bình) (Fig.25B) và tế bào HT-29 (FolR1 thấp) (Fig.25C) (E:T = 10:1, 48 giờ ủ) được cảm ứng bằng 36F2 TCB, 16D5 TCB và DP47 TCB (đối chứng không gắn kết).

Fig.26A-F thể hiện việc tiêu diệt tế bào T được cảm ứng bằng 36F2 TCB, 16D5 TCB và DP47 TCB của tế bào biểu mô vỏ thận người (Fig.26A, B), tế bào biểu mô sắc tố võng mạc người (Fig.26C, D) và tế bào HT-29 (Fig.26E, F) sau 24 giờ (Fig.26A, C, E) và 48 giờ (Fig.26B, D, F) ủ (E:T = 10:1, PBMC người của tác nhân tác động).

Fig.27 thể hiện bảng tóm tắt việc định lượng vị trí gắn kết FolR1 trên các dòng tế bào bình thường và dòng tế bào ung thư khác nhau.

Fig.28A-B thể hiện sự gắn kết của 16D5 TCB và biến thể khử amit CD3 16D5 TCB N100A và 16D5 TCB S100aA và 9D11 TCB tương ứng của nó và biến thể khử amit 9D11 TCB N100A và 9D11 TCB S100aA của nó với CD3 ở người được biểu hiện trên tế bào Jurkat.

Fig.29A-B thể hiện việc tiêu diệt tế bào T của tế bào khối u người SKov-3 (FolR1 trung bình) được cảm ứng bằng 16D5 TCB và biến thể khử amit CD3 16D5 TCB N100A

và 16D5 TCB S100aA (Fig.29A) và 9D11 TCB tương ứng của nó và biến thể khử amit 9D11 TCB N100A và 9D11 TCB S100aA (Fig.29B) của nó (E:T = 10:1, PBMC người của tác nhân tác động, thời gian ủ 24 giờ). DP47 TCB được bao gồm làm đối chứng không gắn kết.

Fig.30A-B thể hiện việc tiêu diệt tế bào T của tế bào khối u người HT-29 (FolR1 thấp) được cảm ứng bằng 16D5 TCB và biến thể khử amit CD3 16D5 TCB N100A và 16D5 TCB S100aA (Fig.30A) và 9D11 TCB tương ứng của nó và biến thể khử amit 9D11 TCB N100A và 9D11 TCB S100aA (Fig.30B) của nó (E:T = 10:1, PBMC người của tác nhân tác động, thời gian ủ 24 giờ). DP47 TCB được bao gồm làm đối chứng không gắn kết.

Fig.31A-C thể hiện cường độ huỳnh quang trung bình và làm tan tế bào khối u.

Fig.32A-E thể hiện sự gắn kết của biến thể 36F2 TCB, 16D5 TCB và 16D5 HC/LC với FolR1 ở người được biểu hiện trên tế bào HeLa.

Fig.33 thể hiện sự gắn kết của 36F2 TCB, 16D5 TCB và hai biến thể được làm giảm ái lực 16D5 16D5 W96Y/D52E TCB và 16D5 G49S/S93A TCB với FolR1 ở người trên tế bào HeLa.

Fig.34A-E thể hiện sự gắn kết của biến thể 36F2 TCB, 16D5 TCB và 16D5 HC/LC với FolR1 ở người được biểu hiện trên tế bào HT-29.

Fig.35A-D thể hiện sự gắn kết của chất gắn kết FolR1 trung bình (6E10 TCB, 14B1 TCB và 9C7 TCB), 16D5 TCB và 36F2 TCB với tế bào HEK293T biểu hiện FolR1 hoặc FolR2 ở người hoặc chuột nhắt.

Fig.36A-F thể hiện việc tiêu diệt tế bào T của tế bào khối u người Hela (biểu hiện FolR1 cao), SKov-3 (biểu hiện FolR1 trung bình) và HT-29 (biểu hiện FolR1 thấp) được cảm ứng bằng chất gắn kết FolR1 trung bình (6E10 TCB, 14B1 TCB và 9C7 TCB), 16D5 TCB và 36F2 TCB sau 24 giờ (A-C) và 48 giờ (D-F) ủ. PBMC người được sử dụng làm tế bào tác động (E:T = 10:1).

Fig.37A-F thể hiện việc tiêu diệt tế bào T của tế bào khối u người Hela (biểu hiện FolR1 cao), SKov-3 (biểu hiện FolR1 trung bình) và HT-29 (biểu hiện FolR1 thấp) được cảm ứng bằng biến thể 16D5 được giảm ái lực (16D5-G49S/S93A TCB, 16D5-G49S/K53A TCB, 16D5 W96Y TCB, 16D5 W96Y/D52E TCB), 16D5 TCB và 36F2

TCB sau 24 giờ (Fig.38A-C) và 48 giờ (Fig.38D-F) ủ. PBMC người được sử dụng làm tế bào tác động (E:T = 10:1).

Fig.38A-F thể hiện việc tiêu diệt tế bào T của tế bào người sơ cấp từ biểu mô sắc tố võng mạc và biểu mô vỏ thận được cảm ứng bằng biến thể 16D5 được giảm ái lực (16D5-G49S/S93A TCB, 16D5 W96Y/D52E TCB), 16D5 TCB, 36F2 TCB và chất gắn kết FolR1 trung bình 14B1 TCB được đánh giá sau 24 giờ (Fig.39A-C) và 48 giờ (Fig.39D-F) ủ (E:T = 10:1, PBMC người của tác nhân tác động). Tế bào HT-29 (biểu hiện FolR1 thấp) được bao gồm làm dòng tế bào đối chứng và DP47 TCB được dùng làm đối chứng không gắn kết.

Fig.39A-B thể hiện liều đơn PK của cấu trúc FolR1 TCB ở chuột nhắt cái NOG.

Fig.40A-G thể hiện hiệu lực in vivo của cấu trúc FolR1 TCB (16D5, 16D5 G49S/S93A và 16D5 W96Y/D52E) sau khi truyền PBMC người trong chuột nhắt NOG mang Hela.

Fig.41 cho thấy Farletuzumab (xanh đậm, thứ hai từ phía trên) và Mov19 (xám, phía trên) có thể gắn kết trên huFolR1 được bắt giữ trên 16D5, điều này thể hiện rằng chất gắn kết hàng loạt 16D5 nhận diện epitop khác với epitop được nhận diện bởi Farletuzumab hoặc Mov19.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả như thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, trừ khi được định nghĩa khác đi sau đây.

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

Thuật ngữ “đặc hiệu kép” có nghĩa là phân tử gắn kết kháng nguyên có thể gắn kết đặc hiệu với ít nhất hai thể quyết định kháng nguyên riêng biệt. Thông thường, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm ít nhất hai vị trí gắn kết kháng nguyên, mỗi vị trí đặc hiệu đối với thể quyết định kháng nguyên khác nhau. Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép có khả năng gắn kết đồng thời hai thể quyết

định kháng nguyên, đặc biệt là hai thể quyết định kháng nguyên được biểu hiện trên hai tế bào riêng biệt.

Thuật ngữ "hóa trị" như được sử dụng trong bản mô tả chỉ sự có mặt của vị trí gắn kết kháng nguyên với số lượng cụ thể trong phân tử gắn kết kháng nguyên. Như vậy, thuật ngữ "gắn kết hóa trị một với kháng nguyên" chỉ sự có mặt của một (và không nhiều hơn một) vị trí gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với kháng nguyên trong phân tử gắn kết kháng nguyên.

"Vị trí gắn kết kháng nguyên" dùng để chỉ vị trí, tức là một hoặc nhiều gốc axit amin, của phân tử gắn kết kháng nguyên mà tạo ra tương tác với kháng nguyên. Ví dụ, vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể bao gồm gốc axit amin từ vùng quyết định thể bổ sung (CDR). Phân tử globulin miễn dịch tự nhiên thường có hai vị trí gắn kết kháng nguyên, phân tử Fab thường có một vị trí gắn kết kháng nguyên.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "gốc gắn kết kháng nguyên" dùng để chỉ phân tử polypeptit gắn kết đặc hiệu với thể quyết định kháng nguyên. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên có thể định hướng toàn bộ phần mà nó được gắn (ví dụ, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai) vào vị trí đích, ví dụ, vào kiểu cụ thể của tế bào khối u hoặc mô đệm khối u mang thể quyết định kháng nguyên. Theo một phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên có thể hoạt hóa việc truyền tín hiệu thông qua kháng nguyên đích của nó, ví dụ, kháng nguyên phức thụ thể tế bào T. Gốc gắn kết kháng nguyên bao gồm kháng thể và các mảnh của nó như được định nghĩa thêm trong bản mô tả. Các gốc gắn kết kháng nguyên cụ thể bao gồm miền gắn kết kháng nguyên của kháng thể, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo một số phương án, gốc gắn kết kháng nguyên có thể bao gồm vùng hằng định kháng thể như được định nghĩa thêm trong bản mô tả và đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vùng hằng định chuỗi nặng hữu ích bao gồm isotyp bất kỳ trong số năm isotyp: α, δ, ε, γ, hoặc μ. Các vùng hằng định chuỗi nhẹ hữu ích bao gồm isotyp bất kỳ trong số hai isotyp: κ và λ.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "thể quyết định kháng nguyên" đồng nghĩa với "kháng nguyên" và "epitop," và dùng để chỉ vị trí (ví dụ, kéo dài các axit amin liền kề hoặc cấu hình hình dạng tạo các vùng khác nhau chứa các axit amin liền kề) trên đại phân tử polypeptit mà gốc gắn kết kháng nguyên gắn kết với, tạo ra phức hợp

gốc gắn kết kháng nguyên-kháng nguyên. Các thể quyết định kháng nguyên hữu ích có thể được tìm thấy, ví dụ, trên bề mặt của tế bào khối u, trên bề mặt của tế bào nhiễm virut, trên bề mặt của các tế bào nhiễm bệnh khác, trên bề mặt của tế bào miễn dịch, tự do trong huyết thanh máu, và/hoặc trong cơ chất ngoại bào (ECM). Protein được đề cập đến là kháng nguyên trong bản mô tả, ví dụ, FolR1 và CD3, có thể là dạng tự nhiên bất kỳ của protein từ nguồn có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, người) và loài 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 người. Khi tham khảo protein đặc hiệu trong bản mô tả, thuật ngữ này bao gồm protein "độ dài đầy đủ", chưa được xử lý cũng như dạng bất kỳ của protein thu được trong quá trình xử lý trong tế bào. Thuật ngữ này còn bao gồm các biến thể có trong tự nhiên của protein, ví dụ, biến thể ghép hoặc biến thể alen. Protein người minh họa hữu ích làm kháng nguyên bao gồm, nhưng không giới hạn ở: FolR1 (thụ thể folat alpha (FRA); Protein gắn kết folat (FBP); FolR1 ở người UniProt số: P15328; FolR1 ở chuột UniProt số: P35846; FolR1 ở khỉ đầu chó UniProt số: G7PR14) và CD3, đặc biệt là cấu trúc siêu phân tử epsilon của CD3 (xem UniProt số P07766 (phiên bản 130), NCBI RefSeq số NP_000724.1, SEQ ID NO:150 đối với trình tự người; hoặc UniProt số Q95LI5 (phiên bản 49), NCBI ngân hàng gen số BAB71849.1, đối với trình tự đầu chó [Macaca fascicularis]). Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế gắn kết với epitop của CD3 hoặc kháng nguyên tế bào đích được bảo toàn giữa CD3 hoặc kháng nguyên đích khỏi các loài khác. Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế gắn kết với CD3 và FolR1, nhưng không gắn kết với FolR2 (thụ thể folat beta; FRB; FolR2 ở người UniProt số: P14207) hoặc FolR3 (thụ thể folat gamma; FolR3 ở người UniProt số: P41439).

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" có nghĩa là sự gắn kết có chọn lọc đối với kháng nguyên và có thể được phân biệt với các tương tác không mong muốn hoặc không đặc hiệu. Khả năng của gốc gắn kết kháng nguyên trong việc gắn kết với thể quyết định kháng nguyên đặc hiệu có thể được đo thông qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (được phân tích trên thiết bị BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), và các thử nghiệm gắn kết truyền thống (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Theo một

phương án, mức độ gắn kết của gốc gắn kết kháng nguyên với protein không liên quan thấp hơn khoảng 10% mức độ gắn kết của gốc gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên như được đo, ví dụ, bằng SPR. Theo một số phương án, gốc gắn kết kháng nguyên gắn kết với kháng nguyên, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên này, có hằng số phân ly (K_D) là ≤ 1μM, ≤ 100nM, ≤ 10nM, ≤ 1nM, ≤ 0,1nM, ≤ 0,01nM, hoặc ≤ 0,001nM (ví dụ 10^{-8}M hoặc nhỏ hơn, ví dụ, nằm trong khoảng từ 10^{-8}M đến 10^{-13}M, ví dụ, nằm trong khoảng từ 10^{-9}M đến 10^{-13}M).

"Ái lực" dùng để chỉ độ bền của tổng cộng các tương tác không đồng hóa trị giữa vị trí gắn kết đơn lẻ của phân tử (ví dụ, thụ thể) và vị trí gắn kết kèm theo của nó (ví dụ, phối tử). Trừ khi có quy định khác, như được sử dụng trong bản mô tả, "ái lực gắn kết" dùng để chỉ ái lực gắn kết nội tại phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành phần của cặp gắn kết (ví dụ, gốc gắn kết kháng nguyên và kháng nguyên, hoặc thụ thể và phối tử của nó). Ái lực của phân tử X đối với phân tử đi kèm Y của nó thường có thể được tượng trưng bởi hằng số phân ly (K_D), là tỷ lệ giữa hằng số tốc độ phân ly và hằng số tốc độ kết hợp (k_{off} và k_{on}, một cách tương ứng). 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 này vẫn giống nhau. Ái lực có thể được đo bằng các phương pháp đã được thiết lập tốt đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các phương pháp được mô tả ở đây. Phương pháp cụ thể để đo ái lực là cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

"Gắn kết giảm đi", ví dụ, gắn kết với thụ thể Fc giảm đi, dùng để chỉ sự giảm ái lực đối với tương tác tương ứng, như được đo bằng, ví dụ, SPR. Để rõ ràng, thuật ngữ này còn bao gồm sự giảm ái lực đến không (hoặc dưới giới hạn phát hiện của phương pháp phân tích), tức là loại bỏ hoàn toàn tương tác này. Ngược lại, "gắn kết tăng lên" dùng để chỉ sự tăng ái lực gắn kết đối với tương tác tương ứng.

"Hoạt hóa tế bào T" như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ một hoặc nhiều đáp ứng tế bào của tế bào lympho T, đặc biệt là tế bào lympho T gây độc tế bào, được chọn từ: sự tăng sinh, sự biệt hóa, tiết xytokin, giải phóng phân tử tác động độc hại tế bào, hoạt tính độc hại tế bào, và sự biểu hiện các chỉ thị hoạt hóa. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có khả năng cảm ứng sự hoạt hóa tế bào T. Các thử nghiệm thích hợp để đo mức hoạt hóa tế bào T là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này được mô tả ở đây.

"Kháng nguyên tế bào đích" như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ thể quyết định kháng nguyên có trên bề mặt của tế bào đích, ví dụ, tế bào trong khối u như tế bào ung thư hoặc tế bào của mô đệm khối u. Đặc biệt là, "kháng nguyên tế bào đích" dùng để chỉ thụ thể folat 1.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "thứ nhất" và "thứ hai" đối với gốc gắn kết kháng nguyên v.v., được sử dụng để thuận tiện cho việc phân biệt khi có nhiều hơn một trong từng kiểu gốc. Việc sử dụng các thuật ngữ này không dự định tạo thứ tự hoặc hướng cụ thể của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trừ khi rõ ràng được chỉ ra như vậy.

"Phân tử Fab" dùng để chỉ protein gồm có miền VH và CH1 của chuỗi nặng ("chuỗi nặng Fab") và miền VL và CL của chuỗi nhẹ ("chuỗi nhẹ Fab") của globulin miễn dịch.

Thuật ngữ "phân tử Fab có chuỗi nhẹ VLCL giống nhau" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ chất gắn kết có chung một chuỗi nhẹ nhưng vẫn có các độ đặc hiệu riêng rẽ, ví dụ, có thể gắn kết CD3 hoặc FolR1. Theo một số phương án, phân tử đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm ít nhất hai phân tử Fab có chuỗi nhẹ VLCL giống nhau. Chuỗi nặng tương ứng được tổ chức lại và tạo sự gắn kết đặc hiệu với CD3 của kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và FolR1 của kháng nguyên tế bào đích, một cách tương ứng.

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

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "chuỗi đơn" dùng để chỉ phân tử bao gồm các monome axit amin được liên kết thẳng hàng bởi liên kết peptit. Theo một số phương án, một trong số các gốc gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab chuỗi đơn, tức là phân tử Fab trong đó chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được nối bằng chất liên kết peptit để tạo ra chuỗi peptit đơn lẻ. Theo một phương án cụ thể như vậy, đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ Fab được nối với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab trong phân tử Fab chuỗi đơn.

Thuật ngữ phân tử Fab "cắt chéo" (còn được gọi là "Crossfab") có nghĩa là phân tử Fab trong đó vùng biến đổi hoặc vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab

được hoán vị, tức là phân tử Fab lai chéo bao gồm chuỗi peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nặng, và chuỗi peptit gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Để rõ ràng, trong phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị, chuỗi peptit bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng được đề cập trong bản mô tả là "chuỗi nặng" của phân tử Fab lai chéo. Ngược lại, trong phân tử Fab lai chéo trong đó vùng hằng định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị, chuỗi peptit bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được đề cập trong bản mô tả là "chuỗi nặng" của phân tử Fab lai chéo. Kháng thể bao gồm một hoặc nhiều CrossFab được đề cập trong bản mô tả là "CrossMab."

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

Thuật ngữ "phân tử globulin miễn dịch" dùng để chỉ protein có cấu trúc của kháng thể có trong tự nhiên. Ví dụ, globulin miễn dịch của lớp IgG là glycoprotein heterotetrame bằng khoảng 150000 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 vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, sau đó là ba miền hằng định (CH1, CH2, và CH3), còn được gọi là vùng hằng định chuỗi nặng. Tương tự, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, sau đó là miền nhẹ (CL) hằng định, còn được gọi là vùng hằng định chuỗi nhẹ. Chuỗi nặng của globulin miễn dịch có thể được quy định vào một trong năm kiểu, gọi là α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG), hoặc μ (IgM), một số kiểu còn có thể được chia thành các kiểu phụ, ví dụ, γ_1 (IgG_1), γ_2 (IgG_2), γ_3 (IgG_3), γ_4 (IgG_4), α_1 (IgA_1) và α_2 (IgA_2). Chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có thể được quy định vào một trong hai kiểu, gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của miền hằng định của nó. Globulin miễn dịch chủ yếu gồm có hai phân tử Fab và miền Fc, được liên kết thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch.

Thuật ngữ "kháng thể" ở đây được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể miễn là chúng biểu hiện hoạt tính gắn kết kháng nguyên mong muốn.

"Mảnh kháng thể" dùng để chỉ phân tử khác với kháng thể nguyên vẹn bao gồm một phần kháng thể nguyên vẹn gắn kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn gắn kết với. Các ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm nhưng không giới hạn ở Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, kháng thể thể đôi, kháng thể thẳng, phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ scFv), và kháng thể miền đơn. Để có nhận xét về một số mảnh kháng thể, xem Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Để có nhận xét về mảnh scFv, xem ví dụ Plückthun, trong tài liệu: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, các trang 269-315 (1994); xem cả trong WO 93/16185; và Patent Mỹ số 5,571,894 và 5,587,458. Để mô tả về mảnh Fab và $F(ab')_2$ bao gồm thụ thể hỗ trợ gắn kết gốc epitop và có thời gian bán hủy in vivo gia tăng, xem patent Mỹ số 5,869,046. Kháng thể thể đôi là mảnh kháng thể có hai vị trí gắn kết kháng nguyên mà có thể có hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép. Xem, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); và Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Kháng thể thể ba và kháng thể thể bốn cũng được mô tả trong Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Kháng thể miền đơn là mảnh kháng thể bao gồm tất cả hoặc một phần miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn ở người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem ví dụ patent Mỹ số 6,248,516 B1). Mảnh kháng thể có thể được tạo ra nhờ các kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở kỹ thuật tiêu hủy protein phân giải của kháng thể nguyên vẹn cũng như sản sinh bằng tế bào vật chủ tái tổ hợp (ví dụ E. coli hoặc thể thực khuẩn), như được mô tả ở đây.

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

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" dùng để chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ kháng thể liên quan đến việc gắn kết kháng thể với kháng nguyên. Miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (lần lượt là VH và VL) của kháng thể tự nhiên thường có các cấu trúc tương tự, với mỗi miền bao gồm bốn vùng khung làm việc (FR) được bảo toàn và ba vùng siêu biến (HVR). Xem, ví dụ, Kindt et al., Kuby Immunology,

6th ed., W.H. Freeman and Co., trang 91 (2007). Miền VH hoặc VL đơn có thể là đủ để tạo ra độ đặc hiệu gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "HVR", như được sử dụng trong bản mô tả, dùng để chỉ mỗi vùng của miền biến đổi của kháng thể mà siêu biến về trình tự và/hoặc tạo ra vòng được xác định về mặt cấu trúc ("vòng siêu biến"). Thông thường, kháng thể bốn chuỗi tự nhiên bao gồm sáu HVR; ba trong VH (H1, H2, H3), và ba trong VL (L1, L2, L3). HVR thường bao gồm các gốc axit amin từ vòng siêu biến và/hoặc từ vùng quyết định thể bổ sung (CDR), vùng quyết định thể bổ sung có độ biến đổi trình tự cao nhất và/hoặc liên quan đến sự nhận diện kháng nguyên. Ngoại trừ CDR1 trong VH, các CDR thường bao gồm các gốc axit amin tạo ra vòng siêu biến. Vùng siêu biến (HVR) cũng được gọi là "vùng quyết định thể bổ sung" (CDR), và các thuật ngữ này được sử dụng ở đây thay thế cho nhau để viện dẫn các phần của vùng biến đổi mà tạo ra vùng gắn kết kháng nguyên. Vùng cụ thể này được mô tả trong Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) và trong Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987), ở đó các định nghĩa bao gồm việc chồng lấp hoặc tập hợp con của các gốc axit amin khi so với nhau. Tuy nhiên, việc áp dụng định nghĩa để chỉ CDR của kháng thể hoặc các biến thể của nó được dự định nằm trong phạm vi của thuật ngữ như được định nghĩa và được sử dụng trong bản mô tả. Gốc axit amin thích hợp mà bao gồm các CDR như được định nghĩa bởi mỗi tài liệu tham khảo được trích dẫn trên đây được nêu dưới đây trong Bảng A để so sánh. Số lượng gốc chính xác bao gồm CDR cụ thể sẽ thay đổi phụ thuộc vào trình tự và kích cỡ của CDR. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định theo cách thông thường là gốc nào bao gồm CDR cụ thể tạo vùng biến đổi trình tự axit amin của kháng thể.

Bảng A. Định nghĩa[1] CDR

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] việc đánh số của tất cả các định nghĩa CDR trong Bảng A là theo quy ước đánh số nêu bởi Kabat et al. (xem dưới đây).

[2] "AbM" có chữ in thường "b" như được sử dụng trong Bảng A dùng để chỉ các CDR như được định nghĩa bởi phần mềm xây dựng kháng thể "AbM" của Oxford Molecular.

Kabat et al. cũng định nghĩa hệ đánh số cho trình tự vùng biến đổi áp dụng được vào kháng thể bất kỳ. Một người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể quy định một cách rõ ràng hệ "đánh số theo Kabat" này cho trình tự vùng biến đổi bất kỳ, không dựa vào số liệu thử nghiệm bất kỳ ngoài bản thân trình tự đó. Như được sử dụng trong bản mô tả, "đánh số theo Kabat" dùng để chỉ hệ đánh số nêu trong Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Trừ khi có quy định khác, tham khảo việc đánh số các vị trí gốc axit amin cụ thể trong vùng biến đổi của kháng thể là theo hệ đánh số theo Kabat.

Trình tự polypeptit của danh mục trình tự không được đánh số theo hệ đánh số theo Kabat. Tuy nhiên, biến đổi việc đánh số các trình tự của danh mục trình tự thành đánh số theo Kabat cũng thuộc kiến thức thông thường của người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

"Khung làm việc" hoặc "FR" dùng để chỉ gốc miền biến đổi khác với gốc vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi thường gồm có bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Do đó, trình tự HVR và FR thường xuất hiện trong trình tự sau trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

"Lớp" kháng thể hoặc globulin miễn dịch dùng để chỉ kiểu miền hằng định hoặc vùng hằng định mà chuỗi nặng của nó có. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài lớp trong số này còn có thể được chia nhỏ thành các lớp con (isotyp), ví dụ, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, và IgA_2. Miền hằng định chuỗi nặng tương ứng với các lớp khác nhau của globulin miễn dịch được gọi là α, δ, ε, γ, và μ, một cách tương ứng.

Thuật ngữ "miền Fc" hoặc "vùng Fc" được sử dụng trong bản mô tả để định nghĩa vùng đầu tận cùng C của chuỗi nặng của globulin miễn dịch chứa ít nhất một phần vùng hằng định. Thuật ngữ này bao gồm vùng Fc trình tự tự nhiên và vùng Fc biến thể. Mặc dù giới hạn của vùng Fc của chuỗi nặng IgG có thể thay đổi nhẹ, vùng Fc chuỗi nặng IgG ở

người thường được định nghĩa là kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận cùng C (Lys447) của vùng Fc có thể có mặt hoặc không có mặt. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả, việc đánh số gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định là theo hệ đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. "Cấu trúc siêu phân tử" của miền Fc như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ một trong hai polypeptit tạo miền Fc dime, tức là polypeptit bao gồm vùng hằng định đầu tận cùng C của chuỗi nặng của globulin miễn dịch, có khả năng tự kết hợp ổn định. Ví dụ, cấu trúc siêu phân tử của miền Fc của IgG bao gồm miền hằng định IgG CH2 và IgG CH3.

"Cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc" là thao tác thủ công của mạch chính peptit hoặc cải biến sau dịch mã của cấu trúc siêu phân tử của miền Fc mà làm giảm hoặc ngăn chặn sự kết hợp của polypeptit bao gồm cấu trúc siêu phân tử của miền Fc với polypeptit giống nhau để tạo ra homodime. Cải biến thúc đẩy sự kết hợp như được sử dụng trong bản mô tả cụ thể bao gồm các cải biến riêng rẽ được thực hiện cho mỗi một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc được mong muốn kết hợp (tức là cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc), trong đó các cải biến là thể bổ sung cho nhau để thúc đẩy sự kết hợp của hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Ví dụ, cải biến thúc đẩy sự kết hợp có thể làm thay đổi cấu trúc hoặc điện tích của một hoặc cả hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc để tạo thuận lợi cho sự kết hợp trong không gian hoặc tĩnh điện, một cách tương ứng. Do đó, việc (hetero)dime hóa xảy ra giữa polypeptit bao gồm cấu trúc siêu phân tử của miền Fc thứ nhất và polypeptit bao gồm cấu trúc siêu phân tử của miền Fc thứ hai, mà có thể không giống nhau theo nghĩa mà các thành phần khác được dung hợp với mỗi cấu trúc siêu phân tử (ví dụ gốc gắn kết kháng nguyên) là không giống nhau. Theo một số phương án, cải biến thúc đẩy sự kết hợp bao gồm đột biến axit amin trong miền Fc, cụ thể là biến thể thay thế axit amin. Theo một phương án cụ thể, cải biến thúc đẩy sự kết hợp bao gồm đột biến axit amin riêng rẽ, cụ thể là biến thể thay thế axit amin, trong mỗi một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc.

Thuật ngữ "chức năng tác động" dùng để chỉ các hoạt tính sinh học có thể quy cho vùng Fc của kháng thể, thay đổi với isotyp của kháng thể. Các ví dụ về chức năng tác

động của kháng thể bao gồm: gắn kết C1q và độ độc hại tế bào phụ thuộc vào thể bổ sung (CDC), gắn kết thụ thể Fc, độ độc hại tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), thực bào ở tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP), tiết xytokin, hấp thụ kháng nguyên qua trung gian phức miễn dịch bởi tế bào trình diện kháng nguyên, điều hòa giảm thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B), và hoạt hóa tế bào B.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "xử lý kỹ thuật, được xử lý kỹ thuật, việc thiết kế kỹ thuật", được coi là bao gồm thao tác thủ công bất kỳ của mạch chính peptit hoặc cải biến sau dịch mã của polypeptit có trong tự nhiên hoặc tái tổ hợp hoặc mảnh của nó. Việc xử lý kỹ thuật bao gồm cải biến của trình tự axit amin, của mô hình glycosyl hóa, hoặc của nhóm chuỗi bên của các axit amin riêng lẻ, cũng như tổ hợp của các phương pháp này.

Thuật ngữ "đột biến axit amin" như được sử dụng trong bản mô tả có nghĩa là bao gồm biến thể thay thế, làm khuyết, xen vào axit amin và các cải biến axit amin. Tổ hợp bất kỳ của biến thể thay thế, làm khuyết, xen vào, và cải biến có thể được tạo ra để có được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện cấu trúc cuối cùng có các đặc tính mong muốn, ví dụ, gắn kết với thụ thể Fc giảm, hoặc kết hợp với peptit khác tăng. Biến thể làm khuyết và xen vào trình tự axit amin bao gồm làm khuyết và xen vào ở đầu tận cùng amin và/hoặc carboxy của axit amin. Đột biến axit amin cụ thể là biến thể thay thế axit amin. Nhằm mục đích làm thay đổi, ví dụ, đặc tính gắn kết của vùng Fc, biến thể thay thế axit amin không bảo toàn, tức là thay thế một axit amin bằng một axit amin khác có tính chất cấu trúc và/hoặc tính chất hóa học khác nhau, được ưu tiên đặc biệt. Biến thể thay thế axit amin bao gồm thay thế bằng axit amin không có trong tự nhiên hoặc bằng dẫn xuất axit amin có trong tự nhiên của hai mươi axit amin tiêu chuẩn (ví dụ 4-hydroxyprolin, 3-metylhistidin, ornithin, homoserin, 5-hydroxylysin). Đột biến axit amin có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp di truyền hoặc phương pháp hóa học đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp di truyền có thể bao gồm đột biến định hướng điểm, PCR, tổng hợp gen và phương pháp tương tự. Được dự định là phương pháp làm thay đổi nhóm chuỗi bên của axit amin bằng phương pháp khác với thiết kế di truyền, như cải biến hóa học, cũng có thể hữu ích. Các chỉ định khác nhau có thể được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cùng một đột biến axit amin. Ví dụ, biến thể thay thế từ prolin ở vị trí 329 của miền Fc thành glyxin có thể được chỉ ra là 329G, G329, G_{329}, P329G, hoặc Pro329Gly.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "polypeptit" dùng để chỉ phân tử gồm có monome (axit amin) được liên kết thẳng hàng bởi liên kết amit (còn được biết đến là liên kết peptit). Thuật ngữ "polypeptit" dùng để chỉ chuỗi bất kỳ gồm hai hoặc nhiều axit amin, và không dùng để chỉ độ dài cụ thể của sản phẩm. Do đó, peptit, dipeptit, tripeptit, oligopeptit, "protein," "chuỗi axit amin," hoặc thuật ngữ bất kỳ khác được sử dụng để chỉ chuỗi gồm hai hoặc nhiều axit amin, được bao gồm trong định nghĩa về "polypeptit," và thuật ngữ "polypeptit" có thể được sử dụng thay vì, hoặc thay thế cho thuật ngữ bất kỳ trong số các các thuật ngữ này. Thuật ngữ "polypeptit" cũng được dự định dùng để chỉ sản phẩm của cải biến sau biểu hiện của polypeptit, bao gồm nhưng không giới hạn ở glycosyl hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, amit hóa, dẫn xuất hóa bằng nhóm bảo vệ/nhóm phong bế đã biết, phân tách protein phân giải, hoặc cải biến bằng axit amin không có trong tự nhiên. Polypeptit có thể thu được từ nguồn sinh học tự nhiên hoặc được tạo ra bằng công nghệ tái tổ hợp, nhưng không cần thiết được dịch mã từ trình tự axit nucleic được chỉ định. Nó có thể được tạo ra theo cách bất kỳ, bao gồm bằng cách tổng hợp hóa học. Polypeptit theo sáng chế có thể có kích cỡ bằng khoảng 3 axit amin hoặc nhiều hơn, 5 axit amin hoặc nhiều hơn, 10 axit amin hoặc nhiều hơn, 20 axit amin hoặc nhiều hơn, 25 axit amin hoặc nhiều hơn, 50 axit amin hoặc nhiều hơn, 75 axit amin hoặc nhiều hơn, 100 axit amin hoặc nhiều hơn, 200 axit amin hoặc nhiều hơn, 500 axit amin hoặc nhiều hơn, 1000 axit amin hoặc nhiều hơn, hoặc 2000 axit amin hoặc nhiều hơn. Polypeptit có thể có cấu trúc ba chiều được xác định, mặc dù chúng không cần thiết phải có cấu trúc như vậy. Polypeptit có cấu trúc ba chiều được xác định được đề cập đến là được gập, và polypeptit không có cấu trúc ba chiều được xác định, thay vào đó có thể chấp nhận một số lượng lớn các hình dạng khác nhau, và được đề cập đến là không được gập.

Thuật ngữ polypeptit "được phân lập" hoặc biến thể, hoặc dẫn xuất của nó được dự định là polypeptit không ở trong môi trường tự nhiên của nó. Không yêu cầu mức độ tinh chế đặc biệt. Ví dụ, polypeptit được phân lập có thể được loại bỏ từ môi trường tự nhiên hoặc thiên nhiên của nó. Polypeptit và protein được sản xuất theo phương pháp tái tổ hợp được biểu hiện trong tế bào vật chủ được coi là được phân lập đối với mục đích theo sáng chế, như polypeptit tự nhiên hoặc tái tổ hợp đã được phân lập, cất phân đoạn, hoặc tinh chế một phần hoặc hầu hết bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ.

"Phần trăm (%) đồng nhất trình tự axit amin" đối với trình tự polypeptit đối chiếu được định nghĩa là phần trăm gốc axit amin trong trình tự ứng viên giống với gốc axit amin trong trình tự polypeptit đối chiếu, sau khi sắp xếp trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần, để đạt được phần trăm đồng nhất trình tự tối đa, và không coi thay thế bảo toàn bất kỳ là một phần của độ đồng nhất trình tự. Việc sắp xếp nhằm mục đích xác định phần trăm đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được theo các cách khác nhau thuộc kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính có bán trên thị trường như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các thông số thích hợp để sắp xếp trình tự, bao gồm giải thuật bất kỳ cần để đạt được sự sắp xếp tối đa so với độ dài đầy đủ của trình tự được so sánh. Tuy nhiên, đối với các mục đích ở đây, các giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được viết bởi Genentech, Inc., và mã nguồn được nộp với tư liệu sử dụng trong Cục bản quyền Mỹ, Washington D.C., 20559, nơi nó được đăng ký dưới số đăng ký bản quyền Mỹ TXU510087. Chương trình ALIGN-2 có thể mua được của Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được dịch từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 nên được dịch để sử dụng trên hệ vận hành UNIX, bao gồm UNIX số V4.0D. Tất cả các thông số so sánh trình tự được thiết lập bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi. Trong trường hợp ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, % đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin A đã nêu đối với, với, hoặc dựa trên trình tự axit amin B đã nêu (mà theo một cách khác có thể được viết là trình tự axit amin A đã nêu có hoặc bao gồm % đồng nhất trình tự axit amin nhất định đối với, với, hoặc dựa trên trình tự axit amin B) đã nêu được tính như sau:

100 lần phần X/Y

trong đó X là số lượng gốc axit amin được ghi điểm là ghép cặp giống nhau bởi chương trình sắp xếp trình tự ALIGN-2 trong quá trình bố trí A và B của chương trình này, và trong đó Y là tổng số gốc axit amin trong B. Sẽ hiểu được rằng khi độ dài của trình tự axit amin A không bằng với độ dài trình tự axit amin B, % đồng nhất trình tự axit amin của A với B không bằng với % đồng nhất trình tự axit amin của B với A. Trừ khi có quy định cụ thể khác, tất cả các giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng trong bản

mô tả thu được như được mô tả trong đoạn nêu ngay trên đây bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ "polynucleotit" dùng để chỉ phân tử hoặc cấu trúc axit nucleic được phân lập, ví dụ, ARN thông tin (mARN), ARN thu được từ virut, hoặc ADN plasmit (pADN). Polynucleotit có thể bao gồm liên kết phosphodieste thông thường hoặc liên kết không thông thường (ví dụ, liên kết amit, như được phát hiện trong peptit axit nucleic (PNA). Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" dùng để chỉ một hoặc nhiều đoạn axit nucleic bất kỳ, ví dụ, mảnh ADN hoặc ARN, có trong polynucleotit.

Thuật ngữ phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit "được phân lập" được dự định là phân tử axit nucleic, ADN hoặc ARN, đã được loại bỏ khỏi môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, polynucleotit tái tổ hợp mã hóa polypeptit được chứa trong vectơ được coi là được phân lập nhằm các mục đích theo 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 loại hoặc polynucleotit được tinh chế (một phần hoặc hầu hết) trong dung dịch. Polynucleotit được phân lập bao gồm phân tử polynucleotit được chứa trong các tế bào thường chứa phân tử polynucleotit, nhưng phân tử polynucleotit 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. Phân tử ARN được phân lập bao gồm thể phiên mã ARN *in vivo* hoặc *in vitro* theo sáng chế, cũng như dạng mạch dương và âm, và dạng mạch kép. Polynucleotit được phân lập hoặc axit nucleic được phân lập theo sáng chế còn bao gồm các phân tử như vậy được sản xuất theo phương pháp tổng hợp. Ngoài ra, polynucleotit hoặc axit nucleic có thể là hoặc có thể bao gồm thành phần điều hòa như trình tự khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, hoặc gen kết thúc phiên mã.

Thuật ngữ axit nucleic hoặc polynucleotit có trình tự nucleotit "giống nhau" ít nhất, ví dụ, 95% với trình tự nucleotit đối chiếu theo sáng chế, dự định là trình tự nucleotit của polynucleotit giống với trình tự đối chiếu ngoại trừ trình tự polynucleotit có thể bao gồm lên đến năm đột biến điểm trong mỗi 100 nucleotit của trình tự nucleotit đối chiếu. Nói cách khác, để thu được polynucleotit có trình tự nucleotit giống nhau ít nhất 95% với trình tự nucleotit đối chiếu, lên đến 5% số nucleotit trong trình tự đối chiếu có thể được làm khuyết hoặc thay thế bằng một nucleotit khác, hoặc số lượng nucleotit lên đến 5% tổng số nucleotit trong trình tự đối chiếu có thể được xen vào trình tự đối chiếu. Các thay đổi này trong trình tự đối chiếu có thể xảy ra ở vị trí tận cùng 5’ hoặc 3’ của

trình tự nucleotit đối chiếu hoặc vị trí bất kỳ giữa các vị trí tận cùng này, được đặt rải rác riêng rẽ giữa các gốc trong trình tự đối chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liền kề trong trình tự đối chiếu. Để làm đối tượng thực tế, liệu trình tự polynucleotit cụ thể bất kỳ giống nhau ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nucleotit theo sáng chế có thể được xác định thường bằng cách sử dụng các chương trình máy tính đã biết, như các chương trình được mô tả trên đây đối với polypeptit (ví dụ ALIGN-2).

Thuật ngữ "cát-xét biểu hiện" dùng để chỉ polynucleotit được tạo ra theo cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp, với hàng loạt thành phần axit nucleic cụ thể mà cho phép phiên mã axit nucleic cụ thể trong tế bào đích. Cát-xét biểu hiện tái tổ hợp có thể được kết hợp vào plasmit, nhiễm sắc thể, ADN ti thể, ADN plastit, virut, hoặc mảnh axit nucleic. Thông thường, phần cát-xét biểu hiện tái tổ hợp của vectơ biểu hiện bao gồm, trong số các trình tự khác, trình tự axit nucleic cần được phiên mã và trình tự khởi đầu. Theo một số phương án, cát-xét biểu hiện theo sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế hoặc các mảnh của nó.

Thuật ngữ “vectơ” hoặc "vectơ biểu hiện" đồng nghĩa với "cấu trúc biểu hiện" và dùng để chỉ phân tử ADN được sử dụng để đưa vào và định hướng sự biểu hiện của gen đặc hiệu mà nó được kết hợp điều khiển được trong tế bào đích. Thuật ngữ bao gồm vectơ là cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vectơ được kết hợp vào hệ gen của tế bào vật chủ mà nó được chuyển vào. Vectơ biểu hiện theo sáng chế bao gồm cát-xét biểu hiện. Vectơ biểu hiện cho phép phiên mã một lượng lớn mARN ổn định. Một khi vectơ biểu hiện ở bên trong tế bào đích, phân tử axit ribonucleic hoặc protein được mã hóa bởi gen này được sản xuất bằng cơ cấu phiên mã và/hoặc dịch mã tế bào. Theo một phương án, vectơ biểu hiện theo sáng chế bao gồm cát-xét biểu hiện bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế hoặc các mảnh của nó.

Thuật ngữ "tế bào vật chủ", "dòng tế bào vật chủ," và "nuôi cấy tế bào vật chủ" được sử dụng thay thế cho nhau và dùng để chỉ tế bào mà axit nucleic ngoại sinh đã được chuyển vào, bao gồm thế hệ con của các tế bào này. Tế bào vật chủ bao gồm "thể biến nạp" và "tế bào được biến nạp," bao gồm tế bào được biến nạp sơ cấp và thế hệ con thu được từ đó mà không xét đến số lần cấy chuyển. Thế hệ con có thể không giống hoàn toàn về hàm lượng axit nucleic so với tế bào gốc, nhưng có thể chứa đột biến. Thế hệ con

đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc chọn lọc trong tế bào được biến nạp ban đầu được bao gồm ở đây. Tế bào vật chủ là kiểu hệ tế bào bất kỳ có thể được sử dụng để tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế. Tế bào vật chủ bao gồm tế bào được nuôi cấy, ví dụ, tế bào động vật có vú được nuôi cấy, như tế bào CHO, tế bào BHK, tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào u tủy YO, tế bào u tủy chuột nhắt P3X63, tế bào PER, tế bào PER.C6 hoặc tế bào lai, tế bào nấm men, tế bào côn trùng, và tế bào thực vật, chỉ kể ra một số ít, nhưng cả các tế bào được bao gồm trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc mô thực vật hoặc động vật được nuôi cấy.

"Thụ thể Fc hoạt hóa" là thụ thể Fc mà sau khi ghép khớp với miền Fc của kháng thể tạo ra các sự kiện truyền tín hiệu mà kích thích tế bào mang thụ thể để thực hiện chức năng tác động. Thụ thể Fc hoạt hóa ở người bao gồm FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), và FcαRI (CD89).

Độ độc hại tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) là cơ chế miễn dịch dẫn đến việc làm tan tế bào đích được phủ kháng thể bằng tế bào tác động miễn dịch. Tế bào đích là tế bào mà kháng thể hoặc dẫn xuất của nó bao gồm vùng Fc gắn kết đặc hiệu, thông thường thông qua phần protein là đầu tận cùng N với vùng Fc. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "ADCC giảm" được định nghĩa là sự giảm số lượng tế bào đích được làm tan trong thời gian cho trước, ở nồng độ kháng thể cho trước trong môi trường xung quanh tế bào đích, bằng cơ chế ADCC được định nghĩa trên đây, và/hoặc sự tăng nồng độ kháng thể trong môi trường xung quanh tế bào đích, được yêu cầu để đạt được sự làm tan số lượng tế bào đích cho trước trong thời gian cho trước, bằng cơ chế ADCC. Sự giảm ADCC so với ADCC được điều tiết bởi cùng một kháng thể được sản sinh bởi cùng kiểu tế bào vật chủ, sử dụng phương pháp sản xuất, tinh chế, phối trộn và bảo quản tiêu chuẩn giống nhau (đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này), nhưng không được xử lý kỹ thuật. Ví dụ, sự giảm ADCC được điều tiết bởi kháng thể bao gồm trong miền Fc của nó một biến thể thay thế axit amin làm giảm ADCC, so với ADCC được điều tiết bởi cùng một kháng thể mà không có biến thể thay thế axit amin này trong miền Fc. Thử nghiệm thích hợp để đo ADCC là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem ví dụ công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2006/082515 hoặc công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831).

"Lượng hữu hiệu" của một chất dùng để chỉ lượng cần thiết để dẫn đến thay đổi sinh lý trong tế bào hoặc mô mà nó được dùng.

"Lượng cho tác dụng điều trị bệnh" của một chất, ví dụ, dược phẩm, dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị hoặc phòng ngừa bệnh mong muốn. Lượng cho tác dụng điều trị bệnh của một chất, ví dụ, loại bỏ, làm giảm, làm chậm, tối thiểu hóa hoặc ngăn ngừa các tác dụng phụ của bệnh.

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật thuần hóa (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ người và động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và loài gặm nhấm (ví dụ chuột nhắt và chuột cống). Đặc biệt là, cá thể hoặc đối tượng này là người.

Thuật ngữ "dược phẩm" dùng để chỉ chế phẩm dưới dạng như vậy để cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính được chứa trong đó hữu hiệu, và không chứa thành phần bổ sung mà gây độc không chấp nhận được cho đối tượng sẽ dùng dược phẩm này.

"Chất mang dược dụng" dùng để chỉ thành phần trong dược phẩm, khác với thành phần hoạt tính, không độc đối với đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch đệm, tá dược, chất làm ổn định, hoặc chất bảo quản.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "sự điều trị" (và các biến thể ngữ pháp của nó như "điều trị" hoặc "việc điều trị") dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng với nỗ lực làm thay đổi chu trình tự nhiên của bệnh ở đối tượng cần điều trị, và có thể được thực hiện để phòng ngừa bệnh hoặc trong chu trình bệnh học lâm sàng. Các tác dụng điều trị mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngăn ngừa sự xuất hiện hoặc tái phát bệnh, làm dịu các triệu chứng, làm giảm hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, ngăn ngừa di căn, làm giảm tốc độ tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc giảm nhẹ tình trạng bệnh, và làm thuyên giảm hoặc cải thiện việc tiên lượng bệnh. Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế được sử dụng để trì hoãn sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh.

Thuật ngữ "chất đối kháng" được sử dụng theo nghĩa rộng nhất, và bao gồm phân tử bất kỳ phong bế, ức chế, hoặc trung hòa một phần hoặc hoàn toàn hoạt tính sinh học của polypeptit tự nhiên được nêu trong bản mô tả. Theo cách tương tự, thuật ngữ "chất

chủ vận" được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao gồm phân tử bất kỳ cảm ứng hoạt tính sinh học của polypeptit tự nhiên được nêu trong bản mô tả. Phân tử chất chủ vận hoặc chất đối kháng thích hợp cụ thể bao gồm kháng thể chất chủ vận hoặc chất đối kháng hoặc mảnh kháng thể, bao gồm mảnh kháng thể được xử lý kỹ thuật, các mảnh hoặc biến thể trình tự axit amin của polypeptit tự nhiên, peptit, oligonucleotit đối nghĩa, phân tử hữu cơ nhỏ, v.v. Phương pháp nhận biết chất chủ vận hoặc chất đối kháng của polypeptit có thể bao gồm bước cho polypeptit tiếp xúc với phân tử chất chủ vận hoặc chất đối kháng ứng viên và do sự thay đổi phát hiện được ở một hoặc nhiều hoạt tính sinh học thường được kết hợp với polypeptit.

Thuật ngữ "tờ rời trong bao gói" được sử dụng để chỉ các chỉ dẫn thường được bao gồm trong bao gói sản phẩm điều trị bệnh bán trên thị trường, chứa thông tin về chỉ định, sử dụng, liều lượng, cách dùng, liệu pháp kết hợp, chống chỉ định và/hoặc lưu ý liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm điều trị bệnh.

Tất cả các tài liệu tham khảo, công bố đơn sáng chế, patent và đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế được nêu trong bản mô tả được kết hợp toàn bộ ở đây để tham khảo.

Mô tả chi tiết các phương án

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế là đặc hiệu kép, tức là phân tử này bao gồm ít nhất hai gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với hai thể quyết định kháng nguyên riêng biệt, tức là CD3 và FolR1. Theo sáng chế, gốc gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab (tức là miền gắn kết kháng nguyên gồm có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi và vùng hằng định). Theo một phương án, phân tử Fab này là ở người. Theo một phương án khác, phân tử Fab này được nhân hóa. Theo một phương án khác nữa, phân tử Fab nêu trên bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở người.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có khả năng gắn kết đồng thời với kháng nguyên tế bào đích FolR1 và CD3. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng liên kết chéo tế bào T và tế bào đích biểu hiện FolR1 bằng cách gắn kết đồng thời với kháng nguyên tế bào đích FolR1 và CD3. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, việc gắn kết đồng thời này dẫn đến việc làm tan tế bào đích biểu hiện FolR1, đặc biệt là tế bào khối u

biểu hiện FolR1. Theo một phương án, việc gắn kết đồng thời này dẫn đến việc hoạt hóa tế bào T. Theo các phương án khác, việc gắn kết đồng thời này dẫn đến việc đáp ứng tế bào của tế bào lympho T, đặc biệt là tế bào lympho T gây độc tế bào, được chọn từ nhóm bao gồm: tăng sinh, biệt hóa, tiết xytokin, giải phóng phân tử tác động độc hại tế bào, hoạt tính độc hại tế bào, và biểu hiện các chỉ thị hoạt hóa. Theo một phương án, việc gắn kết phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T với CD3 mà không gắn kết đồng thời với kháng nguyên tế bào đích FolR1 không dẫn đến việc hoạt hóa tế bào T.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng đổi hướng hoạt tính độc hại tế bào của tế bào T đến tế bào đích biểu hiện FolR1. Theo một phương án cụ thể, việc đổi hướng này không phụ thuộc vào sự trình diện kháng nguyên peptit qua trung gian MHC bởi tế bào đích và và/hoặc độ đặc hiệu của tế bào T.

Cụ thể là, tế bào T theo một số phương án theo sáng chế là tế bào T gây độc tế bào. Theo một số phương án, tế bào T là tế bào T $CD4^+$ hoặc dương tính với CD8, đặc biệt là tế bào T $CD8^+$.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm ít nhất một gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với CD3 (trong bản mô tả còn được gọi là "gốc gắn kết kháng nguyên CD3" hoặc "gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất"). Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm không nhiều hơn một gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T tạo ra gắn kết hóa trị một với CD3. Theo một phương án cụ thể, CD3 là CD3 ở người hoặc CD3 ở khỉ đầu chó, đặc biệt nhất là CD3 ở người. Theo một phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên CD3 phản ứng chéo đối với (tức là gắn kết đặc hiệu với) CD3 ở người và CD3 ở khỉ đầu chó. Theo một số phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với cấu trúc siêu phân tử epsilon của CD3 (xem UniProt số P07766 (phiên bản 130), NCBI RefSeq số NP_000724.1, SEQ ID NO:150 đối với trình tự người; UniProt số Q95LI5 (phiên bản 49), NCBI ngân hàng gen số BAB71849.1, đối với trình tự đầu chó [Macaca fascicularis]).

Theo một số phương án, gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37,

SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng giống với SEQ ID NO: 36 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ giống với SEQ ID NO: 31 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm ít nhất một gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với kháng nguyên tế bào đích FolR1 (trong bản mô tả còn được gọi là "gốc gắn kết FolR1" hoặc gốc gắn kết kháng nguyên "thứ hai" hoặc "thứ ba"). Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với kháng nguyên tế bào đích FolR1 không gắn kết với FolR2 hoặc FolR3. Theo một phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 phản ứng chéo đối với (tức là gắn kết đặc hiệu với) FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó. Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm hai gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với kháng nguyên tế bào đích FolR1. Theo một phương án cụ thể như vậy, mỗi một trong số các gốc gắn kết kháng nguyên này gắn kết đặc hiệu với cùng một thể quyết định kháng nguyên. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, tất cả các gốc gắn kết kháng nguyên này là giống nhau. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm không nhiều hơn hai gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với FolR1.

Gốc gắn kết FolR1 thường là phân tử Fab gắn kết đặc hiệu với FolR1 và có thể định hướng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T mà nó được nối đến vị trí đích, ví dụ, kiểu cụ thể của tế bào khối u biểu hiện FolR1.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34; và

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1).

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm:

(iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1.

Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm trình tự vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng và CDR của chuỗi nhẹ giống nhau. Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba giống với gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên còn 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 phương án, mỗi gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, tùy ý thông qua chất liên kết peptit.

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

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có chuỗi nhẹ chung

Các tác giả của sáng chế tạo ra kháng thể đặc hiệu kép trong đó các gốc gắn kết cùng có chuỗi nhẹ chung giữ được độ đặc hiệu và hiệu quả của kháng thể đơn đặc hiệu gốc đối với CD3 và có thể gắn kết với kháng nguyên thứ hai (ví dụ, FolR1) bằng cách sử dụng cùng một chuỗi nhẹ. Việc tạo ra phân tử đặc hiệu kép có chuỗi nhẹ chung giữ được các tính chất gắn kết của kháng thể gốc không dễ dàng như CDR chung của chuỗi nhẹ lai phải đem lại độ đặc hiệu gắn kết đối với cả hai đích. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, một trong số chúng là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 và gốc còn lại trong số chúng là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1, trong đó phân tử Fab thứ nhất và thứ hai có chuỗi nhẹ VLCL giống nhau. Theo một phương án, chuỗi nhẹ (VLCL) giống nhau này bao gồm CDR của chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34. Theo một phương án, chuỗi nhẹ (VLCL) giống nhau nêu trên bao gồm SEQ ID NO. 35.

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

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 16, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 17, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:18, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34.

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

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

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

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 275 và SEQ ID NO: 315 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

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

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39, và trình tự axit amin của CDR của chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34;

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) và bao gồm trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng của SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 275 và SEQ ID NO: 315, và trình tự axit amin của CDR của chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, và SEQ ID NO: 34.

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

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31;

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 274 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

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

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

Theo một phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với FolR1 bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng giống với SEQ ID NO:15 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ giống với SEQ ID NO: 31 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% hoặc các biến thể của nó mà giữ được độ chức.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit giống với SEQ ID NO: 36 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, trình tự polypeptit giống với SEQ ID NO:15 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, và trình tự polypeptit giống với SEQ ID NO: 31 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm:

(iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba (là phân tử Fab) có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1.

Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm trình tự vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng và CDR của chuỗi nhẹ giống nhau. Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba giống với gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

(iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) và bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34.

Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 16, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 17, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:18, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34.

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

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

(iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử đặc hiệu kép trong đó ít nhất hai gốc gắn kết có chuỗi nhẹ giống nhau và chuỗi nặng được tổ chức lại tương ứng mà đem lại khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên CD3 hoạt hóa tế bào T và kháng nguyên tế bào đích FolR1, một cách tương ứng. Việc sử dụng nguyên tắc còn gọi là 'chuỗi nhẹ chung', tức là kết hợp hai chất gắn kết có chung một chuỗi nhẹ nhưng vẫn có các độ đặc hiệu riêng rẽ, ngăn chặn việc ghép cặp không chính xác chuỗi nhẹ. Do đó, có ít sản phẩm phụ hơn trong khi sản xuất, tạo điều kiện cho việc điều chế đồng nhất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T.

Các thành phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được dung hợp với nhau trong các cấu hình khác nhau. Các cấu hình minh họa được thể hiện trên Fig.1A-I và được mô tả thêm dưới đây.

Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T nêu trên còn bao gồm miền Fc gồm có cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng kết hợp ổn định. Các phương án minh họa dưới đây của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc được mô tả.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có mảnh Fab lai chéo

Các tác giả của sáng chế tạo ra mô hình kháng thể đặc hiệu kép thứ hai trong đó một trong các gốc gắn kết là mảnh Fab lai chéo. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép hóa trị một, trong đó một trong các mảnh Fab của phân tử IgG được thay thế bằng mảnh Fab lai chéo. Mảnh Fab lai chéo là mảnh Fab trong đó vùng biến đổi hoặc vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được hoán vị. Mô hình kháng thể đặc hiệu kép bao gồm mảnh Fab lai chéo đã được mô tả, ví dụ, trong WO2009080252, WO2009080253, WO2009080251, WO2009080254, WO2010/136172, WO2010/145792 và WO2013/026831. Theo một phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi hoặc vùng hằng định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị. Cải biến này ngăn chặn sự ghép cặp không chính xác của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ các phân tử Fab khác nhau, nhờ đó cải thiện hiệu suất và độ tinh khiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế khi sản xuất tái tổ hợp. Trong phân tử Fab lai chéo cụ thể hữu ích cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị. Trong một phân tử Fab lai chéo khác hữu ích cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, vùng hằng định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng

được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 57 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 65.

Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 56, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:57, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 59, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 60, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:65.

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

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64.

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

Theo một phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với FolR1 bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng giống với SEQ ID NO:55 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ giống với SEQ ID NO: 64 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% hoặc các biến thể của nó mà giữ được độ chức.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit giống với SEQ ID NO: 36 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, trình tự polypeptit giống với SEQ ID NO: 31 ít nhất khoảng 95%,

96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, trình tự polypeptit giống với SEQ ID NO:55 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, và trình tự polypeptit giống với SEQ ID NO: 64 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm:

(iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba là phân tử Fab thông thường. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba là phân tử Fab lai chéo.

Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm trình tự vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng và CDR của chuỗi nhẹ giống nhau. Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba giống với gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 57 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 65.

(iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 57 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 65.

Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 56, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:57, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 59, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 60, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:65.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba đều là phân tử Fab thông thường.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64.

(iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba đều là phân tử Fab thông thường.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 50 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54.

Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 9, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:50, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 52, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:54.

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

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51.

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

Theo một phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên đặc hiệu đối với FolR1 bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng giống với SEQ ID NO:49 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ giống với SEQ ID NO: 51 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% hoặc các biến thể của nó mà giữ được độ chức.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit giống với SEQ ID NO: 36 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, trình tự polypeptit giống với SEQ ID NO: 31 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, trình tự polypeptit giống với SEQ ID NO:49 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%, và trình tự polypeptit giống với SEQ ID NO: 51 ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm:

(iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba là phân tử Fab thông thường. Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab lai chéo.

Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm trình tự vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng và CDR của chuỗi nhẹ giống nhau. Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba giống với gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 49 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54.

(iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 50 và ít nhất

một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54.

Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 9, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:50, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 52, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:54.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba đều là phân tử Fab thông thường.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51.

(iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1) bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba đều là phân tử Fab thông thường.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử đặc hiệu kép trong đó hai gốc gắn kết mang lại khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 và một gốc gắn kết mang lại độ đặc hiệu cho kháng nguyên CD3 hoạt hóa tế bào T. Một trong các chuỗi nặng được cải biến để đảm bảo ghép cặp chính xác chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, do đó bỏ được nhu cầu phải có chuỗi nhẹ chung. Sự có mặt của hai vị trí gắn kết FolR1 ghép khớp thích hợp với kháng nguyên đích FolR1 và hoạt hóa tế bào T.

Các thành phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được dung hợp với nhau ở các cấu hình khác nhau. Các cấu hình minh họa được thể hiện trên Fig.1A-I và được mô tả thêm dưới đây.

Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T nêu trên còn bao gồm miền Fc gồm có cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng kết hợp ổn định. Các phương án minh họa dưới đây của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc được mô tả.

Mô hình phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T

Như được thể hiện trên đây và trên Fig.1A-I, theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm ít nhất hai mảnh Fab có chuỗi nhẹ (VLCL) giống nhau và có các chuỗi nặng (VHCL) khác nhau mang lại độ đặc hiệu cho hai kháng nguyên khác nhau, tức là một mảnh Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên CD3 hoạt hóa tế bào T và mảnh Fab còn lại có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích FolR1.

Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm ít nhất hai gốc gắn kết kháng nguyên (phân tử Fab), một trong số chúng là phân tử Fab lai chéo và một trong số chúng là phân tử Fab thông thường. Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 là phân tử Fab lai chéo và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR là phân tử Fab thông thường.

Các thành phần này của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được dung hợp với nhau ở các cấu hình khác nhau. Các cấu hình minh họa được thể hiện trên Fig.1A-I.

Theo một số phương án, mỗi gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo phương án cụ thể như vậy, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, miền Fc gồm có cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều chất liên kết peptit, trong đó mỗi gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo một phương án như vậy, gốc

gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai đều là mảnh Fab và có chuỗi nhẹ (VLCL) giống nhau. Theo phương án như vậy khác nữa, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 là phân tử Fab lai chéo và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR là phân tử Fab thông thường.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc và gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo phương án cụ thể như vậy, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, miền Fc gồm có cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều chất liên kết peptit, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai đều là mảnh Fab và có chuỗi nhẹ (VLCL) giống nhau. Theo phương án như vậy khác nữa, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 là phân tử Fab lai chéo và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR là phân tử Fab thông thường. Tùy ý, chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai còn có thể được dung hợp với nhau.

Theo các phương án khác, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo một phương án cụ thể như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Theo phương án cụ thể như vậy, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai, miền Fc gồm có cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều chất liên kết peptit, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, và gốc gắn kết kháng nguyên

thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai đều là mảnh Fab và có chuỗi nhẹ (VLCL) giống nhau. Theo phương án như vậy khác nữa, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 là phân tử Fab lai chéo và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR là phân tử Fab thông thường. Tùy ý, chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai còn có thể được dung hợp với nhau.

Gốc gắn kết kháng nguyên có thể được dung hợp với miền Fc hoặc với nhau một cách trực tiếp hoặc qua chất liên kết peptit, bao gồm một hoặc nhiều axit amin, thường nằm trong khoảng từ 2 đến 20 axit amin. Chất liên kết peptit là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả ở đây. Các chất liên kết peptit không miễn dịch thích hợp bao gồm, ví dụ, chất liên kết peptit $(G_4S)_n$ (SEQ ID NO: 300), $(SG_4)_n$ (SEQ ID NO: 301), $(G_4S)_n$ (SEQ ID NO: 300) hoặc $G_4(SG_4)_n$ (SEQ ID NO: 302). "n" thường là số nằm trong khoảng từ 1 đến 10, thường nằm trong khoảng từ 2 đến 4. Chất liên kết peptit đặc biệt thích hợp để dung hợp các chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai với nhau là $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 303). Chất liên kết peptit minh họa thích hợp để nối các chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai là EPKSC(D)-$(G_4S)_2$ (SEQ ID NO 304 và 305). Ngoài ra, các chất liên kết có thể bao gồm (một phần của) vùng bản lề globulin miễn dịch. Đặc biệt là khi gốc gắn kết kháng nguyên được dung hợp với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, nó có thể được dung hợp thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch hoặc một phần của nó, có hoặc không có chất liên kết peptit bổ sung.

Các tác giả của sáng chế đã phát hiện ra rằng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm hai gốc gắn kết đặc hiệu đối với kháng nguyên tế bào đích FolR có các đặc tính nổi bật so với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chỉ bao gồm một gốc gắn kết đặc hiệu đối với kháng nguyên tế bào đích FolR.

Do đó, theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế còn bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR. Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm trình tự vùng

xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng và CDR của chuỗi nhẹ giống nhau. Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba giống với gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai (tức là chúng bao gồm các trình tự axit amin giống nhau).

Theo một phương án, mỗi gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc và gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab đến đầu tận cùng N với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Theo phương án cụ thể như vậy, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba, miền Fc gồm có cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều chất liên kết peptit, trong đó mỗi gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc và gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất. Theo một phương án như vậy, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba là mảnh Fab thông thường và có chuỗi nhẹ (VLCL) giống nhau. Theo phương án như vậy khác nữa, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 là phân tử Fab lai chéo và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR là phân tử Fab thông thường. Tùy ý, chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba còn có thể được dung hợp với nhau.

Do đó, theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm năm chuỗi polypeptit tạo ra gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết CD3 và mỗi gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết thụ thể folat 1 (FolR1). Chuỗi polypeptit thứ nhất và thứ hai bao gồm, theo chiều từ đầu tận cùng (N) amin đến đầu tận cùng (C) carboxyl, miền biến đổi chuỗi nhẹ thứ nhất (VLD1) và miền hằng định chuỗi nhẹ thứ nhất (CLD1). Chuỗi polypeptit thứ ba bao gồm, theo chiều từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, miền biến đổi chuỗi nhẹ thứ hai (VLD2) và miền hằng định chuỗi nặng 1 thứ hai (CH1D2). Chuỗi polypeptit thứ tư bao gồm, theo chiều từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, miền biến đổi chuỗi nặng thứ nhất (VHD1), miền hằng định chuỗi nặng 1 thứ nhất (CH1D1), miền hằng định chuỗi nặng 2 thứ nhất

(CH2D1) và miền hằng định chuỗi nặng 3 thứ nhất (CH3D1). Chuỗi polypeptit thứ năm bao gồm VHD1, CH1D1, miền biến đổi chuỗi nặng thứ hai (VHD2), miền hằng định chuỗi nhẹ thứ hai (CLD2), miền hằng định chuỗi nặng 2 thứ hai (CH2D2) và miền hằng định chuỗi nặng 3 thứ hai (CH3D2). Chuỗi polypeptit thứ ba và VHD2 và CLD2 của chuỗi polypeptit thứ năm tạo ra gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết CD3. Chuỗi polypeptit thứ hai và VHD1 và CH1D1 của chuỗi polypeptit thứ năm tạo ra gốc gắn kết thứ ba có khả năng gắn kết với FolR1. Chuỗi polypeptit thứ nhất và VHD1 và CH1D1 của chuỗi polypeptit thứ tư tạo ra gốc gắn kết thứ hai có khả năng gắn kết với FolR1.

Theo một phương án khác, mỗi gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai. Theo phương án cụ thể như vậy, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba, miền Fc gồm có cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều chất liên kết peptit, trong đó mỗi gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc và gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba. Theo một phương án như vậy gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba là mảnh Fab thông thường và có chuỗi nhẹ (VLCL) giống nhau. Theo phương án như vậy khác nữa, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 là phân tử Fab lai chéo và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR là phân tử Fab thông thường. Tùy ý, chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai còn có thể được dung hợp với nhau.

Gốc gắn kết kháng nguyên có thể được dung hợp với miền Fc một cách trực tiếp hoặc qua chất liên kết peptit. Theo một phương án cụ thể, mỗi gốc gắn kết kháng nguyên được dung hợp với miền Fc thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, vùng bản lề globulin miễn dịch là vùng bản lề IgG_1 người.

Theo một phương án, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai và miền Fc là một phần của phân tử globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch là globulin miễn dịch lớp IgG. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch lớp con IgG_1. Theo một phương án khác, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch lớp con IgG_4. Theo một phương án cụ thể khác, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch người. Theo các phương án khác, globulin miễn dịch là globulin miễn dịch khảm hoặc globulin miễn dịch được nhân hóa.

Theo một phương án cụ thể về phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai và miền Fc là một phần của phân tử globulin miễn dịch, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba là mảnh Fab thông thường và có chuỗi nhẹ (VLCL) giống nhau, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34; và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 18 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34.

Theo một phương án cụ thể về phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai và miền Fc là một phần của phân tử globulin miễn dịch, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba là mảnh Fab thông thường và có chuỗi nhẹ (VLCL) giống nhau, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự của SEQ ID NO: 36, chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự của SEQ ID NO: 31; và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự của SEQ ID NO: 15, chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự của SEQ ID NO: 31.

Theo một phương án cụ thể về phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai và miền Fc là một phần của phân tử globulin miễn dịch, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 là phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi hoặc vùng hằng định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị, bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 34; và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 56 và SEQ ID NO: 57 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60 và SEQ ID NO: 65.

Theo một phương án cụ thể về phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và thứ hai và miền Fc là một phần của phân tử globulin miễn dịch, và gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất và gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 là phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi hoặc vùng hằng định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự của SEQ ID NO: 36, chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự của SEQ ID NO: 31; và gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự của SEQ ID NO: 55, chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự của SEQ ID NO: 65.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có hóa trị một đối với mỗi kháng nguyên. Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể gắn kết với CD3 ở người và thụ thể folat alpha người (FolR1) và được tạo ra mà không sử dụng phương pháp hetero-dime hóa, như, ví dụ, công nghệ phần phình thành phần lõm. Ví dụ, phân tử này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng thư viện chuỗi nhẹ chung và công nghệ CrossMab. Theo một

phương án cụ thể, vùng biến đổi của chất gắn kết CD3 được dung hợp với miền CH1 của kháng thể IgG1 người tiêu chuẩn để tạo ra phân tử cắt VLVH (được dung hợp với Fc) mà là chung đối với cả hai độ đặc hiệu. Để tạo ra bản sao đã cắt (VHCL), miền chuỗi nặng biến đổi đặc hiệu CD3 được dung hợp với chuỗi nhẹ λ hằng định ở người trong khi đó miền chuỗi nặng biến đổi đặc hiệu đối với FolR1 ở người (ví dụ, được phân lập từ thư viện chuỗi nhẹ chung) được dung hợp với chuỗi nhẹ κ hằng định ở người. Phân tử mong muốn thu được có các chuỗi ghép cặp chính xác bao gồm cả chuỗi nhẹ kappa và lambda hoặc các mảnh của nó. Do đó, loại phân tử đặc hiệu kép mong muốn này có thể được tinh chế từ loại ghép cặp không chính xác hoặc homodime với các bước tinh chế tuần tự được chọn lọc cho chuỗi nhẹ kappa và lambda, trong một trong hai trình tự. Theo một phương án cụ thể, việc tinh chế kháng thể đặc hiệu kép mong muốn sử dụng các bước tinh chế tiếp đó với cột KappaSelect và LambdaFabSelect (GE Healthcare) để loại bỏ kháng thể homodime không mong muốn.

Miền Fc

Miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gồm có một cặp chuỗi polypeptit bao gồm 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 bao gồm miền hằng định chuỗi nặng IgG của CH2 và CH3. Hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc có khả năng kết hợp ổn định với nhau. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm không nhiều hơn một miền Fc.

Theo một phương án theo sáng chế, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là miền Fc của IgG. Theo một phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc của IgG_1. Theo một phương án khác, miền Fc là miền Fc của IgG_4. Theo một phương án cụ thể hơn, miền Fc là miền Fc của IgG_4 bao gồm biến thể thay thế axit amin ở vị trí S228 (đánh số theo Kabat), đặc biệt là biến thể thay thế axit amin S228P. Biến thể thay thế axit amin này làm giảm sự trao đổi nhánh Fab in vivo của các kháng thể IgG_4 (xem Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). Theo một phương án cụ thể khác, miền Fc là của người. Trình tự minh họa của vùng Fc của IgG_1 người được nêu trong SEQ ID NO:245.

Cải biến miền Fc thúc đẩy sự heterodime hóa

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm các gốc gắn kết kháng nguyên khác nhau, được dung hợp với một cấu trúc hoặc cấu trúc còn lại trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, do đó hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc thường được bao gồm trong hai chuỗi polypeptit không giống nhau. Việc đồng biểu hiện tái tổ hợp các polypeptit này và việc dime hóa sau đó tạo ra một vài tổ hợp có thể có của hai polypeptit. Để cải thiện hiệu suất và độ tinh khiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T khi sản xuất tái tổ hợp, từ đó có lợi khi đưa vào trong miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, cải biến thúc đẩy sự kết hợp của polypeptit mong muốn.

Do đó, theo các phương án cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc. Vị trí của tương tác protein-protein bao quát nhất giữa hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc của IgG người là trong miền CH3 của miền Fc. Do đó, theo một phương án, cải biến này là trong miền CH3 của miền Fc.

Theo một phương án cụ thể, cải biến này còn được gọi là cải biến "phần phình thành phần lõm", bao gồm cải biến "phần phình" ở một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và cải biến "phần lõm" ở cấu trúc còn lại trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc.

Công nghệ phần phình thành phần lõm được mô tả trong, ví dụ, US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) và Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Thông thường, phương pháp này bao gồm bước đưa phần lồi ("phần phình") ở bề mặt chung của polypeptit thứ nhất và hốc tương ứng ("phần lõm") ở bề mặt chung của polypeptit thứ hai, sao cho phần lồi có thể được đặt trong hốc để thúc đẩy sự tạo ra heterodime và tạo ra homodime cản trở. Phần lồi được xây dựng cấu trúc bằng cách thay thế các chuỗi bên axit amin nhỏ từ bề mặt chung của polypeptit thứ nhất bằng chuỗi bên lớn hơn (ví dụ, tyrosin hoặc tryptophan). Các hốc bù có kích cỡ giống nhau hoặc tương tự với phần lồi được tạo ra trong bề mặt chung của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế các chuỗi bên axit amin lớn hơn bằng các chuỗi bên nhỏ hơn (ví dụ, alanin hoặc threonin).

Do đó, theo một phương án cụ thể, trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra

phần lồi bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất mà được được bố trí trong hốc bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra hốc bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai mà trong đó phần lồi bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất được bố trí.

Phần lồi và hốc này có thể được tạo ra bằng cách thay đổi axit nucleic mã hóa polypeptit, ví dụ, bằng đột biến đặc hiệu vị trí, hoặc bằng cách tổng hợp peptit.

Theo một phương án cụ thể, trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V). Theo một phương án, ngoài ra, trong cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc leuxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A).

Theo một phương án khác nữa, ngoài ra trong cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein (S354C), và ngoài ra, trong cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C). Việc đưa hai gốc xystein này vào dẫn đến việc tạo ra cầu disulfua giữa hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, từ đó làm ổn định thêm dime (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Theo một phương án cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với CD3 được dung hợp (tùy ý thông qua gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với FolR1 trên kháng nguyên tế bào đích) với cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc (bao gồm cải biến "phần phình"). Không mong muốn bị giới hạn bởi lý thuyết, việc dung hợp của gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với CD3 với cấu trúc siêu phân tử chứa phần phình của miền Fc sẽ (còn) tối thiểu hóa việc tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm hai gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết với CD3 (sự va chạm trong không gian của hai polypeptit chứa phần phình).

Theo một phương án thay thế, cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc bao gồm cải biến điều tiết tác dụng điều khiển tĩnh điện, ví dụ như được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2009/089004.

Thông thường, phương pháp này bao gồm sự thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin ở bề mặt chung của hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bằng các gốc axit amin tích điện sao cho sự tạo ra homodime trở nên bất lợi về mặt tĩnh điện nhưng sự heterodime hóa lại có lợi về mặt tĩnh điện.

Cải biến miền Fc loại bỏ sự gắn kết thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động

Miền Fc mang lại cho phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T các tính chất dược động học có lợi, bao gồm thời gian bán hủy trong huyết thanh lâu mà góp phần vào việc tích tụ tốt trong mô đích và tỷ lệ phân bố máu-mô có lợi. Tuy nhiên, ở cùng thời điểm đó nó có thể dẫn đến việc hướng đích không mong muốn của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T đến tế bào biểu hiện thụ thể Fc thay vì đến tế bào mang kháng nguyên được ưu tiên. Hơn nữa, việc đồng hoạt hóa con đường truyền tín hiệu thụ thể Fc có thể dẫn đến việc giải phóng xytokin mà, kết hợp với các tính chất hoạt hóa tế bào T và thời gian bán hủy lâu của phân tử gắn kết kháng nguyên, dẫn đến việc hoạt hóa quá mức thụ thể xytokin và các tác dụng phụ nghiêm trọng khi dùng toàn thân. Việc hoạt hóa tế bào miễn dịch (mang thụ thể Fc) khác với tế bào T thậm chí có thể làm giảm hiệu quả của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T do sự phá hủy có thể có của tế bào T, ví dụ, bằng tế bào NK.

Do đó, theo các phương án cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế biểu hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, so với miền Fc của IgG_1 tự nhiên. Theo một phương án như vậy, miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) biểu hiện ít hơn 50%, tốt hơn là ít hơn 20%, tốt hơn nữa là ít hơn 10% và tốt nhất là ít hơn 5% ái lực gắn kết với thụ thể Fc, so với miền Fc của IgG_1 tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc của IgG_1 tự nhiên), và/hoặc ít hơn 50%, tốt hơn là ít hơn 20%, tốt hơn nữa là ít hơn 10% và tốt nhất là ít hơn 5% chức năng tác động, so với miền Fc của IgG_1 tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc của IgG_1 tự nhiên). Theo một phương án, miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) hầu như không gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc cảm ứng chức năng tác động. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc người. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ người

hoạt hóa, cụ thể hơn là FcγRIIIa, FcγRI hoặc FcγRIIa người, cụ thể nhất là FcγRIIIa người. Theo một phương án, chức năng tác động là một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm bao gồm CDC, ADCC, ADCP, và tiết xytokin. Theo một phương án cụ thể, chức năng tác động là ADCC. Theo một phương án, miền Fc biểu hiện ái lực gắn kết gần như tương tự với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn), so với miền Fc của IgG_1 tự nhiên. Gắn kết gần như tương tự với FcRn đạt được khi miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) biểu hiện lớn hơn khoảng 70%, đặc biệt là lớn hơn khoảng 80%, đặc biệt hơn nữa là lớn hơn khoảng 90% ái lực gắn kết của miền Fc của IgG_1 tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc của IgG_1 tự nhiên) với FcRn.

Theo một số phương án, miền Fc được xử lý kỹ thuật để có ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, so với miền Fc không được xử lý kỹ thuật. Theo các phương án cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm một hoặc nhiều đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động. Thông thường, một hoặc nhiều đột biến axit amin giống nhau có trong mỗi một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc. Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc ít nhất là 2 lần, ít nhất 5 lần, hoặc ít nhất 10 lần. Theo các phương án mà có nhiều hơn một đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc, tổ hợp của các đột biến axit amin này có thể làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc ít nhất 10 lần, ít nhất 20 lần, hoặc thậm chí ít nhất 50 lần. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc được xử lý kỹ thuật biểu hiện ít hơn 20%, đặc biệt là ít hơn 10%, đặc biệt hơn là ít hơn 5% ái lực gắn kết với thụ thể Fc so với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc không được xử lý kỹ thuật. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo một số phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc người. Theo một số phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ người hoạt hóa, cụ thể hơn là FcγRIIIa, FcγRI hoặc FcγRIIa người, cụ thể nhất là FcγRIIIa người. Tốt hơn là, mức gắn kết với từng thụ thể này được làm giảm. Theo một số phương án, ái lực gắn kết với thành phần bổ sung, ái lực gắn kết đặc hiệu với C1q, cũng được làm giảm. Theo một phương án, ái lực gắn kết với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn)

không được làm giảm. Gắn kết gần như tương tự với FcRn, tức là việc bảo quản ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể này, đạt được khi miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc này) biểu hiện lớn hơn khoảng 70% ái lực gắn kết của dạng không được xử lý kỹ thuật của miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm dạng không được xử lý kỹ thuật của miền Fc này) với FcRn. Miền Fc, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm miền Fc này, có thể biểu hiện lớn hơn khoảng 80% và thậm chí lớn hơn khoảng 90% ái lực như vậy. Theo một số phương án, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được xử lý kỹ thuật để có chức năng tác động giảm, so với miền Fc không được xử lý kỹ thuật. Chức năng tác động giảm có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều chức năng sau: độ độc hại tế bào phụ thuộc vào thể bổ sung (CDC) giảm, độ độc hại tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) giảm, thực bào ở tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP) giảm, tiết xytokin giảm, hấp thụ kháng nguyên qua trung gian phức miễn dịch bởi tế bào trình diện kháng nguyên giảm, gắn kết với tế bào NK giảm, gắn kết với đại thực bào giảm, gắn kết với tế bào đơn nhân giảm, gắn kết với tế bào nhiều dạng nhân giảm, sự chết tế bào theo chương trình cảm ứng việc truyền tín hiệu trực tiếp giảm, liên kết chéo của các kháng thể gắn kết đích giảm, sự trưởng thành tế bào đuôi gai giảm, hoặc mồi tế bào T giảm. Theo một phương án, chức năng tác động giảm là một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm bao gồm CDC giảm, ADCC giảm, ADCP giảm, và tiết xytokin giảm. Theo một phương án cụ thể, chức năng tác động giảm là ADCC giảm. Theo một phương án, ADCC giảm ít hơn 20% ADCC được cảm ứng bằng miền Fc không được xử lý kỹ thuật (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc không được xử lý kỹ thuật).

Theo một phương án, đột biến axit amin làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động là biến thể thay thế axit amin. Theo một phương án, miền Fc bao gồm biến thể thay thế axit amin ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm E233, L234, L235, N297, P331 và P329. Theo một phương án cụ thể hơn, miền Fc bao gồm biến thể thay thế axit amin ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm L234, L235 và P329. Theo một số phương án, miền Fc bao gồm biến thể thay thế axit amin L234A và L235A. Theo một phương án như vậy, miền Fc là miền Fc của IgG_1, đặc biệt là miền Fc của IgG_1 người. Theo một phương án, miền Fc bao gồm biến thể thay thế axit amin ở vị trí P329.

Theo một phương án cụ thể hơn, biến thể thay thế axit amin là P329A hoặc P329G, đặc biệt là P329G. Theo một phương án, miền Fc bao gồm biến thể thay thế axit amin ở vị trí P329 và biến thể thay thế axit amin khác ở vị trí được chọn từ E233, L234, L235, N297 và P331. Theo một phương án cụ thể hơn, biến thể thay thế axit amin khác này là E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D hoặc P331S. Theo các phương án cụ thể, miền Fc bao gồm biến thể thay thế axit amin ở vị trí P329, L234 và L235. Theo các phương án cụ thể hơn, miền Fc bao gồm đột biến axit amin L234A, L235A và P329G ("P329G LALA"). Theo một phương án như vậy, miền Fc là miền Fc của IgG_1, đặc biệt là miền Fc của IgG_1 người. Tổ hợp "P329G LALA" của các biến thể thay thế axit amin loại bỏ gần như hoàn toàn sự gắn kết thụ thể Fcγ của miền Fc của IgG_1 người, như được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831, được kết hợp toàn bộ ở đây để tham khảo. WO 2012/130831 còn mô tả phương pháp xây dựng miền Fc đột biến như vậy và phương pháp xác định các tính chất của nó như gắn kết thụ thể Fc hoặc chức năng tác động.

Kháng thể IgG_4 biểu hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và chức năng tác động giảm so với kháng thể IgG_1. Do đó, theo một số phương án, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế là miền Fc của IgG_4, đặc biệt là miền Fc của IgG_4 người. Theo một phương án, miền Fc của IgG_4 bao gồm biến thể thay thế axit amin ở vị trí S228, đặc biệt là biến thể thay thế axit amin S228P. Để làm giảm thêm ái lực gắn kết của nó với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động của nó, theo một phương án, miền Fc của IgG_4 bao gồm biến thể thay thế axit amin ở vị trí L235, đặc biệt là biến thể thay thế axit amin L235E. Theo một phương án khác, miền Fc của IgG_4 bao gồm biến thể thay thế axit amin ở vị trí P329, đặc biệt là biến thể thay thế axit amin P329G. Theo một phương án cụ thể, miền Fc của IgG4 bao gồm biến thể thay thế axit amin ở vị trí S228, L235 và P329, đặc biệt là biến thể thay thế axit amin S228P, L235E và P329G. Các đột biến miền Fc của IgG_4 này và các tính chất gắn kết thụ thể Fcγ của chúng được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831, được kết hợp toàn bộ ở đây để tham khảo.

Theo một phương án cụ thể, miền Fc biểu hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, so với miền Fc của IgG_1 tự nhiên, là miền Fc của IgG_1 người bao gồm biến thể thay thế axit amin L234A, L235A và tùy ý P329G, hoặc miền Fc của IgG_4 người bao gồm biến thể thay thế axit amin S228P, L235E và tùy ý P329G.

Theo một số phương án, việc N-glycosyl hóa của miền Fc được loại bỏ. Theo một phương án như vậy, miền Fc bao gồm đột biến axit amin ở vị trí N297, cụ thể là biến thể thay thế axit amin thay thế asparagin bằng alanin (N297A) hoặc axit aspartic (N297D).

Ngoài các miền Fc được mô tả trên đây và trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831, miền Fc có khả năng gắn kết thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm còn bao gồm các miền có thay thế một hoặc nhiều gốc miền Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (patent Mỹ số 6,737,056). Các đột biến Fc này bao gồm đột biến Fc có thay thế ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm đột biến Fc còn gọi là "DANA" có thay thế gốc 265 và 297 với alanin (Patent Mỹ số 7,332,581).

Miền Fc đột biến có thể được xây dựng bằng cách làm khuyết, thay thế, xen vào hoặc cải biến axit amin sử dụng phương pháp di truyền hoặc phương pháp hóa học đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp di truyền có thể bao gồm đột biến đặc hiệu vị trí của trình tự ADN mã hóa, PCR, tổng hợp gen, và phương pháp tương tự. Các thay đổi nucleotit chính xác có thể được xác minh bằng cách, ví dụ, giải trình tự.

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

Chức năng tác động của miền Fc, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc, có thể được đo bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thử nghiệm thích hợp để đo ADCC được mô tả ở đây. Các ví dụ khác về thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đáng quan tâm được mô tả trong patent Mỹ số 5,500,362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) and Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); Patent Mỹ số 5,821,337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Theo một cách khác, phương pháp thử nghiệm không hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (xem, ví dụ, thử nghiệm độc hại tế bào không hoạt tính phóng xạ ACTI™ đối với kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); và thử

nghiệm độc hại tế bào không hoạt tính phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Tế bào tác động hữu ích cho thử nghiệm này bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và tế bào diệt tự nhiên (NK). Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử đáng quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mô hình động vật như mô hình được bộc lộ trong Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

Theo một số phương án, mức gắn kết của miền Fc với thành phần bổ sung, đặc biệt là C1q, được làm giảm. Do đó, theo một số phương án trong đó miền Fc được xử lý kỹ thuật để có chức năng tác động giảm, chức năng tác động giảm này bao gồm CDC giảm. Thử nghiệm gắn kết C1q có thể được thực hiện để xác định liệu phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể gắn kết C1q không và do đó có hoạt tính CDC. Xem ví dụ, ELISA gắn kết C1q và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ sung, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (xem, ví dụ, Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); và Cragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

Các tính chất sinh học và đặc tính chức năng của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể hiểu độ hiệu nghiệm có lợi của phân tử phân biệt có chọn lọc giữa tế bào ung thư và tế bào không ung thư, tế bào khỏe mạnh. Một cách để hoàn thành mục tiêu này là bằng cách chọn lọc đích thích hợp. Các chỉ thị được biểu hiện dành riêng trên tế bào khối u có thể được sử dụng để hướng đích có chọn lọc phân tử tác động hoặc tế bào tác động đến tế bào khối u trong khi dự trữ tế bào bình thường mà không biểu hiện chỉ thị này. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, chỉ thị còn gọi là chỉ thị tế bào khối u cũng được biểu hiện trong mô bình thường, mặc dù ở mức độ thấp hơn. Việc biểu hiện này trong mô bình thường làm tăng khả năng độc hại. Do đó, có nhu cầu trong lĩnh vực kỹ thuật này về phân tử có thể hướng đích có chọn lọc hơn các tế bào khối u. Sáng chế được mô tả ở đây đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T hướng đích có chọn lọc tế bào khối u dương tính với FolR1 và tế bào không ung thư không bình thường biểu hiện FolR1 ở mức độ thấp hoặc không biểu hiện. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm ít nhất hai, tốt hơn là hai, gốc gắn kết FolR1 có ái lực tương đối thấp mang lại tác dụng ái tính mà cho phép biệt hóa giữa tế bào biểu hiện

FolR1 cao và thấp. Do tế bào khối u biểu hiện FolR1 ở mức độ cao hoặc trung bình, phương án theo sáng chế này gắn kết có chọn lọc với, và/hoặc cảm ứng việc tiêu diệt, tế bào khối u và tế bào không ung thư không bình thường biểu hiện FolR1 ở mức độ thấp hoặc không biểu hiện. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là ở dạng 2+1 nghịch chuyển. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u dương tính với FolR1 và không tiêu diệt tế bào không phải khối u và bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và hai gốc gắn kết kháng nguyên FolR1 mà mỗi gốc bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 9, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:50, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 52, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:54.

Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T không cảm ứng việc tiêu diệt tế bào bình thường có ít hơn khoảng 1000 bản sao của bề mặt FolR1 của nó.

Ngoài các đặc tính thuận lợi nêu trên, một phương án theo sáng chế không đòi hỏi liên kết ngang hóa học hoặc phương pháp lai cần được tạo ra. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng sản sinh trong tế bào CHO. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit được nhân hóa và polypeptit người. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T không gây ra liên kết chéo FcgR. Theo một phương án như vậy, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng sản sinh trong tế bào CHO và bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và hai gốc gắn kết kháng nguyên FolR1, mỗi gốc bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 9, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:50, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 52, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:54.

Như được lưu ý trên đây, một số phương án được dự định ở đây bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có hai gốc gắn kết mang lại khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 và một gốc gắn kết mang lại độ đặc hiệu cho kháng nguyên CD3 hoạt hóa tế bào T, trong đó mỗi gốc gắn kết FolR1 riêng rẽ ghép khớp với kháng nguyên có ái lực thấp. Tuy nhiên, do phân tử bao gồm hai gốc gắn kết kháng nguyên mang lại khả năng gắn kết với FolR1, tổng thể ái tính của phân tử, tạo ra khả năng gắn kết hiệu quả với tế bào đích biểu hiện FolR1 và hoạt hóa tế bào T để cảm ứng chức năng tác động tế bào T. Cân nhắc là trong khi FolR1 được biểu hiện ở mức độ khác nhau trên tế bào khối u, nó cũng được biểu hiện ở các mức độ rất thấp (ví dụ, ít hơn khoảng 1000 bản sao trên bề mặt tế bào) trong một số tế bào bình thường, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng nhận ra độ hiệu nghiệm có lợi của phân tử này khi sử dụng làm chất điều trị bệnh. Phân tử này hướng đích có chọn lọc tế bào khối u so với tế bào bình thường. Do đó, phân tử này có thể được dùng cho cá thể cần điều trị mà rất ít phải lo lắng về độ độc hại do tế bào bình thường FolR1 dương so với phân tử gắn kết với FolR1 có ái lực cao để cảm ứng chức năng tác động. Theo một phương án được ưu tiên, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có ái lực gắn kết hóa trị một với huFolR1 trong khoảng micromol và ái tính với huFolR1 trong khoảng nanomol.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người với K_D biểu kiến nằm trong khoảng từ 10nM đến 40nM. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người với K_D biểu kiến bằng khoảng 10nM. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó với K_D biểu kiến bằng khoảng 10nM và khoảng 30nM, một cách tương ứng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người với K_D gắn kết hóa trị một bằng ít nhất khoảng 1000nM. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người với K_D gắn kết hóa trị một bằng khoảng 1400nM. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người với K_D gắn kết hóa trị một bằng khoảng 1400nM và FolR1 ở khỉ đầu chó với K_D gắn kết hóa trị một bằng khoảng 5600nM. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt

hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người với K_D biểu kiến bằng khoảng 10nM và K_D gắn kết hóa trị một bằng khoảng 1400nM.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người với K_D biểu kiến nằm trong khoảng từ 5,36pM đến 4nM. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó với K_D biểu kiến bằng khoảng 4nM. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở chuột với K_D biểu kiến bằng khoảng 1,5nM. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người với K_D gắn kết hóa trị một bằng ít nhất khoảng 1000nM. Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó với K_D biểu kiến bằng khoảng 4nM, gắn kết FolR1 ở chuột với K_D biểu kiến bằng khoảng 1,5nM, và bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và hai gốc gắn kết kháng nguyên FolR1, mỗi gốc bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 9, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:50, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 52, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:54. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết FolR1 ở người với K_D gắn kết hóa trị một bằng ít nhất khoảng 1000nM và bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và hai gốc gắn kết kháng nguyên FolR1, mỗi gốc bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 9, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:50, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 52, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:54.

Như được mô tả trên đây, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dự định ở đây có thể cảm ứng chức năng tác động tế bào T, ví dụ, biểu hiện chỉ thị bề mặt tế bào, sản sinh xytokin, tiêu diệt qua trung gian tế bào T. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc

tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào đích biểu hiện FolR1, như tế bào khối u người, *in vitro*. Theo một phương án, tế bào T là tế bào T CD8+. Các ví dụ về tế bào khối u người biểu hiện FolR1 bao gồm nhưng không giới hạn ở tế bào Hela, Skov-3, HT-29, và HRCEpiC. Tế bào ung thư người dương tính với FolR1 khác mà có thể được sử dụng để thử nghiệm *in vitro* là đã có sẵn đối với người có trình độ trung bình. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u người biểu hiện FolR1 *in vitro* với EC50 nằm trong khoảng từ 36pM đến 39573pM sau 24 giờ. Đặc biệt được dự định là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 *in vitro* với EC50 bằng khoảng 36pM sau 24 giờ. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 *in vitro* với EC50 bằng khoảng 178,4pM sau 24 giờ. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 *in vitro* với EC50 bằng khoảng 134,5pM hoặc lớn hơn sau 48 giờ. EC50 có thể được đo bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng phương pháp được nêu trong bản mô tả bằng các ví dụ.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên cảm ứng việc điều hòa tăng sự biểu hiện bề mặt tế bào của ít nhất một trong số CD25 và CD69 trên tế bào T như được đo bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Theo một phương án, tế bào T là tế bào T $CD4^+$ hoặc tế bào T $CD8^+$.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên gắn kết với FolR1 được biểu hiện trên tế bào khối u người. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên gắn kết với epitop cấu hình trên FolR1 ở người. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên không gắn kết với thụ thể folat 2 (FolR2) của người hoặc thụ thể folat 3 (FolR3) của người. Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên gắn kết với polypeptit FolR1 bao gồm các axit amin 25 đến 234 của FolR1 ở người (SEQ

ID NO:227). Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 gắn kết với polypeptit FolR1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:227, với polypeptit FolR1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:230 và với polypeptit FolR1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:231, và trong đó gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 không gắn kết với polypeptit FolR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:228 hoặc 229. Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên FolR1 gắn kết với polypeptit FolR1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:227, 230 và 231, và trong đó gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 không gắn kết với polypeptit FolR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:228 hoặc 229, và bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và hai gốc gắn kết kháng nguyên FolR1, mỗi gốc bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 9, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:50, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 52, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:54.

Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 gắn kết với polypeptit FolR1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:227 và với polypeptit FolR1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:231, và trong đó gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 không gắn kết với polypeptit FolR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:228, 229 hoặc 230. Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên FolR1 gắn kết với polypeptit FolR1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:227 và với polypeptit FolR1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:231, và trong đó gốc gắn kết kháng nguyên của FolR1 không gắn kết với polypeptit FolR bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:228, 229 hoặc 230, và bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên CD3 bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:39, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34 và hai gốc gắn

kết kháng nguyên FolR1, mỗi gốc bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 16, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 275, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:315, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34.

Đối với FolR1, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dự định ở đây có thể có tác dụng chủ vận, đối kháng hoặc tác dụng trung hòa. Các ví dụ về tác dụng chủ vận bao gồm cảm ứng hoặc tăng cường việc truyền tín hiệu qua FolR1 khi ghép khớp bằng gốc gắn kết FolR1 với thụ thể FolR1 trên tế bào đích. Các ví dụ về hoạt tính đối kháng bao gồm loại bỏ hoặc làm giảm việc truyền tín hiệu qua FolR1 khi ghép khớp bởi gốc gắn kết FolR1 với thụ thể FolR1 trên tế bào đích. Điều này có thể, ví dụ, xảy ra bằng cách ngăn chặn hoặc làm giảm tương tác giữa folat với FolR1. Các biến thể trình tự theo các phương án được nêu trong bản mô tả có ái lực thấp hơn trong khi giữ các tính chất sinh học nêu trên được dự định cụ thể.

Thể tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế còn đề cập đến thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được tiếp hợp với chất độc hại tế bào như chất hóa trị, chất ức chế sinh trưởng, độc tố (ví dụ, độc tố hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, cây trồng, hoặc động vật, hoặc các phân đoạn của nó), hoặc chất đồng vị hoạt tính phóng xạ (tức là, thể tiếp hợp phóng xạ).

Polynucleotit

Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T như được mô tả ở đây hoặc mảnh của nó.

Polynucleotit theo sáng chế bao gồm polynucleot giống với các trình tự nêu trong SEQ ID NO:151-226 bao gồm các mảnh chức năng hoặc các biến thể của nó ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%.

Polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể được biểu hiện dưới dạng một polynucleotit đơn lẻ mã hóa toàn bộ phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T hoặc dưới dạng nhiều (ví dụ, hai hoặc nhiều) polynucleotit được đồng biểu hiện. Polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit được đồng biểu hiện có thể kết hợp thông qua, ví dụ, liên kết disulfua hoặc

phương tiện khác để tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chức năng. Ví dụ, phần chuỗi nhẹ của gốc gắn kết kháng nguyên có thể được mã hóa bởi polynucleotit riêng rẽ từ phần phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm phần chuỗi nặng của gốc gắn kết kháng nguyên, cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và tùy ý (một phần của) gốc gắn kết kháng nguyên khác. Khi được đồng biểu hiện, polypeptit của chuỗi nặng kết hợp với polypeptit của chuỗi nhẹ để tạo ra gốc gắn kết kháng nguyên. Trong một ví dụ khác, phần phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và tùy ý (một phần của) một hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên có thể được mã hóa bởi polynucleotit riêng rẽ từ phần phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm cấu trúc còn lại trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và tùy ý (một phần của) gốc gắn kết kháng nguyên. Khi được đồng biểu hiện, cấu trúc siêu phân tử của miền Fc sẽ kết hợp để tạo ra miền Fc.

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

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa trình tự vùng biến đổi như được thể hiện trong SEQ ID NO 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 và 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa trình tự polypeptit như được thể hiện trong SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 1, 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, 108, 109, 110, 111,112, 113,

114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244. Theo một phương án khác, sáng chế còn đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự giống với trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO 97, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 12, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 246, 247 ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO 97, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 12, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 246, 247. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa trình tự vùng biến đổi giống với trình tự axit amin trong SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5,6, 7, 11,13, 15, 19, 21, 12, 25, 27, 29, 31, 36, 41, 45, 49, 51, 55, 58, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 82, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 12, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135 ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa polypeptit bao gồm một hoặc nhiều trình tự giống với trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 8, 9, 50, 37, 38, và 39 ít nhất khoảng 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%. Sáng chế bao gồm polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa trình tự vùng biến đổi của SEQ ID NO 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158,

159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182 và 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223 với biến thể thay thế axit amin bảo toàn. Sáng chế còn bao gồm polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế hoặc mảnh của nó, trong đó polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa trình tự polypeptit của SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 1, 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, 108, 109, 110, 111,112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138 và 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244 với biến thể thay thế axit amin bảo toàn.

Theo một số phương án polynucleotit hoặc axit nucleic là ADN. Theo các phương án khác, polynucleotit theo sáng chế là ARN, ví dụ, dưới dạng ARN thông tin (mARN). ARN theo sáng chế có thể là mạch đơn hoặc mạch đôi.

Phương pháp tái tổ hợp

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể thu được, ví dụ, bằng cách tổng hợp peptit ở trạng thái rắn (ví dụ, tổng hợp pha rắn Merrifield) hoặc sản xuất tái tổ hợp. Để sản xuất tái tổ hợp một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh), ví dụ, như được mô tả trên đây, được phân lập và được xen vào một hoặc nhiều vectơ để tách dòng thêm và/hoặc biểu hiện trong tế bào vật chủ. Polynucleotit này có thể dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường. Theo một phương án, vectơ, tốt hơn là vectơ biểu hiện, bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit theo sáng chế được đề xuất. Phương pháp mà đã biết rõ với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để xây dựng cấu trúc vectơ biểu hiện chứa trình tự mã hóa của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) cùng với tín hiệu kiểm soát phiên mã/dịch mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp/tái tổ hợp di truyền *in vivo*. Xem, ví dụ, các kỹ thuật được mô tả trong Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A

LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); và Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989). Vectơ biểu hiện có thể là một phần của plasmit, virut, hoặc có thể là mảnh axit nucleic. Vectơ biểu hiện bao gồm cát-xét biểu hiện mà polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) (tức là vùng mã hóa) được phân lập dòng kết hợp điều khiển được với trình tự khởi đầu và/hoặc thành phần kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã khác. Như được sử dụng trong bản mô tả, "vùng mã hóa" là một phần của axit nucleic gồm có các codon được dịch mã thành axit amin. Mặc dù "codon chặn" (TAG, TGA, hoặc TAA) không được dịch mã thành axit amin, nó có thể được coi là một phần của vùng mã hóa, nếu có, nhưng trình tự bản lề bất kỳ, ví dụ trình tự khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, gen kết thúc phiên mã, intron, vùng không được dịch mã ở đầu 5' và 3', và dạng tương tự, không phải là một phần của vùng mã hóa. Hai hoặc nhiều vùng mã hóa có thể có mặt trong cấu trúc polynucleotit đơn, ví dụ, trên vectơ đơn lẻ, hoặc trong các cấu trúc polynucleotit riêng rẽ, ví dụ, trên các vectơ riêng rẽ (khác nhau). Hơn nữa, vectơ bất kỳ có thể chứa một vùng mã hóa, hoặc có thể bao gồm hai hoặc nhiều vùng mã hóa, ví dụ, vectơ theo sáng chế có thể mã hóa một hoặc nhiều polypeptit, mà được phân lập sau dịch mã hoặc đồng dịch mã thành các protein cuối cùng thông qua việc phân tách protein phân giải. Ngoài ra, vectơ, polynucleotit, hoặc axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa các vùng mã hóa khác loại, được dung hợp hoặc không được dung hợp với polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) theo sáng chế, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của nó. Các vùng mã hóa khác loại bao gồm nhưng không giới hạn các thành phần hoặc motip được cụ thể hóa, như peptit tín hiệu kích thích bài tiết hoặc miền chức năng khác loại. Việc kết hợp điều khiển được khi vùng mã hóa đối với sản phẩm gen, ví dụ polypeptit, được kết hợp với một hoặc nhiều trình tự điều hòa theo cách để tạo sự biểu hiện của sản phẩm gen dưới sự ảnh hưởng hoặc kiểm soát của (các) trình tự điều hòa. Hai mảnh ADN (như vùng mã hóa polypeptit và trình tự khởi đầu được kết hợp với nó) "được kết hợp điều khiển được" nếu việc cảm ứng chức năng trình tự khởi đầu dẫn đến việc phiên mã mARN mã hóa sản phẩm gen mong muốn và nếu bản chất của liên kết giữa hai mảnh ADN không gây nhiễu khả năng của trình tự điều hòa biểu hiện trong việc định hướng sự biểu hiện của sản phẩm gen hoặc gây trở ngại cho khả năng của mẫu ADN được phiên mã. Do đó, vùng trình tự khởi đầu được kết hợp điều khiển được với axit

nucleic mã hóa polypeptit nếu trình tự khởi đầu có khả năng tác động đến việc phiên mã của axit nucleic này. Trình tự khởi đầu có thể là trình tự khởi đầu đặc hiệu tế bào định hướng sự phiên mã cơ bản của ADN chỉ trong tế bào được xác định trước. Các thành phần kiểm soát phiên mã khác, ngoài trình tự khởi đầu, ví dụ, trình tự tăng cường, trình tự điều khiển, trình tự kìm hãm, và tín hiệu kết thúc phiên mã, có thể được kết hợp điều khiển được với polynucleotit để định hướng sự phiên mã đặc hiệu tế bào. Trình tự khởi đầu thích hợp và các vùng kiểm soát phiên mã khác được nêu trong bản mô tả. Các vùng kiểm soát phiên mã khác nhau là đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vùng này bao gồm, nhưng không giới hạn, vùng kiểm soát phiên mã, có chức năng trong tế bào có xương sống, như, nhưng không giới hạn ở, đoạn trình tự khởi đầu và trình tự tăng cường từ cytomegalovirut (ví dụ, trình tự khởi đầu tiền sớm, kết hợp với intron-A), virut khỉ 40 (ví dụ, trình tự khởi đầu sớm), và retrovirut (như, ví dụ Virut sacom Rous). Các vùng kiểm soát sự phiên mã khác bao gồm các vùng có nguồn gốc từ các gen động vật có xương sống như actin, protein sốc nhiệt, hormon sinh trưởng ở bò và β-globin thỏ, cũng như các trình tự khác có khả năng kiểm soát sự biểu hiện gen trong tế bào nhân điển hình. Các vùng kiểm soát sự phiên mã thích hợp khác bao gồm trình tự khởi đầu và trình tự tăng cường đặc hiệu mô cũng như trình tự khởi đầu cảm ứng (ví dụ trình tự khởi đầu cảm ứng tetraxyclin). Tương tự, các thành phần kiểm soát dịch mã khác là đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thành phần này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vị trí gắn kết ribosom, condon bắt đầu dịch mã và codon kết thúc dịch mã, và các thành phần có nguồn gốc từ hệ virut (cụ thể là vị trí vào ribosom bên trong, hoặc IRES, cũng được gọi là trình tự CITE). Cát-xét biểu hiện có thể còn bao gồm các đặc tính kỹ thuật khác như gốc sao chép, và/hoặc thành phần kết hợp nhiễm sắc thể như đoạn lặp tận cùng dài retrovirut (LTR), hoặc đoạn lặp tận cùng nghịch chuyển (ITR) ở virut liên quan đến adeno (AAV).

Vùng mã hóa polynucleotit và vùng mã hóa axit nucleic theo sáng chế có thể được kết hợp với vùng mã hóa bổ sung mà mã hóa peptit kích thích bài tiết hoặc peptit tín hiệu, định hướng việc tiết polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit theo sáng chế. Ví dụ, nếu việc tiết phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được mong đợi, ADN mã hóa trình tự tín hiệu có thể được đặt ở dòng phía trên của axit nucleic mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế hoặc mảnh của nó. Theo giả thuyết tín hiệu, protein được tiết ra bởi tế bào động vật có vú có peptit

tín hiệu hoặc trình tự dẫn đầu kích thích bài tiết được phân tách từ protein trưởng thành mỗi khi việc phát ra chuỗi protein sinh trưởng ngang qua mạng lưới nội chất thô được bắt đầu. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nhận ra rằng polypeptit được tiết ra bởi tế bào có xương sống thông thường có peptit tín hiệu được dung hợp với đầu tận cùng N của polypeptit, được phân tách từ polypeptit được dịch mã để sản sinh dạng được tiết hoặc "trưởng thành" của polypeptit. Theo một số phương án, peptit tín hiệu tự nhiên, ví dụ peptit tín hiệu của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch được sử dụng, hoặc dẫn xuất chức năng của trình tự này mà giữ được khả năng định hướng sự tiết polypeptit mà được kết hợp điều khiển được với nó. Theo một cách khác, peptit tín hiệu của động vật có vú khác loại, hoặc dẫn xuất chức năng của nó, có thể được sử dụng. Ví dụ, trình tự dẫn đầu kiểu dại có thể được thay thế bằng trình tự dẫn đầu của gen hoạt hóa plasminogen mô người (TPA) hoặc β-glucuronidaza chuột nhắt.

ADN mã hóa trình tự protein ngắn mà có thể được sử dụng để tạo điều kiện cho việc tinh chế sau đó (ví dụ, thẻ histidin) hoặc hỗ trợ việc đánh dấu phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được bao gồm trong hoặc ở các đầu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) mã hóa polynucleotit.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit theo sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ bao gồm một hoặc nhiều vectơ theo sáng chế. Polynucleotit và vectơ có thể kết hợp đặc tính kỹ thuật bất kỳ, một mình hoặc kết hợp, được mô tả ở đây liên quan đến polynucleotit và vectơ, một cách tương ứng. Theo một phương án như vậy, tế bào vật chủ bao gồm (ví dụ đã được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng) vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa (một phần của) phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "tế bào vật chủ" dùng để chỉ kiểu hệ tế bào bất kỳ có thể được xử lý kỹ thuật để tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế hoặc mảnh của nó. Tế bào vật chủ thích hợp để sao chép và hỗ trợ việc biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các tế bào như vậy có thể được chuyển nhiễm hoặc được tải nạp dưới dạng thích hợp với vectơ biểu hiện cụ thể và các lượng lớn tế bào chứa vectơ có thể sinh trưởng để nuôi cấy chất gây men ở phạm vi lớn để thu được các lượng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T đủ cho các ứng

dụng lâm sàng. Các tế bào vật chủ thích hợp bao gồm vi sinh vật nhân rải rác, như E. coli, hoặc các tế bào nhân điển hình khác nhau, như tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO), tế bào côn trùng, hoặc tế bào tương tự. Ví dụ, polypeptit có thể được sản sinh trong vi khuẩn đặc biệt là khi không cần thiết phải glycosyl hóa. Sau khi biểu hiện, polypeptit có thể được phân lập từ hồ nhão chứa tế bào vi khuẩn trong đoạn hòa tan được và có thể được tinh chế thêm. Ngoài sinh vật nhân rải rác, các vi trùng nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp cho vectơ mã hóa polypeptit, bao gồm chủng nấm và nấm men có đường glycosyl hóa đã "được nhân hóa", dẫn đến việc sản sinh polypeptit có mô hình glycosyl hóa người một phần hoặc hoàn toàn. Xem Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), và Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Tế bào vật chủ thích hợp để biểu hiện polypeptit (được glycosyl hóa) cũng có nguồn gốc từ sinh vật đa bào (không xương sống và có xương sống). Các ví dụ về tế bào không xương sống bao gồm tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirut đã được nhận diện có thể được sử dụng kết hợp với tế bào côn trùng, cụ thể là để chuyển nhiễm tế bào *Spodoptera frugiperda*. Môi trường nuôi cấy tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Xem ví dụ patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để sản xuất kháng thể trong thực vật chuyển gen). Tế bào có xương sống cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, dòng tế bào động vật có vú được làm tương thích để sinh trưởng trong huyền phù có thể hữu ích. Các ví dụ khác về dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bằng SV40 (COS-7); dòng tế bào thận phôi người (tế bào 293 hoặc 293T như được mô tả, ví dụ, trong Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)), tế bào thận chuột lang con (BHK), tế bào sertoli chuột nhắt (tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), tế bào thận khỉ (CV1), tế bào thận khỉ lông xanh Châu Phi (VERO-76), tế bào canxinom cổ người (HELA), tế bào thận chó (MDCK), tế bào gan chuột cống (BRL 3A), tế bào phổi người (W138), tế bào gan người (Hep G2), tế bào u vú chuột nhắt (MMT 060562), tế bào TRI (như được mô tả, ví dụ, trong Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), tế bào MRC 5, và tế bào FS4. Các dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO), bao gồm tế bào dhfr$^-$ CHO (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); và dòng tế bào u tủy như YO, NS0, P3X63 và Sp2/0. Để có nhận xét về một số dòng tế bào vật chủ động vật có vú

thích hợp để sản sinh protein, xem, ví dụ, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), các trang 255-268 (2003). Tế bào vật chủ bao gồm tế bào được nuôi cấy, ví dụ, tế bào động vật có vú được nuôi cấy, tế bào nấm men, tế bào côn trùng, tế bào vi khuẩn và tế bào thực vật, chỉ kể tên một ít, nhưng bao gồm cả các tế bào có trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc thực vật nuôi cấy hoặc mô động vật. Theo một phương án, tế bào vật chủ là tế bào nhân điển hình, tốt hơn là tế bào động vật có vú, như tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO), tế bào thận phôi người (HEK) hoặc tế bào lymphoit (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20).

Các công nghệ tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để biểu hiện các gen ngoại lai trong các hệ này. Tế bào biểu hiện polypeptit bao gồm chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của miền gắn kết kháng nguyên như kháng thể, có thể được xử lý kỹ thuật để còn biểu hiện cả chuỗi còn lại trong các chuỗi kháng thể sao cho sản phẩm được biểu hiện là kháng thể có cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

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

Các thành phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dung hợp về mặt di truyền với nhau. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được thiết kế sao cho các thành phần của nó được dung hợp trực tiếp với nhau hoặc gián tiếp thông qua trình tự chất liên kết. Chế phẩm và độ dài chất liên kết có thể được xác định theo các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thử nghiệm về độ hiệu nghiệm. Các ví dụ về trình tự chất liên kết giữa các thành phần khác nhau của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được tìm thấy trong trình tự được đề xuất ở đây. Các trình tự bổ sung cũng có thể được bao gồm để kết hợp vị trí phân tách để tách các thành phần riêng rẽ của thể dung hợp nếu muốn, ví dụ, trình tự nhận diện endopeptidaza.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm ít nhất vùng biến đổi của kháng thể có khả năng gắn kết thể quyết định kháng nguyên. Vùng biến đổi có thể tạo ra một phần kháng thể và có nguồn gốc từ kháng thể có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên và các mảnh của nó. Phương pháp sản xuất kháng thể đa dòng và kháng thể đơn dòng là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem ví dụ Harlow and Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Kháng thể không có trong tự nhiên có thể được xây dựng cấu trúc bằng cách sử dụng kỹ thuật tổng hợp peptit pha rắn, có thể được sản xuất theo cách tái tổ hợp (ví dụ như được mô tả trong Patent Mỹ số 4,186,567) hoặc có thể thu được, ví dụ, bằng cách sàng lọc các thư viện kết hợp bao gồm chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi (xem ví dụ patent Mỹ số 5,969,108, cấp cho McCafferty).

Loài động vật bất kỳ có kháng thể, mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi có thể được sử dụng trong phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế. Các kháng thể, mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi không làm giới hạn phạm vi của sáng chế hữu ích trong sáng chế có thể có nguồn gốc từ chuột, động vật linh trưởng, hoặc người. Nếu phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dự định để sử dụng cho người, dạng kháng thể khảm có thể được sử dụng trong đó vùng hằng định của kháng thể là từ người. Dạng kháng thể được nhân hóa hoặc hoàn toàn của người cũng có thể được xây dựng theo các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem ví dụ patent Mỹ số 5,565,332 to Winter). Việc nhân hóa có thể đạt được bằng các phương pháp khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở (a) ghép CDR không phải của người (ví dụ, kháng thể cho) lên trên khung làm việc (ví dụ, kháng thể nhận) và các vùng hằng định của người có hoặc không có việc giữ các gốc khung làm việc quan trọng (ví dụ các gốc quan trọng trong việc giữ ái lực gắn kết kháng nguyên hoặc chức năng kháng thể tốt), (b) chỉ ghép vùng quyết định độ đặc hiệu không phải của người (SDR hoặc a-CDR; các gốc quan trọng trong việc tương tác kháng thể-kháng nguyên) lên trên vùng làm việc và vùng hằng định của người, hoặc (c) cấy chuyển toàn bộ miền biến đổi không phải của người, nhưng "che phủ" chúng bằng đoạn giống như của người bằng cách thay thế các gốc bề mặt. Kháng thể được nhân hóa và các phương pháp tạo ra chúng được nhận xét, ví dụ, trong Almagro and Fransson, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008), và còn được mô tả, ví dụ,

trong Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); Patent Mỹ số 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, và 7,087,409; Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Morrison et al., Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1988); Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., Methods 36, 25-34 (2005) (mô tả kỹ thuật ghép SDR (a-CDR)); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991) (mô tả kỹ thuật "làm lại bề mặt"); Dall'Acqua et al., Methods 36, 43-60 (2005) (mô tả kỹ thuật "dịch chuyển FR"); và Osbourn et al., Methods 36, 61-68 (2005) và Klimka et al., Br J Cancer 83, 252-260 (2000) (mô tả phương pháp "chọn lọc theo chỉ dẫn" để dịch chuyển FR). Kháng thể người và vùng biến đổi người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể người được mô tả chung trong van Dijk and van de Winkel, Curr Opin Pharmacol 5, 368-74 (2001) và Lonberg, Curr Opin Immunol 20, 450-459 (2008). Vùng biến đổi người có thể tạo ra một phần kháng thể và có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng người được tạo ra bằng phương pháp tế bào lai (xem ví dụ Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, các trang 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Kháng thể người và vùng biến đổi người cũng có thể được xây dựng bằng cách dùng chất kháng nguyên cho động vật chuyển gen mà đã được cải biến để tạo ra kháng thể người nguyên vẹn hoặc kháng thể nguyên vẹn có vùng biến đổi người đáp ứng thách thức kháng nguyên (xem ví dụ Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005). Kháng thể người và vùng biến đổi người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập trình tự vùng biến đổi dòng vô tính Fv được chọn từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn có nguồn gốc từ người (xem ví dụ, Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); và McCafferty et al., Nature 348, 552-554; Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)). Thể thực khuẩn thường biểu hiện các mảnh kháng thể, dưới dạng mảnh chuỗi đơn Fv (scFv) hoặc dưới dạng mảnh Fab.

Theo một số phương án, gốc gắn kết kháng nguyên hữu ích trong sáng chế được xử lý kỹ thuật để có ái lực gắn kết tăng cường theo, ví dụ, phương pháp được bộc lộ trong Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 2004/0132066, toàn bộ nội dung được kết hợp ở đây để tham khảo. Khả năng của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế trong việc gắn kết với thể quyết định kháng

nguyên đặc hiệu có thể được xác định thông qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (được phân tích trên hệ BIACORE T100) (Liljeblad, et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), và thử nghiệm gắn kết truyền thống (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để nhận biết kháng thể, mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc miền biến đổi cạnh tranh với kháng thể đối chiếu để gắn kết với kháng nguyên cụ thể, ví dụ, kháng thể cạnh tranh với kháng thể V9 để gắn kết với CD3. Theo một số phương án, kháng thể cạnh tranh này gắn kết với cùng một epitop (ví dụ epitop mạch thẳng hoặc epitop cấu hình) được gắn kết bởi kháng thể đối chiếu. Các phương pháp minh họa chi tiết để vẽ sơ đồ epitop mà kháng thể gắn kết với được đề xuất trong Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," trong Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Trong thử nghiệm cạnh tranh minh họa, kháng nguyên đã cố định (ví dụ CD3) được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất gắn kết với kháng nguyên (ví dụ kháng thể V9, được mô tả trong US 6,054,297) và kháng thể không được đánh dấu thứ hai được thử nghiệm về khả năng của nó trong việc cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết với kháng nguyên. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong phần dịch nổi trên bề mặt tế bào lai. Để làm đối chứng, kháng nguyên đã cố định được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất nhưng không có kháng thể không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ trong các điều kiện cho phép kháng thể thứ nhất gắn kết với kháng nguyên, kháng thể không được gắn kết dư thừa được loại bỏ, và lượng kháng nguyên đã cố định kết hợp với đánh dấu được đo. Nếu lượng kháng nguyên đã cố định kết hợp với đánh dấu về cơ bản là được làm giảm trong mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng, thì chỉ ra rằng kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết với kháng nguyên. Xem Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được xây dựng như được mô tả ở đây có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực như sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký trao đổi ion, điện di gel, sắc ký ái lực, sắc ký loại trừ kích cỡ, và kỹ thuật tương tự. Các điều kiện thực tế được sử dụng để tinh chế protein cụ thể sẽ phụ thuộc, một phần, vào các yếu tố như như điện tích thuần, độ kỵ nước, độ ưa nước v.v., và sẽ rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để

tinh chế bằng sắc ký ái lực, kháng thể, phối tử, thụ thể hoặc kháng nguyên có thể được sử dụng mà phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với. Ví dụ, để tinh chế bằng sắc ký ái lực phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, cơ chất gồm protein A hoặc protein G có thể được sử dụng. Sắc ký ái lực và sắc ký loại trừ kích cỡ protein theo dãy A hoặc G có thể được sử dụng để phân lập phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu như được mô tả trong các ví dụ. Độ tinh khiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được xác định bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp phân tích đã biết rõ khác nhau bao gồm điện di gel, sắc ký lỏng cao áp, và phương pháp tương tự. Ví dụ, protein dung hợp chuỗi nặng được biểu hiện như được mô tả trong các ví dụ cho thấy là nguyên vẹn và được lắp ráp chính xác như được chứng minh bằng cách làm giảm SDS-PAGE (xem ví dụ Fig.2). Ba vạch được phân giải ở khoảng Mr 25.000, Mr 50.000 và Mr 75,000, tương ứng với trọng lượng phân tử được dự đoán của chuỗi nhẹ, chuỗi nặng của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và protein dung hợp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ.

Thử nghiệm

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề xuất ở đây có thể được nhận biết, được sàng lọc, hoặc được đặc trưng cho tính chất vật lý/hóa học của chúng và/hoặc hoạt tính sinh học bằng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thử nghiệm ái lực

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

Theo một phương án, K_D được đo bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng máy BIACORE® T100 (GE Healthcare) ở nhiệt độ 25°C.

Để phân tích tương tác giữa phần Fc và thụ thể Fc, thụ thể Fc tái tổ hợp được gắn thẻ His được bắt bằng kháng thể kháng Penta His ("Penta His" được bộc lộ dưới dạng SEQ ID NO: 306) (Qiagen) được cố định trên chíp CM5 và các cấu trúc đặc hiệu kép được sử dụng làm chất phân tích. Nói một cách ngắn gọn, chíp cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hóa (CM5, GE Healthcare) được hoạt hóa bằng N-etyl-N'-(3-dimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorua (EDC) và N-hydroxysucxinimit (NHS) theo các chỉ dẫn của nhà cung cấp. Kháng thể kháng Penta-His ("Penta-His" được bộc lộ dưới dạng SEQ ID NO: 306) được pha loãng bằng natri axetat 10mM, độ pH = 5,0, đến 40µg/ml trước khi tiêm ở tốc độ chảy bằng 5µl/phút để đạt được khoảng 6500 đơn vị đáp ứng (RU) của protein ghép cặp. Sau khi tiêm phối tử, etanolamin 1M được tiêm để phong bế nhóm không phản ứng. Sau đó thụ thể Fc được bắt trong 60 giây ở 4 hoặc 10nM. Để đo động học, các phần pha loãng theo dãy bốn lần của cấu trúc đặc hiệu kép (nằm trong khoảng từ 500nM và 4000nM) được tiêm trong HBS-EP (GE Healthcare, HEPES 10mM, NaCl 150mM, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt 0,05% P20, độ pH = 7,4) ở nhiệt độ 25°C ở tốc độ chảy bằng 30µl/phút trong 120 giây.

Để xác định ái lực với kháng nguyên đích, cấu trúc đặc hiệu kép được bắt bằng kháng thể đặc hiệu kháng Fab người (GE Healthcare) mà được cố định trên bề mặt chíp cảm biến CM5 đã hoạt hóa như được mô tả cho kháng thể kháng Penta-His ("Penta-His" được bộc lộ dưới dạng SEQ ID NO: 306). Lượng cuối cùng của protein ghép cặp là khoảng 12000 RU. Cấu trúc đặc hiệu kép được bắt trong 90 giây ở 300nM. Kháng nguyên đích được cho đi qua tế bào dòng chảy trong 180 giây ở nồng độ nằm trong khoảng từ 250 đến 1000nM với tốc độ chảy bằng 30µl/phút. Sự phân ly được theo dõi trong 180 giây.

Các chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu. Đáp ứng trạng thái ổn định được sử dụng để thu được hằng số phân ly K_D bằng cách điều chỉnh phù hợp đường cong không tuyến tính của đường đẳng nhiệt gắn kết Langmuir. Tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một với một đơn giản (phần mềm đánh giá BIACORE® T100 phiên bản 1.1.1) bằng cách đồng thời điều chỉnh phù hợp

biểu đồ cảm biến kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính dưới dạng tỷ lệ k_{off}/k_{on}. Xem, ví dụ, Chen et al., J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Thử nghiệm hoạt tính

Hoạt tính sinh học của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể được đo bằng các thử nghiệm khác nhau như được mô tả trong các ví dụ. Hoạt tính sinh học có thể, ví dụ, bao gồm cảm ứng sự tăng sinh của tế bào T, cảm ứng việc truyền tín hiệu trong các tế bào T, cảm ứng việc biểu hiện chỉ thị hoạt hóa trong tế bào T, cảm ứng việc tiết xytokin bằng tế bào T, cảm ứng sự làm tan tế bào đích như tế bào khối u, và cảm ứng sự thoái hóa khối u và/hoặc cải thiện sự sống.

Chế phẩm, dược phẩm và đường dùng

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề xuất ở đây, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các các phương pháp điều trị bệnh dưới đây. Theo một phương án, dược phẩm chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề xuất ở đây và chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề xuất ở đây và ít nhất một chất điều trị bệnh bổ sung, ví dụ, như được mô tả dưới đây.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế dưới dạng thích hợp để dùng in vivo, phương pháp này bao gồm bước (a) thu được phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, và (b) phối trộn phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T với ít nhất một chất mang dược dụng, nhờ đó dược phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bào chế để dùng in vivo.

Dược phẩm theo sáng chế chứa lượng cho tác dụng điều trị bệnh của một hoặc nhiều phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được hòa tan hoặc được phân tán trong chất mang dược dụng. Cụm từ "dược lý hoặc dược dụng" dùng để chỉ phân tử dược chất và chế phẩm thường không độc đối với đối tượng nhận ở các liều lượng và nồng độ được sử dụng, tức là không tạo ra phản ứng có hại, dị ứng hoặc không mong muốn khác khi được dùng cho động vật, như, ví dụ, người, nếu thích hợp. Chế phẩm chứa dược phẩm chứa ít nhất một phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt

hóa tế bào T và tùy ý thành phần hoạt tính bổ sung là đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này theo bản mô tả, như được minh họa trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, được kết hợp ở đây để tham khảo. Hơn nữa, để dùng cho động vật (ví dụ, người), hiểu được rằng các chế phẩm này nên đáp ứng các tiêu chuẩn về độ vô trùng, độ tỏa nhiệt, độ an toàn chung và độ tinh khiết như được Cơ quan tiêu chuẩn sinh học FDA hoặc các cơ quan chức năng tương đương ở các nước khác yêu cầu. Chế phẩm được ưu tiên là dược phẩm được làm khô lạnh hoặc dung dịch trong nước. Như được sử dụng trong bản mô tả, "chất mang dược dụng" bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, dung dịch đệm, môi trường phân tán, lớp phủ, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa, chất bảo quản (ví dụ, chất kháng khuẩn, chất chống nấm), chất đẳng trương, chất làm chậm hấp thu, muối, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, protein, dược chất, chất làm ổn định dược chất, polyme, gel, chất liên kết, tá dược, chất phân rã, chất bôi trơn, chất làm ngọt, chất tạo hương vị, thuốc nhuộm, giống như vật liệu và các hỗn hợp của chúng, như đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, các trang 1289-1329, được kết hợp ở đây để tham khảo). Ngoại trừ việc tính đến thời điểm hiện tại chất mang thông thường bất kỳ không tương thích với thành phần hoạt tính, việc sử dụng nó trong chế phẩm điều trị bệnh hoặc dược phẩm được dự định.

Dược phẩm này có thể chứa các loại chất mang khác nhau phụ thuộc vào việc liệu nó được dùng ở dạng rắn, lỏng hay sol khí, và liệu nó cần vô trùng đối với các đường dùng như tiêm hay không. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế (và chất điều trị bệnh bổ sung bất kỳ) có thể được dùng trong tĩnh mạch, trong da, trong động mạch, trong bụng, trong thương tổn, trong sọ, trong khớp, trong tuyến tiền liệt, trong lách, trong thận, trong màng phổi, trong khí quản, trong mũi, trong thủy tinh thể, trong âm đạo, trong trực tràng, trong khối u, trong cơ, trong bụng, dưới da, dưới kết mạc, trong bọng nước, trong niêm mạc, trong ngoại màng tim, trong rốn, trong mắt, qua miệng, cục bộ, khu trú, bằng cách xông hít (ví dụ, xông hít sol khí), tiêm, truyền, truyền liên tục, truyền dịch khu trú nhúng các tế bào đích trực tiếp, thông qua ống thông đường tiểu, thông qua thụt rửa, trong kem, trong chế phẩm lỏng (ví dụ liposom), hoặc bằng phương pháp khác bất kỳ hoặc tổ hợp bất kỳ của các phương pháp trên đây như đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ,

Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, được kết hợp ở đây để tham khảo). Dùng ngoài đường tiêu hóa, đặc biệt là tiêm trong tĩnh mạch, được sử dụng nhiều nhất để dùng phân tử polypeptit như phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế.

Dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dược phẩm được thiết kế để dùng bằng cách tiêm, ví dụ, tiêm dưới da, trong da, trong thương tổn, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong cơ, trong tủy mạc hoặc tiêm trong bụng. Để tiêm, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể được phối trộn trong dung dịch trong nước, tốt hơn là trong dung dịch đệm tương thích về mặt sinh lý như dung dịch Hank, dung dịch Ringer, hoặc dung dịch đệm nước muối sinh lý. Dung dịch có thể chứa chất phối trộn như chất tạo huyền phù, làm ổn định và/hoặc phân tán. Theo một cách khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể ở dạng bột để xây dựng cấu trúc với chất dẫn thích hợp, ví dụ, nước không có pyrogen vô trùng, trước khi sử dụng. Dung dịch tiêm vô trùng được bào chế bằng cách kết hợp phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế với lượng được yêu cầu trong dung môi thích hợp với các thành phần khác nhau khác được liệt kê dưới đây, như được yêu cầu. Độ vô trùng có thể dễ dàng đạt được, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Thông thường, các chất phân tán được điều chế bằng cách kết hợp các thành phần hoạt tính đã vô trùng khác nhau vào chất dẫn vô trùng chứa môi trường phân tán bazơ và/hoặc các thành phần khác. Trong trường hợp bột vô trùng dùng cho chế phẩm chứa dung dịch tiêm vô trùng, huyền phù hoặc nhũ tương, các phương pháp điều chế được ưu tiên là kỹ thuật sấy chân không hoặc sấy lạnh tạo ra bột chứa thành phần hoạt tính cộng thêm thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ môi trường lỏng được lọc vô trùng từ trước của nó. Môi trường lỏng nên được đệm thích hợp nếu cần và chất pha loãng dạng lỏng trước tiên được làm cho đẳng trương trước khi tiêm bằng đủ nước muối hoặc glucoza. Dược phẩm này phải ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản, và được bảo quản chống lại tác động làm nhiễm bẩn của vi sinh vật, như vi khuẩn và nấm. Sẽ hiểu được rằng sự nhiễm bẩn nội độc tố nên được giữ ở mức tối thiểu ở mức an toàn, ví dụ, ít hơn 0,5ng/mg protein. Các chất mang dược dụng thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở: dung dịch đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexametoni clorua; benzalkoni clorua; benzetoni clorua; rượu phenol, butyl hoặc

benzyl; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc dextrin; chất chelat hóa như EDTA; đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; ion trái dấu tạo muối như natri; phức hợp kim loại (ví dụ, phức hợp Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Huyền phù tiêm trong nước có thể chứa hợp chất làm tăng độ nhớt của huyền phù, như natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, dextran, hoặc hợp chất tương tự. Tùy ý, huyền phù cũng có thể chứa chất làm ổn định thích hợp hoặc các chất làm tăng độ hòa tan của các hợp chất này để có được chế phẩm chứa dung dịch cô đặc ở mức độ cao. Ngoài ra, huyền phù chứa hợp chất hoạt tính có thể được xây dựng dưới dạng huyền phù tiêm dạng dầu thích hợp. Dung môi hoặc chất dẫn ưa mỡ thích hợp bao gồm dầu béo như dầu vừng, hoặc este của axit béo tổng hợp, như etyl cleat hoặc triglyxerit, hoặc liposom.

Các thành phần hoạt tính có thể được bẫy trong vi nang được điều chế, ví dụ, bằng kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng cách polyme hóa bề mặt chung, ví dụ, hydroxymetylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metylmetacylat), một cách tương ứng, trong hệ phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano và nang nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật này được bộc lộ trong Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Chế phẩm giải phóng duy trì có thể được xây dựng. Các ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm hỗn hợp bán thấm của polyme kỵ nước dạng rắn chứa polypeptit, hỗn hợp này là dưới dạng vật phẩm được tạo hình, ví dụ, màng, hoặc vi nang. Theo các phương án cụ thể, có thể gây ra việc hấp thu kéo dài chế phẩm tiêm do sử dụng trong các chế phẩm chứa các chất làm chậm hấp thụ, như, ví dụ, nhôm monostearat, gelatin hoặc các tổ hợp của nó.

Ngoài các dược phẩm được mô tả trên đây, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cũng có thể được phối trộn để làm chế phẩm dạng vật tư. Chế phẩm tác động lâu này có thể được dùng bằng cách cấy (ví dụ dưới da hoặc trong cơ) hoặc bằng cách tiêm trong cơ. Do đó, ví dụ, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được phối trộn với vật liệu polyme hoặc kỵ nước thích hợp (ví

dụ dưới dạng nhũ tương trong dầu có thể chấp nhận được) hoặc nhựa trao đổi ion, hoặc dưới dạng dẫn xuất tan được ít, ví dụ, dưới dạng muối tan được ít.

Dược phẩm bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể được sản xuất bằng quy trình trộn, hòa tan, nhũ hóa, bao nang, nhồi thuốc vào bao nang hoặc làm khô lạnh thông thường. Dược phẩm có thể được phối trộn theo cách thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất phụ trợ có thể chấp nhận được về mặt sinh lý tạo điều kiện thuận lợi cho việc xử lý protein thành chế phẩm mà có thể được sử dụng trong dược phẩm. Dược phẩm thích hợp phụ thuộc vào đường dùng được chọn.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được phối trộn vào dược phẩm ở dạng axit hoặc bazơ tự do, trung hòa hoặc muối. Muối dược dụng là muối hầu như giữ được hoạt tính sinh học của axit hoặc bazơ tự do. Các muối này bao gồm muối cộng axit, ví dụ, các muối làm từ nhóm amin tự do của chế phẩm chứa protein, hoặc được làm từ axit vô cơ như ví dụ, axit clohydric hoặc axit phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như axit axetic, axit oxalic, axit tartric hoặc axit mandelic. Các muối làm từ nhóm carboxyl tự do cũng có thể có nguồn gốc từ bazơ vô cơ như ví dụ, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt hydroxit; hoặc bazơ hữu cơ như isopropylamin, trimetylamin, histidin hoặc procain. Muối dược có xu hướng hòa tan nhiều hơn trong dung môi nước và các dung môi protic khác so với dạng bazơ tự do tương ứng.

Các phương pháp và chế phẩm điều trị bệnh

Phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề xuất ở đây có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị bệnh. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất điều trị miễn dịch, ví dụ, trong điều trị bệnh ung thư.

Để sử dụng trong các phương pháp điều trị bệnh, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế sẽ được phối trộn, định liều, và được dùng theo cách phù hợp với thực tiễn y học tốt. Các yếu tố để cân nhắc trong ngữ cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân rối loạn, vị trí phân phối chất, phương pháp dùng, chế độ dùng, và các yếu tố khác đã biết đối với các bác sỹ đa khoa.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế để sử dụng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế để sử dụng để điều trị bệnh. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế để sử dụng trong phương pháp điều trị. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T như được mô tả ở đây để sử dụng để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để sử dụng trong phương pháp điều trị cá thể mắc bệnh bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T. Theo một số phương án, bệnh cần được điều trị là rối loạn tăng sinh. Theo một phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của ít nhất một chất điều trị bệnh bổ sung, ví dụ, chất chống ung thư nếu bệnh cần được điều trị là bệnh ung thư. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T như được mô tả ở đây để sử dụng để cảm ứng sự làm tan của tế bào đích, đặc biệt là tế bào khối u. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để sử dụng trong phương pháp cảm ứng sự làm tan của tế bào đích, đặc biệt là tế bào khối u, ở cá thể bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để cảm ứng sự làm tan của tế bào đích. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế để sản xuất hoặc bào chế dược phẩm. Theo một phương án, dược phẩm là để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một phương án khác, dược phẩm là để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh bao gồm bước cho cá thể mắc bệnh dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của dược phẩm. Theo một số phương án, bệnh cần được điều trị là rối loạn tăng sinh. Theo một phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của ít nhất một chất điều trị bệnh bổ sung, ví dụ, chất chống ung thư nếu bệnh cần được điều trị là bệnh ung thư. Theo một phương án khác, dược phẩm là để cảm ứng sự làm tan của tế bào đích, đặc biệt là tế bào

khối u. Theo một phương án khác nữa, dược phẩm là để sử dụng trong phương pháp cảm ứng sự làm tan của tế bào đích, đặc biệt là tế bào khối u, ở cá thể bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của dược phẩm để cảm ứng sự làm tan của tế bào đích. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể mắc bệnh này dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế. Theo một phương án, dược phẩm được dùng cho cá thể này, chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế ở dạng dược dụng. Theo một số phương án, bệnh cần được điều trị là rối loạn tăng sinh. Theo một phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng cho tác dụng điều trị bệnh của ít nhất một chất điều trị bệnh bổ sung, ví dụ, chất chống ung thư nếu bệnh cần được điều trị là bệnh ung thư. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp cảm ứng sự làm tan của tế bào đích, đặc biệt là tế bào khối u. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho tế bào đích tiếp xúc với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế khi có mặt tế bào T, đặc biệt là tế bào T gây độc tế bào. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp cảm ứng sự làm tan của tế bào đích, đặc biệt là tế bào khối u, ở cá thể. Theo một phương án như vậy, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để cảm ứng sự làm tan của tế bào đích. Theo một phương án, "cá thể" là người.

Theo một số phương án, bệnh cần được điều trị là rối loạn tăng sinh, đặc biệt là bệnh ung thư. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về bệnh ung thư bao gồm bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư não, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư cổ, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư trực tràng ruột kết, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, bệnh ung thư da, bệnh ung thư tế

bào vảy, bệnh ung thư xương, và bệnh ung thư thận. Các rối loạn tăng sinh tế bào khác mà có thể được điều trị bằng cách sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở khối u nằm ở: bụng, xương, ngực, hệ tiêu hóa, gan, tuyến tụy, màng bụng, tuyến nội tiết (thượng thận, tuyến cận giáp, tuyến yên, tinh hoàn, buồng trứng, tuyến ức, tuyến giáp), mắt, đầu và cổ, hệ thần kinh (trung ương và ngoại biên), hệ bạch huyết, xương chậu, da, mô mềm, lách, vùng ngực, và hệ niệu sinh dục. Còn được bao gồm là các tình trạng tiền ung thư hoặc thương tổn và ung thư di căn. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư da, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư trực tràng ruột kết, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư não, bệnh ung thư đầu và cổ. Người có trình độ trung bình dễ dàng nhận ra rằng, trong nhiều trường hợp, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể không cung cấp cách cứu chữa mà chỉ có thể tạo ra lợi ích một phần. Theo một số phương án, thay đổi sinh lý có một số lợi ích cũng được coi là lợi ích điều trị bệnh. Do đó, theo một số phương án, lượng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T tạo ra thay đổi sinh lý được coi là "lượng hữu hiệu" hoặc "lượng cho tác dụng điều trị bệnh". Đối tượng, bệnh nhân, hoặc cá thể cần điều trị thường là động vật có vú, cụ thể hơn là người.

Theo một số phương án, lượng hữu hiệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế được dùng cho tế bào. Theo các phương án khác, lượng cho tác dụng điều trị bệnh của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế được dùng cho cá thể để điều trị bệnh.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bệnh bổ sung khác) sẽ phụ thuộc vào loại bệnh cần được điều trị, đường dùng, trọng lượng cơ thể của bệnh nhân, loại phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, độ nghiêm trọng và tiến triển của bệnh, liệu phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dùng nhằm mục đích ngăn ngừa hay điều trị bệnh, can thiệp điều trị trước đó hoặc đồng thời, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, và sự thận trọng của bác sĩ theo dõi. Bác sĩ chịu trách nhiệm về việc dùng sẽ, trong tình huống bất kỳ, xác định nồng độ của (các) thành phần hoạt tính trong dược phẩm và (các) liều lượng thích hợp cho đối tượng riêng rẽ. Các chế độ định liều khác

nhau bao gồm nhưng không giới hạn ở một hoặc nhiều lần dùng trong các thời điểm khác nhau, dùng bolus, và truyền mạch được dự định ở đây.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dùng một cách thích hợp cho bệnh nhân ở một lần hoặc hàng loạt lần điều trị. Phụ thuộc vào loại và độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng từ 1µg/kg đến 15mg/kg (ví dụ, 0,1mg/kg – 10mg/kg) của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể là liều lượng ứng viên ban đầu để dùng cho bệnh nhân, liệu, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần dùng riêng rẽ, hoặc bằng cách truyền liên tục. Một liều lượng hằng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ 1µg/kg đến 100mg/kg hoặc nhiều hơn, phụ thuộc vào các yếu tố nêu trên. Để dùng lặp lại trong một vài ngày hoặc lâu hơn, phụ thuộc vào tình trạng bệnh lý, việc điều trị thường được duy trì cho đến khi có được sự ức chế mong muốn các triệu chứng của bệnh. Một liều lượng minh họa của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là nằm trong khoảng từ 0,005mg/kg đến 10mg/kg. Trong các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế khác, liều lượng cũng có thể bao gồm từ khoảng 1microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 10microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 50microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 100microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 200microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 350microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 500microgam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 1miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 10miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 50miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 100miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 200miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 350miligam/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 500miligam/kg trọng lượng cơ thể, đến khoảng 1000mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc nhiều hơn trong mỗi lần dùng, và khoảng bất kỳ thu được trong đó. Trong các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về khoảng thu được từ các số được liệt kê ở đây, khoảng từ 5mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 100mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5microgam/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 500miligam/kg trọng lượng cơ thể, v.v., có thể được dùng, dựa trên các số được mô tả trên đây. Do đó, một hoặc nhiều liều bằng khoảng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 5,0mg/kg hoặc 10mg/kg (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng) có thể được dùng cho bệnh nhân. Liều lượng này có thể được dùng ngắt quãng, ví dụ, mỗi tuần hoặc mỗi ba tuần (ví dụ sao cho bệnh nhân nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ khoảng sáu liều phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T). Liều lượng tải nạp cao hơn ban

đầu, sau đó một hoặc nhiều liều lượng thấp hơn có thể được dùng. Tuy nhiên, các chế độ liều lượng khác có thể hữu ích. Tiến trình của liệu pháp này dễ dàng được theo dõi bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế thường được sử dụng ở lượng hữu hiệu để đạt được mục đích được dự định. Để sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, hoặc dược phẩm của nó, được dùng hoặc được áp dụng ở lượng cho tác dụng điều trị bệnh. Việc xác định lượng cho tác dụng điều trị bệnh nằm trong kiến thức của người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, đặc biệt là theo bản mô tả chi tiết được đề xuất ở đây.

Để dùng toàn thân, liều lượng cho tác dụng điều trị bệnh có thể được ước tính từ đầu từ thử nghiệm *in vitro*, như thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Sau đó liều lượng này có thể được phối trộn trong mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ tuần hoàn mà bao gồm IC_{50} như được xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào. Thông tin này có thể được sử dụng để xác định chính xác hơn các liều lượng hữu ích ở người.

Các liều ban đầu cũng có thể được tính từ các số liệu *in vivo*, *ví dụ,* các mẫu động vật, sử dụng các kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực. Người có trình độ trong lĩnh vực có thể đánh giá một cách dễ dàng việc sử dụng cho người dựa vào các số liệu ở động vật.

Lượng liều lượng và khoảng dùng có thể được điều chỉnh riêng để tạo ra mức độ huyết tương của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T mà đủ để duy trì tác dụng trị liệu. Liều dùng hữu ích cho bệnh nhân bằng cách tiêm nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50 mg/kg/ngày, thường là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1 mg/kg/ngày. Mức huyết tương hữu hiệu có tác dụng trị liệu có thể đạt được bằng cách dùng nhiều liều một ngày. Mức trong huyết tương có thể được đo, ví dụ, bằng HPLC.

Trong các trường hợp dùng tại chỗ hoặc sự hấp thu có chọn lọc, hàm lượng tại chỗ hữu hiệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể không liên quan đến hàm lượng huyết tương. Người có trình độ trong lĩnh vực sẽ có thể xác định được liều dùng tại chỗ hữu hiệu về mặt trị liệu mà không cần thử nghiệm phức tạp.

Liều hữu hiệu có tác dụng trị liệu của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được mô tả trong bản mô tả nhìn chung sẽ tạo ra lợi ích trị liệu mà không gây ra độc tố đáng kể nào. Độc tố và hiệu quả trị liệu của phân tử gắn kết kháng

nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được xác định bằng quy trình thuốc tiêu chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc các động vật thử nghiệm. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng để xác định LD_{50} (liều gây chết đến 50% nhóm thử nghiệm) và ED_{50} (liều hữu hiệu có tác dụng trị liệu cho 50% nhóm thử nghiệm). Tỷ lệ liều giữa độc tố và tác dụng trị liệu là chỉ số trị liệu, mà có thể được thể hiện dưới dạng tỷ lệ LD_{50}/ED_{50}. phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là thể hiện các chỉ số trị liệu lớn là được ưu tiên. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây thể hiện chỉ số trị liệu cao. Các số liệu thu được từ thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng trong việc tạo công thức hàng loạt liều lượng thích hợp để sử dụng ở người. Liều lượng này tốt hơn nếu nằm trong khoảng nồng độ tuần hoàn mà gồm ED_{50} có ít hoặc không có độc tố. Liều lượng này có thể biến đổi trong khoảng này phụ thuộc vào, ví dụ, dạng liều được sử dụng, đường dùng được sử dụng, tình trạng bệnh của đối tượng, và dạng tương tự. Chế phẩm, đường dùng và liều lượng chính xác có thể được chọn bởi bác sĩ khi xem xét trình trạng bệnh của bệnh nhân (ví dụ, xem, Fingl et al., 1975, trong tài liệu: The Pharmacological Basis of Therepeutics, Ch. 1, p. 1).

Bác sĩ khám bệnh cho các bệnh nhân đã được xử lý bằng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây sẽ biết như thế nào và khi nào chấm dứt, ngừng, hoặc điều chỉnh việc dùng do độc tố, loạn chức năng cơ quan, và dạng tương tự. Trái lại, bác sĩ chăm sóc cũng sẽ biết điều chỉnh điều trị đến mức cao hơn nếu phản ứng lâm sàng không thích hợp (trừ bỏ độc tính). Quy mô của liều được dùng trong việc kiểm soát rối loạn được quan tâm sẽ biến đổi theo mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh được điều trị, theo đường dùng, và dạng tương tự. Mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh ví dụ, có thể được đánh giá, một phần, bằng các phương pháp đánh giá dự đoán tiêu chuẩn. Ngoài ra, liều và có thể số lần dùng liều cũng sẽ biến đổi theo độ tuổi, thể trọng và phản ứng của từng bệnh nhân.

Các tác nhân khác và điều trị

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân khác trong việc trị liệu. Ví dụ, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được đồng áp dụng với ít nhất một chất trị liệu khác. Thuật ngữ "chất trị liệu" bao gồm tác nhân bất kỳ được dùng để điều trị triệu chứng hoặc bệnh ở cá thể cần điều trị này.

Chất trị liệu khác có thể bao gồm các thành phần hoạt tính bất kỳ thích hợp đối với chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn nếu là các thành phần với các hoạt tính bổ sung mà không có ảnh hưởng xấu đến nhau. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu khác là chất điều biến miễn dịch, chất kìm hãm tế bào, chất ức chế bám dính tế bào, chất gây độc tế bào, chất hoạt hóa gây chết tế bào theo chương trình, hoặc chất làm tăng độ nhạy của tế bào đối với chất kích thích gây chết tế bào theo chương trình. Theo phương án cụ thể, chất trị liệu khác là tác nhân kháng ung thư, ví dụ chất phá hủy vi ống, chất chống chuyển hoá, chất ức chế topoisomeraza, chất xen kẽ ADN, tác nhân alkyl hóa, trị liệu hocmon, chất ức chế kinaza, chất đối kháng thụ thể, chất hoạt hóa gây chết tế bào khối u theo chương trình, hoặc chất kháng chống hình thành mạch.

Các tác nhân khác có mặt một cách thích hợp kết hợp với lượng mà hữu hiệu cho mục đích dự định. Lượng hữu hiệu của các tác nhân khác này phụ thuộc vào lượng của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được sử dụng, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được thảo luận ở trên. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T thông thường được sử dụng với cùng liều lượng và với các đường dùng như được nêu trong bản mô tả này, hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được mô tả trong bản mô tả, hoặc với lượng bất kỳ và theo đường dùng bất kỳ mà được xác định theo kinh nghiệm/theo lâm sàng là thích hợp.

Những trị liệu kết hợp này được lưu ý ở trên bao gồm việc dùng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều chất trị liệu được bao gồm trong cùng chế phẩm hoặc các chế phẩm riêng), và dùng riêng, trong trường hợp này, việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể xuất hiện trước, đồng thời, và/hoặc sau khi dùng chất trị liệu khác và/hoặc chất phụ trợ. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây cũng có thể được sử dụng kết hợp với trị liệu bức xạ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép bao gồm a) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 274 và miền chuỗi nhẹ biến đổi của SEQ ID NO: 31; và b) vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 36 và miền chuỗi nhẹ biến đổi của SEQ ID NO: 31 để sử dụng kết hợp với kháng thể với PD-L1 hoặc FAP-4-1BBL. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép còn bao gồm vị trí gắn

kết kháng nguyên thứ ba bao gồm miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của SEQ ID NO: 274 và miền chuỗi nhẹ biến đổi của SEQ ID NO: 31.

Vật phẩm

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất vật phẩm có chứa các nguyên liệu hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn được nêu trên đây. Vật phẩm chứa thiết bị chứa và nhãn gắn hoặc hướng dẫn sử dụng lồng lên trên hoặc có liên quan đến thiết bị chứa. Thiết bị chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, các chai, lọ nhỏ, xy lanh, túi dung dịch tiêm trong tĩnh mạch, v.v. Các thiết bị chứa có thể được tạo thành từ các loại nguyên liệu như thủy tinh hoặc nhựa dẻo. Thiết bị này giữ chế phẩm bởi chính thiết bị này hoặc được kết hợp chứa chế phẩm khác hữu hiệu để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh và có thể có cổng tiếp cận vô trùng (ví dụ thiết bị chứa có thể là túi dung dịch trong tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nút chặn có thể chọc thủng bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một tác nhân hoạt tính trong chế phẩm là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây. Nhãn gắn hoặc hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lựa chọn. Ngoài ra, vật phẩm có thể bao gồm (a) thiết bị chứa thứ nhất chứa chế phẩm có chứa trong bản mô tả này, trong đó chế phẩm này chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây; và (b) thiết bị chứa thứ hai chứa chế phẩm có chứa trong thiết bị này, trong đó chế phẩm này còn chứa chất gây độc tế bào hoặc chất trị liệu khác. Vật phẩm trong phương án này của sáng chế có thể còn bao gồm hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh cụ thể. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm có thể còn bao gồm thiết bị chứa thứ hai (hoặc thứ ba) chứa chất đệm dược dụng, như nước kìm vi khuẩn để tiêm (BWFI), muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác mong muốn từ quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm chất đệm khác, các chất pha loãng, thiết bị lọc, kim tiêm, và xy lanh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là ví dụ về các phương pháp và chế phẩm được bộc lộ ở đây. Cần hiểu rằng các phương án khác khác nhau có thể được thực hành, phần mô tả chung được đưa nêu được ra ở trên.

Các phương pháp chung

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các phương pháp tiêu chuẩn được sử dụng để nắn ADN như được mô tả trong Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Chất thử nghiệm sinh phân tử được sử dụng theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Thông tin chung về trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng globulin miễn dịch người được nêu trong: Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242.

Giải trình tự ADN

Các trình tự ADN được xác định bằng cách giải trình tự dải kép tiêu chuẩn ở Synergene (Schlieren).

Tổng hợp gen

Các đoạn gen mong muốn khi cần được tạo ra bằng PCR sử dụng các mẫu thích hợp hoặc được tổng hợp bằng Geneart AG (Regensburg, Đức) từ oligonucleotit tổng hợp và sản phẩm PCR bằng cách tổng hợp gen tự động. Trong trường hợp không có sẵn trình tự gen chính xác, đoạn mồi oligonucleotit được thiết kế dựa trên các trình tự từ các gen đồng đẳng gần nhất và các gen được phân lập bằng RT-PCR từ ARN có nguồn gốc từ mô thích hợp. Các đoạn gen được đặt ở bên sườn bởi các vị trí phân tách endonucleaza giới hạn đơn lẻ được phân lập dòng vào vectơ tách dòng/giải trình tự tiêu chuẩn. ADN plasmit được tinh chế từ vi khuẩn được biến nạp và nồng độ được xác định bằng phổ UV. Trình tự ADN của các mảnh gen được phân lập dòng phụ được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Đoạn gen được thiết kế có vị trí giới hạn thích hợp để cho phép tách dòng phụ thành các vectơ biểu hiện tương ứng. Tất cả các cấu trúc được thiết kế có trình tự ADN ở đầu 5' mã hóa peptit dẫn đầu hướng đích protein để tiết ra trong tế bào nhân điển hình.

Phân lập tế bào T bao gồm toàn bộ ban đầu ở người từ PBMC

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque từ chế phẩm tế bào lympho được làm giàu (lớp hồng cầu) thu được từ ngân hàng máu địa phương hoặc từ máu sạch từ người hiến khỏe mạnh. Nói một cách ngắn gọn, máu được pha loãng bằng PBS vô trùng và được đặt cẩn thận trên gradien Histopaque (Sigma, H8889). Sau khi ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 4500 m/s^2 ở nhiệt độ

trong phòng (thiết bị hãm được tắt), phần huyết tương trên PBMC chứa kỳ nghỉ phân bào được loại bỏ. PBMC được chuyển vào ống Falcon 50ml mới và các ống được làm đầy PBS đến tổng thể tích bằng 50ml. Hỗn hợp được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút ở tốc độ 4000 m/s^2 (thiết bị hãm được bật). Phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và viên PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô trùng (các bước ly tâm ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút ở tốc độ 3500 m/s^2). Tập hợp PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và được bảo quản trong môi trường RPMI1640, chứa FCS 10% và L-alanyl-L-glutamin 1% (Biochrom, K0302) ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong thiết bị ủ cho đến khi bắt đầu thử nghiệm.

Việc làm giàu tế bào T từ PBMC được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit phân lập tế bào T sàng lọc II (Pan T Cell Isolation Kit II) (Miltenyi Biotec #130-091-156), theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Nói một cách ngắn gọn, các viên tế bào được pha loãng trong 40µl dung dịch đệm lạnh cho 10 triệu tế bào (PBS với BSA 0,5%, EDTA 2mM, được lọc vô trùng) và được ủ với 10µl hỗn hợp Biotin-kháng thể trong mỗi 10 triệu tế bào trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C. 30µl dung dịch đệm lạnh và 20µl hạt từ tính kháng biotin trong mỗi 10 triệu tế bào được bổ sung vào, và hỗn hợp được ủ trong 15 phút nữa ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa bằng cách bổ sung 10-20 lần thể tích hiện có và bước ly tâm tiếp đó ở 3000 m/s^2 trong 10 phút. Lên đến 100 triệu tế bào được tái tạo huyền phù trong 500µl dung dịch đệm. Việc tách từ tính tế bào T sàng lọc ở người chưa được đánh dấu được thực hiện bằng cách sử dụng các cột LS (Miltenyi Biotec #130-042-401) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Tập hợp tế bào T thu được được đếm tự động (ViCell) và được bảo quản trong môi trường AIM-V ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong thiết bị ủ cho đến khi bắt đầu thử nghiệm (không quá 24 giờ).

Phân lập tế bào T tự nhiên ban đầu ở người từ PBMC

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque từ chế phẩm tế bào lympho đã được làm giàu (lớp hồng cầu) thu được từ ngân hàng máu địa phương hoặc từ máu sạch từ người hiến khỏe mạnh. Việc làm giàu tế bào T từ PBMC được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit phân lập tế bào T CD8+ tự nhiên của Miltenyi Biotec (#130-093-244), theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất, nhưng bỏ qua bước phân lập cuối cùng của tế bào T CD8+ (cũng xem phần mô tả về việc phân lập tế bào T bao gồm toàn bộ ban đầu ở người).

Phân lập tế bào T sàng lọc ở chuột từ tế bào lách

Lá lách được phân lập từ chuột nhắt C57BL/6, được chuyển vào ống C GentleMACS (Miltenyi Biotech #130-093-237) chứa dung dịch đệm MACS (PBS + BSA 0,5% + EDTA 2mM) và được tách ra bằng thiết bị phân tách GentleMACS để thu được huyền phù tế bào đơn theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Huyền phù tế bào được cho đi qua thiết bị lọc tách sơ bộ để loại bỏ các hạt mô không phân ly còn lại. Sau khi ly tâm ở tốc độ 4000 m/s^2 trong 4 phút ở nhiệt độ 4°C, chất đệm phân giải ACK được bổ sung vào để làm tan tế bào hồng cầu (ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng). Các tế bào còn lại được rửa bằng dung dịch đệm MACS hai lần, được đếm và được sử dụng để phân lập tế bào T sàng lọc ở chuột. Việc chọn lọc (từ tính) âm được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit phân lập tế bào T sàng lọc của Miltenyi Biotec (#130-090-861), theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Tập hợp tế bào T thu được được đếm tự động (ViCell) và được sử dụng ngay cho các thử nghiệm khác.

Phân lập các PBMC ở khỉ đầu chó ban đầu từ máu được heparin hóa

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ từ máu sạch từ đối tượng cho ở khỉ đầu chó khỏe mạnh như sau: máu được heparin hóa được pha loãng theo tỷ lệ 1:3 bằng PBS vô trùng, và môi trường Lymphoprep (Axon Lab #1114545) được pha loãng đến 90% bằng PBS vô trùng. Hai thể tích máu đã pha loãng được tạo lớp trên một thể tích gradien mật độ đã pha loãng và đoạn PBMC được phân lập bằng cách ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 5200 m/s^2, không có thiết bị hãm, ở nhiệt độ trong phòng. Vạch PBMC được chuyển vào ống Falcon sạch dung tích 50ml và được rửa bằng PBS vô trùng bằng cách ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 4000 m/s^2 ở nhiệt độ 4°C. Một lần ly tâm tốc độ thấp được thực hiện để loại bỏ tiểu cầu (15 phút ở tốc độ 1500 m/s^2, 4°C), và tập hợp PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và được sử dụng ngay cho các thử nghiệm khác.

Ví dụ 1

Tinh chế thể dung hợp Fc-thụ thể folat được biotinyl hóa

Để tạo ra kháng thể mới kháng FolR1 ở người, các kháng nguyên và công cụ sàng lọc sau được tạo ra dưới dạng protein dung hợp Fc hóa trị một (miền ngoại bào của kháng nguyên được liên kết với vùng bản lề của phần phình Fc mà được đồng biểu hiện với phân tử phần lõm Fc). Các gen kháng nguyên được tổng hợp (Geneart, Regensburg, Đức)

dựa trên các trình tự thu được từ GenBank hoặc SwissProt và được xen vào vectơ biểu hiện để tạo ra protein dung hợp với phần phình Fc có thẻ Avi đầu tận cùng C để biotinyl hóa in vivo hoặc *in vitro*. Việc biotinyl hóa đạt được *in vivo* bằng cách đồng biểu hiện gen birA vi khuẩn mã hóa biotin ligaza vi khuẩn trong khi sản xuất. Việc biểu hiện tất cả các gen là dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu MPSV khảm trên plasmit chứa thành phần oriP để duy trì ổn định plasmit trong EBNA chứa dòng tế bào.

Đối với chế phẩm chứa phân tử dung hợp Fc/kháng nguyên monome được biotinyl hóa, tế bào HEK293 EBNA dạng huyền phù sinh trưởng theo số mũ được đồng chuyển nhiễm với ba vectơ mã hóa hai thành phần của protein dung hợp (chuỗi phần phình và phần lõm) cũng như BirA, enzym cần thiết cho phản ứng biotinyl hóa. Vectơ tương ứng được sử dụng ở tỷ lệ 9,5 : 9,5 : 1 ("kháng nguyên ECD- phần phình Fc –thẻ avi" : "phần lõm Fc" : "BirA").

Để sản xuất protein trong bình lắc dung tích 500ml, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 210 m/s^2, và phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Vectơ biểu hiện được tái tạo huyền phù trong 20mL môi trường CD CHO chứa 200µg vectơ ADN. Sau khi bổ sung 540µl polyetylenimin (PEI), dung dịch này được trộn trong 15 giây và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường CO_2 5%. Sau khi ủ, bổ sung 160mL môi trường F17 và các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, bổ sung axit valproic 1mM và Feed 1 7% (Lonza) vào môi trường nuôi cấy. Môi trường sản xuất cũng được bổ sung 100µM biotin. Sau 7 ngày nuôi cấy, phần dịch nổi trên bề mặt tế bào được gom bằng cách ly tâm các tế bào trong 15 phút ở tốc độ 210 m/s^2. Dung dịch này được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22µM), được bổ sung natri azit đến nồng độ cuối cùng bằng 0,01 % (trọng lượng/thể tích), và được giữ ở nhiệt độ 4°C.

Protein đã tiết ra được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực sử dụng Protein A, sau đó là sắc ký loại trừ kích cỡ. Để sắc ký ái lực, phần dịch nổi trên bề mặt được nạp lên trên cột HiTrap ProteinA HP (CV = 5mL, GE Healthcare) được cân bằng với 40mL natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM độ pH = 7,5. Protein không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa bằng ít nhất 10 thể tích cột của

natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM độ pH = 7,5. Protein được gắn kết được rửa giải bằng cách sử dụng gradien pH tuyến tính được tạo ra trên 20 thể tích cột của natri xitrat 20mM, natri clorua 100mM, glyxin 100mM, độ pH = 3,0. Cột này sau đó được rửa bằng 10 thể tích cột của natri xitrat 20mM, natri clorua 100mM, glyxin 100mM, độ pH = 3,0.

Độ pH của các phần được gom được điều chỉnh bằng cách bổ sung 1/10 (thể tích/thể tích) natri phosphat 0,5M, độ pH = 8,0. Protein được cô và được lọc trước khi nạp lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) được cân bằng với histidin 20mM, natri clorua 140mM, độ pH = 6,0.

Hàm lượng protein được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280nm, sử dụng hệ số tắt phân tử được tính trên cơ sở của trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của thể dung hợp FolR1-Fc được phân tích bằng điện di mao dẫn SDS khi có và không có chất khử theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (công cụ Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Thành phần kết tụ của các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng cột phân tích loại trừ kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) được cân bằng trong K_2HPO_4 25mM, NaCl 125mM, L-arginin monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02 % (trọng lượng/thể tích), độ pH = 6,7 dung dịch chạy ở nhiệt độ 25°C.

Protein dung hợp Fc-kháng nguyên được tinh chế được phân tích bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng các kháng thể có thể mua được trên thị trường để xác nhận cấu hình chính xác và cấu hình tự nhiên của kháng nguyên (dữ liệu không được thể hiện).

Bảng 1: Kháng nguyên được sản xuất để phân lập, chọn lọc và chọn lọc ngược kháng thể FolR1 ở người

Kháng nguyên	ECD (aa)	Số gia nhập	Trình tự	Seq ID No
FolR1 ở người	25 - 234	P15328	RIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPE DKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEAHK DVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQ DTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKER VLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKS NWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFH FYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGS GRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAA M	227
FolR2 ở người	17 - 230	P14207	TMCSAQDRTDLLNVCMDAKHHKTKP GPEDKLHDQCSPWKKNACCTASTSQE	228

			LHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPACKR HFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVNQSWR KERFLDVPLCKEDCQRWWEDCHTSHT CKSNWHRGWDWTSGVNKCPAGALCR TFESYFPTPAALCEGLWSHSYKVSNYS RGSGRCIQMWFDSAQGNPNEEVARFY AAAMHVN	
FolR3 ở người	24 - 243	P41439	SARARTDLLNVCMNAKHHKTQPSPED ELYGQCSPWKKNACCTASTSQELHKD TSRLYNFNWDHCGKMEPTCKRHFIQD SCLYECSPNLGPWIRQVNQSWRKERIL NVPLCKEDCERWWEDCRTSYTCKSN WHKGWNWTSGINECPAGALCSTFESY FPTPAALCEGLWSHSFKVSNYSRGSGR CIQMWFDSAQGNPNEEVAKFYAAAM NAGAPSRGIIDS	229
FolR1 ở chuột	25 - 232	P35846	TRARTELLNVCMDAKHHKEKPGPEDN LHDQCSPWKTNSCCSTNTSQEAHKDIS YLYRFNWNHCGTMTSECKRHFIQDTC LYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERILDV PLCKEDCQQWWEDCQSSFTCKSNWH KGWNWSSGHNECPVGASCHPFTFYFP TSAALCEEIWSHSYKLSNYSRGSGRCIQ MWFDPAQGNPNEEVARFYAEAMS	230
FolR1 ở khỉ đầu chó	25 - 234	G7PR14	EAQTRTARARTELLNVCMNAKHHKEK PGPEDKLHEQCRPWKKNACCSTNTSQ EAHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACK RHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSW RKERVLNVPLCKEDCERWWEDCRTSY CKSNWHKGWNWTSGFNKCPVGAACQ PFHFYFPTPTVLCNEIWTYSYKVSNYSR GSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYA AAMS	231

Bảng 2: Tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của thể dung hợp FolR- Fc.

Kháng nguyên	Monome [%] (SEC)	Hiệu suất
huFolR1	100	30 mg/L
cyFolR1	100	32 mg/L
muFolR1	100	31 mg/L
huFolR2	100	16 mg/L
huFolR3	95	38 mg/L

Ví dụ 2

Tạo ra chuỗi nhẹ chung với độ đặc hiệu CD3ε

Phân tử đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được mô tả ở đây bao gồm ít nhất một gốc gắn kết CD3. Gốc này có thể được tạo ra bằng cách miễn dịch hóa động vật thí nghiệm, sàng lọc thư viện thể thực khuẩn hoặc sử dụng các kháng thể kháng CD3 đã biết. Chuỗi nhẹ chung có độ đặc hiệu CD3ε được tạo ra bằng cách nhân hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD3ε gốc của chuột (CH2527). Để nhân hóa kháng thể có nguồn gốc không phải người, gốc CDR từ kháng thể không phải của người (đối tượng cho) phải được cấy chuyển lên trên khung làm việc của kháng thể người (đối tượng nhận). Thông thường, trình tự khung làm việc của đối tượng nhận được chọn lọc bằng cách sắp xếp trình tự của đối tượng cho với tập hợp trình tự đối tượng nhận tiềm ẩn và chọn lựa một trình tự có độ tương đồng hợp lý với đối tượng cho, hoặc thể hiện các axit amin tương tự ở một số vị trí quan trọng đối với cấu trúc và hoạt tính. Trong trường hợp này, việc tìm kiếm khung làm việc của đối tượng nhận của kháng thể được thực hiện bằng cách sắp xếp trình tự miền VL của chuột nhất của kháng thể gốc với tập hợp trình tự dòng mầm của người và chọn lựa trình tự người thể hiện độ đồng nhất trình tự cao. Ngạc nhiên là, việc kết hợp tốt theo độ tương đồng trình tự khung làm việc được phát hiện trong chuỗi nhẹ người khá hiếm xuất hiện thuộc họ miền V 7 kiểu lambda, chính xác hơn là, hVL_7_46 (danh pháp IMGT, số gia nhập GenBank Z73674). Chuỗi nhẹ người ít xuất hiện này sau đó được chọn làm khung làm việc đối tượng nhận để nhân hóa chuỗi nhẹ của CH2527. Ba vùng quyết định thể bổ sung (CDR) của miền biến đổi chuỗi nhẹ chuột nhất được ghép lên trên khung làm việc đối tượng nhận này. Do vùng khung làm việc 4 không phải là một phần của vùng biến đổi của gen V dòng mầm, việc sắp xếp vùng này (thành phần J) được tiến hành riêng rẽ. Do đó, trình tự IGLJ3-02 được chọn để nhân hóa chuỗi nhẹ này.

Mười ba biến thể được nhân hóa được tạo ra (CH2527-VL7_46-1 đến VL7_46-10, VL7_46-12 đến VL7_46-14). Các biến thể này khác nhau ở các gốc khung làm việc (và các hỗn hợp của chúng) được đột biến ngược thành trình tự miền V của chuột hoặc trong các gốc CDR (định nghĩa Kabat) có thể được duy trì giống với trình tự dòng mầm của người. Gốc khung làm việc sau bên ngoài CDR được đột biến ngược thành các gốc của chuột trong biến thể miền VL được nhân hóa cuối cùng VL7_46-13 (các gốc của chuột được liệt kê): V36, E38, F44, G46, G49, và G57, một cách tương ứng. Thành phần J người IGLJ3-02 giống nhau 100% với thành phần J của kháng thể gốc của chuột.

Ví dụ 3

Đánh giá SPR của biến thể được nhân hóa có độ đặc hiệu CD3ε

Biến thể VL được nhân hóa được đánh giá dưới dạng thể khảm trong mô hình cổ điển 2+1 (Fig.1D), tức là miền V chuỗi nhẹ được nhân hóa được ghép cặp với miền V chuỗi nặng của chuột. Đánh giá SPR được thực hiện trên công cụ ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Chính xác hơn là, các biến thể này được bắt trực tiếp từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy trên chíp cảm biến GLM thu được từ kháng Fab (IgG ở dê kháng người , mảnh F(ab')2 đặc hiệu, Jackson ImmunoResearch) theo hướng thẳng đứng. Các chất phân tích sau tiếp đó được tiêm theo chiều ngang dưới dạng các nồng độ đơn lẻ để đánh giá khả năng gắn kết với CD3ε ở người và ở khỉ đầu chó: 3μM hu CD3ε(-1-26)-Fc(phần phình)-avi (ID807) và 2,5μM cy CD3ε-(-1-26)-Fc(phần phình)-Avi-Fc(phần lõm) (ID873), một cách tương ứng. Các đáp ứng gắn kết được so sánh về mặt chất lượng với khả năng gắn kết của cấu trúc đối chứng ở chuột và được xếp hạng + (gắn kết tương đương quan sát được), +/- (gắn kết giảm quan sát được) và – (không có gắn kết quan sát được). Kháng thể bắt được tái tạo sau mỗi chu kỳ bắt phối tử và gắn kết chất phân tích và cấu trúc của chuột được tiêm lại ở cuối thử nghiệm để xác nhận hoạt tính của bề mặt bắt. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 3.

Biến thể VL được nhân	Gắn kết với CD3ε
Chuột_CH2527-VL	+
CH2527-VL7_46-1	-
CH2527-VL7_46-2	-
CH2527-VL7_46-3	-
CH2527-VL7_46-4	-
CH2527-VL7_46-5	-
CH2527-VL7_46-6	-
CH2527-VL7_46-7	-
CH2527-VL7_46-8	-
CH2527-VL7_46-9	-
CH2527-VL7_46-10	-
CH2527-VL7_46-12	+/-
CH2527-VL7_46-13	**+**
CH2527-VL7_46-14	-

Bảng 3 Đánh giá gắn kết định tính dựa trên SPR đối với biến thể chuỗi nhẹ được nhân hóa kết hợp với chuỗi nặng ở chuột của CH2527. Chỉ có biến thể chuỗi nhẹ được nhân hóa được chọn cuối cùng, CH2527-VL7_46-13, được nhấn mạnh bằng các ký tự in đậm, biểu hiện khả năng gắn kết tương đương với CD3ε ở người và ở khỉ đầu chó.

Ví dụ 4

Các tính chất của chuỗi nhẹ chung được nhân hóa có độ đặc hiệu CD3ε

Biến thể miền V chuỗi nhẹ được chọn cho phân tử dẫn đầu được nhân hóa là VL7_46-13. Mức độ nhân hóa, tức là độ tương đồng trình tự của miền V được nhân hóa với trình tự miền V dòng mầm người được xác định. Đối với VL7_46-13, tổng thể độ đồng nhất trình tự với thể tương đồng dòng mầm người gần nhất bằng 65% trước khi nhân hóa và bằng 80% sau khi nhân hóa. Bỏ qua vùng CDR, đồng nhất trình tự bằng 92% so với thể tương đồng dòng mầm người gần nhất. Như có thể được thấy trong Bảng 3, VL7_46-13 là biến thể VL được nhân hóa duy nhất ngoài bảng 13 biến thể cho thấy khả năng gắn kết tương đương với kháng thể chuột gốc và cũng giữ được độ phản ứng chéo của nó với CD3ε đầu chó. Kết quả này chỉ ra rằng không quan trọng khi nhân hóa miền VL của chuột mà không làm mất ái lực gắn kết với CD3ε mà yêu cầu một vài đột biến ngược với gốc khung làm việc ở chuột (đặc biệt là G46) trong khi giữ được G24 trong CDR1. Ngoài ra, kết quả này cho thấy rằng miền VL đóng vai trò thiết yếu trong việc nhận diện đích. Quan trọng là, miền VL được nhân hóa VL7_46-13 dựa trên dòng mầm người ít xuất hiện thuộc họ miền V 7 kiểu lambda và giữ được ái lực và độ đặc hiệu đối với CD3ε, cũng thích hợp để sử dụng làm chuỗi nhẹ chung trong thư viện kháng thể biểu hiện thể thực khuẩn của mô hình Fab và có thể chọn lọc thành công các độ đặc hiệu mới tạo điều kiện lớn cho việc tạo và sản xuất phân tử đặc hiệu kép gắn kết với CD3ε và ví dụ đích khối u và chia sẻ chuỗi nhẹ 'chung' giống nhau.

Ví dụ 5

Tạo ra thư viện kháng thể biểu hiện thể thực khuẩn bằng cách sử dụng chuỗi nhẹ chung dòng mầm người có nguồn gốc từ HVK1-39

Một vài phương pháp để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép giống với IgG người có độ dài đầy đủ bằng cách sử dụng các cải biến trong vùng Fc mà cảm ứng sự heterodime hóa của hai chuỗi nặng riêng biệt. Các ví dụ bao gồm công nghệ phần phình thành phần lõm (Merchant et al., Nat Biotechnol. 1998 Jul;16(7):677-81) SEED (Davis et al., Protein Eng

Des Sel. 2010 Apr;23(4):195-202) và dẫn tĩnh điện (Gunasekaran et al., J Biol Chem. 2010 Jun 18;285(25):19637-46). Mặc dù các phương pháp này thúc đẩy sự heterodime hóa hiệu quả của hai chuỗi nặng riêng biệt, việc ghép cặp thích hợp chuỗi nhẹ và chuỗi nặng cùng nguồn vẫn là một vấn đề. Việc sử dụng chuỗi nhẹ chung (LC) có thể giải quyết vấn đề này (Merchant, et al. Nat Biotech 16, 677–681 (1998)).

Ở đây, các tác giả sáng chế mô tả việc tạo ra thư viện kháng thể để biểu hiện trên thể thực khuẩn M13. Chủ yếu, các tác giả sáng chế thiết kế thư viện nhiều khung làm việc cho chuỗi nặng với một chuỗi nhẹ hằng định (hoặc "chung"). Thư viện này được thiết kế để tạo ra kháng thể nhiều đặc hiệu mà không cần sử dụng các công nghệ tinh vi để tránh sự ghép cặp không chính xác chuỗi nhẹ.

Bằng cách sử dụng chuỗi nhẹ chung, việc sản xuất các phân tử này có thể được tạo điều kiện do không có sự ghép cặp không chính xác nào xuất hiện nữa và việc phân lập kháng thể đặc hiệu kép tinh khiết ở mức độ cao được tạo điều kiện. So với các mô hình khác, việc sử dụng mảnh Fab làm khối xây dựng đối lập với, ví dụ, việc sử dụng mảnh scFv dẫn đến độ ổn định nhiệt cao hơn và thiếu kết tụ scFv và hình thành scFv giữa các phân tử.

Tạo thư viện

Sau đây việc tạo ra thư viện kháng thể để biểu hiện trên thể thực khuẩn M13 được mô tả. Chủ yếu, các tác giả sáng chế thiết kế thư viện nhiều khung làm việc cho chuỗi nặng có một chuỗi nhẹ hằng định (hoặc "chung").

Các tác giả sáng chế sử dụng các chuỗi nặng này trong thư viện (Số gia nhập GenBank trong ngoặc đơn):

IGHV1-46*01 (X92343) (SEQ ID NO:104),

IGHV1-69*06 (L22583), (SEQ ID NO:105)

IGHV3-15*01 (X92216), (SEQ ID NO:106)

IGHV3-23*01 (M99660), (SEQ ID NO:107)

IGHV4-59*01 (AB019438), (SEQ ID NO:108)

IGHV5-51*01 (M99686), (SEQ ID NO:109)

Tất cả các chuỗi nặng sử dụng IGHJ2 làm thành phần J, ngoại trừ IGHV1-69*06 sử dụng trình tự IGHJ6. Thiết kế ngẫu nhiên hóa bao gồm CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3. Đối với CDR-H1 và CDR-H2, chiến lược ngẫu nhiên hóa "mềm" được chọn, và việc ngẫu nhiên hóa oligonucleotit là sao cho codon đối với axit amin của trình tự dòng mầm có mặt với lượng 50%. Tất cả các axit amin khác, ngoại trừ xystein, tổng hợp cho 50% còn lại. Trong CDR-H3, không có mặt axit amin dòng mầm do sự có mặt của thành phần D di truyền, oligonucleotit được thiết kế cho phép sử dụng các biến thể xen vào ngẫu nhiên giữa thành phần V và thành phần J có chiều dài 4 đến 9 axit amin. Các oligonucleotit này được chứa trong phần được ngẫu nhiên hóa của chúng chẳng hạn. Ba axit amin G/Y/S, mỗi axit có mặt đến 15%, các axit amin A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E mỗi axit có mặt đến 4,6%.

Các phương pháp minh họa để tạo ra thư viện kháng thể được mô tả trong Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 1991, 19, 4133–413; Lee et., al J. Mol. Biol. (2004) 340, 1073–1093.

Chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ trình tự người hVK1-39, và được sử dụng theo cách không cải biến và không ngẫu nhiên hóa. Điều này đảm bảo rằng cùng một chuỗi nhẹ có thể được sử dụng cho các dự án khác mà không cần cải biến bổ sung.

Chọn lọc thư viện minh họa:

Việc chọn lọc tất cả các thư viện trưởng thành ái lực được thực hiện trong dung dịch theo quy trình sau sử dụng miền ngoại bào monome và được biotinyl hóa của kháng nguyên đích X.

1. 10^12 hạt phagemit của mỗi thư viện được gắn kết với kháng nguyên hòa tan được biotinyl hóa 100nM trong 0,5 giờ với tổng thể tích bằng 1ml. 2. Kháng nguyên được biotinyl hóa được bắt và đặc biệt là các hạt thể thực khuẩn gắn kết được phân lập bằng cách bổ sung ~5 × 10^7 hạt từ tính phủ streptavidin trong 10 phút. 3. Các hạt này được rửa bằng cách sử dụng 5-10x 1ml PBS/Tween20 và 5-10x 1ml PBS. 4. Tiến hành rửa giải hạt thể thực khuẩn bằng cách bổ sung 1ml TEA 100mM (trietylamin) trong 10 phút và trung hòa bằng cách bổ sung 500ul Tris 1M/HCl độ pH = 7,4 và 5. Sự nhiễm lại của vi khuẩn E. coli TG1 sinh trưởng theo số mũ, nhiễm thể thực khuẩn trợ giúp VCSM13 và sau đó là kết tủa PEG/NaCl của các hạt phagemit được áp dụng trong vòng chọn lọc tiếp theo. Việc chọn lọc được thực hiện trong 3 đến 5 vòng sử dụng nồng độ

kháng nguyên cố định hoặc giảm (từ 10^-7M đến 2x10^-9M). Trong vòng 2, việc bắt phức hợp kháng nguyên/thể thực khuẩn được thực hiện bằng cách sử dụng các đĩa neutravidin thay vì hạt streptavidin. Tất cả các phản ứng gắn kết được bổ sung albumin huyết thanh bò 100nM, hoặc bột sữa không béo để cạnh tranh với các dòng vô tính không mong muốn bắt nguồn từ việc gắn kết dính theo đoạn các kháng thể với giá đỡ dẻo.

Việc chọn lọc được thực hiện trong ba hoặc bốn vòng bằng cách sử dụng nồng độ kháng nguyên giảm của kháng nguyên bắt đầu từ 100nM và giảm xuống đến 5nM trong vòng chọn lọc cuối cùng. Các chất gắn kết đặc hiệu được xác định là tín hiệu khoảng 5 × cao hơn so với cơ sở và được nhận biết bằng ELISA. Chất gắn kết đặc hiệu được nhận biết bằng ELISA như sau: 100µl kháng nguyên được biotinyl hóa 10nM trong mỗi giếng được phủ trên đĩa neutravidin. Phần dịch nổi trên bề mặt vi khuẩn chứa Fab được bổ sung và các Fab gắn kết được phát hiện thông qua thẻ Flag của chúng bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng Flag/HRP. Dòng vô tính dương ELISA được biểu hiện trong vi khuẩn dưới dạng mảnh Fab tan được trong mô hình 96 giếng và phần dịch nổi trên bề mặt được chuyển vào thử nghiệm sàng lọc động học bằng phân tích SPR sử dụng ProteOn XPR36 (BioRad). Các dòng vô tính biểu hiện Fab với hằng số ái lực cao nhất được nhận biết và các phagemit tương ứng được giải trình tự. Để đặc trưng thêm, trình tự Fab được khuếch đại thông qua PCR từ phagemit và được phân lập dòng thông qua vị trí giới hạn thích hợp thành vectơ biểu hiện IgG1 người để tạo ra động vật có vú.

Tạo ra thư viện kháng thể biểu hiện thể thực khuẩn sử dụng chuỗi nhẹ chung đặc hiệu CD3ε được nhân hóa

Ở đây, việc tạo ra thư viện kháng thể để biểu hiện trên thể thực khuẩn M13 được mô tả. Chủ yếu, các tác giả sáng chế thiết kế thư viện nhiều khung làm việc cho chuỗi nặng có một chuỗi nhẹ hằng định (hoặc "chung"). Thư viện này được thiết kế để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép bất hoạt chứa Fc, nhưng gắn kết với FcgR của isotyp IgG1 P329G LALA hoặc IgG4 SPLE PG trong đó một hoặc hai Fab nhân diện kháng nguyên bề mặt khối u được biểu hiện trên tế bào khối u trong khi đó nhánh Fab còn lại của kháng thể nhận diện CD3e trên tế bào T.

Tạo thư viện

Sau đây, việc tạo ra thư viện kháng thể để biểu hiện trên thể thực khuẩn M13 được mô tả. Chủ yếu, các tác giả sáng chế thiết kế thư viện nhiều khung làm việc cho chuỗi

nặng có một chuỗi nhẹ hằng định (hoặc "chung"). Thư viện này được thiết kế một mình để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép tế bào T bất hoạt chứa Fc, nhưng gắn kết với FcgR của isotyp IgG1 P329G LALA hoặc IgG4 SPLE PG.

Tính đa dạng được chuyển vào thông qua việc ngẫu nhiên hóa oligonucleotit chỉ trong CDR3 của các chuỗi nặng khác nhau. Các phương pháp tạo ra thư viện kháng thể là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong (Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 1991, 19, 4133–413; hoặc trong: Lee et., al J. Mol. Biol. (2004) 340, 1073–1093).

Các tác giả sáng chế sử dụng các chuỗi nặng này trong thư viện:

IGHV1-46*01 (X92343), (SEQ ID NO:104)

IGHV1-69*06 (L22583), (SEQ ID NO:105)

IGHV3-15*01 (X92216), (SEQ ID NO:106)

IGHV3-23*01 (M99660), (SEQ ID NO:107)

IGHV4-59*01 (AB019438), (SEQ ID NO:108)

IGHV5-51*01 (M99686), (SEQ ID NO:109)

Các tác giả sáng chế sử dụng chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ kháng thể đặc hiệu CD3ε ở người và ở khỉ đầu chó được nhân hóa CH2527 trong thư viện: (VL7_46-13; SEQ ID NO:112). Chuỗi nhẹ này không được ngẫu nhiên hóa và được sử dụng mà không cần cải biến thêm bất kỳ để đảm bảo độ tương thích với các chất gắn kết đặc hiệu kép khác nhau.

Tất cả các chuỗi nặng sử dụng IGHJ2 làm thành phần J, ngoại trừ IGHV1-69*06 sử dụng trình tự IGHJ6. Thiết kế việc ngẫu hiện hóa chỉ tập trung vào CDR-H3, và PCR oligonucleotit được thiết kế cho phép sử dụng các biến thể xen giữa ngẫu nhiên hóa giữa thành phần V và thành phần J có chiều dài 4 đến 9 axit amin.

Ví dụ 6

Chọn lọc mảnh kháng thể từ thư viện chuỗi nhẹ chung (bao gồm chuỗi nhẹ có độ đặc hiệu CD3ε) với FolR1

Các kháng thể 16A3, 15A1, 18D3, 19E5, 19A4, 15H7, 15B6, 16D5, 15E12, 21D1, 16F12, 21A5, 21G8, 19H3, 20G6, và 20H7 bao gồm chuỗi nhẹ chung VL7_46-13 có độ đặc hiệu CD3ε thu được bằng cách chọn lọc biểu hiện thể thực khuẩn kháng các loài khác

nhau (người, khỉ đầu chó và chuột) của FolR1. Các dòng vô tính 16A3, 15A1, 18D3, 19E5, 19A4, 15H7, 15B6, 21D1, 16F12, 19H3, 20G6, và 20H7 được chọn từ thư viện con trong đó chuỗi nhẹ chung được ghép cặp với danh mục chuỗi nặng dựa trên dòng mầm người VH1_46. Trong thư viện con này, CDR3 của VH1_46 được ngẫu nhiên hóa dựa trên 6 chiều dài CDR3 khác nhau. Các dòng vô tính 16D5, 15E12, 21A5, và 21G8 được chọn từ thư viện con trong đó chuỗi nhẹ chung được ghép cặp với danh mục chuỗi nặng dựa trên dòng mầm người VH3_15. Trong thư viện con này, CDR3 của VH3_15 được ngẫu nhiên hóa dựa trên 6 chiều dài CDR3 khác nhau. Để thu được các kháng thể phản ứng chéo (hoặc phản ứng với FolR1 ở chuột) theo loài, các loại FolR1 khác nhau được thay phiên nhau (hoặc giữ cố định) theo các cách khác nhau trong 3 vòng sàng lọc sinh học: 16A3 và 15A1 (FolR1 ở người – khỉ đầu chó – người); 18D3 (FolR1 ở khỉ đầu chó – người – chuột); 19E5 và 19A4 (3 vòng kháng FolR1 ở chuột); 15H7, 15B6, 16D5, 15E12, 21D1, 16F12, 21A5, 21G8 (FolR1 ở người – khỉ đầu chó – người); 19H3, 20G6, và 20H7 (3 vòng kháng FolR1 ở chuột).

FolR1 ở người, ở chuột và ở khỉ đầu chó dưới dạng kháng nguyên để chọn lọc biểu hiện thể thực khuẩn cũng như sàng lọc dựa trên ELISA và SPR được biểu hiện tạm thời dưới dạng thể dung hợp Fc monome đầu tận cùng N trong tế bào HEK EBNA và được biotinyl hóa đặc hiệu điểm *in vivo* thông qua việc đồng biểu hiện BirA biotin ligaza ở trình tự nhận diện thẻ avi được đặt ở đầu tận cùng C của phần Fc mang chuỗi thụ thể (Chuỗi phần phình Fc). Để đánh giá độ đặc hiệu với FolR1, hai thụ thể liên quan, FolR2 và FolR3 ở người được tạo ra theo cùng một cách.

Các vòng chọn lọc (sàng lọc sinh học) được thực hiện trong dung dịch theo mô hình sau:

1. Làm sạch từ trước ~ 10^{12} hạt phagemit trên đĩa maxisorp được phủ 10ug/ml IgG người không liên quan để rút hết thư viện kháng thể nhận biết phần Fc của kháng nguyên.

2. Ủ hạt phagemit không gắn kết Fc với FolR1 ở người, khỉ đầu chó, hoặc chuột được biotinyl hóa 100nM trong 0,5 giờ khi có mặt 100nM cấu trúc phần phình thành phần lõm Fc không được biotinyl hóa không liên quan để rút hết thêm nữa chất gắn kết Fc trong tổng thể tích bằng 1ml.

3. Bắt FolR1 được biotinyl hóa và thể thực khuẩn gắn kết đặc hiệu được gắn bằng cách đưa vào 4 giếng chứa đĩa vi chuẩn độ được phủ từ trước bằng neutravidin trong 10 phút (trong vòng 1 & 3).

4. Rửa các giếng tương ứng bằng cách sử dụng 5x PBS/Tween20 và 5x PBS.

5. Rửa giải các hạt thể thực khuẩn bằng cách bổ sung 250ul TEA 100mM (trietylamin) trong mỗi giếng trong 10 phút và trung hòa bằng cách bổ sung 500ul Tris 1M/HCl độ pH = 7,4 vào các chất rửa giải được gom từ 4 giếng.

6. Làm sạch sau các chất rửa giải được trung hòa bằng cách ủ trên đĩa vi chuẩn được phủ từ trước neutravidin với FolR2 hoặc FolR3 được bắt biotin 100nM để cuối cùng loại bỏ chất gắn kết Fc và chất gắn kết không đặc hiệu.

7. Nhiễm lại tế bào *E. coli* TG1 pha log với phần dịch nổi trên bề mặt của hạt thể thực khuẩn đã được rửa giải, nhiễm thể thực khuẩn trợ giúp VCSM13, ủ trên thiết bị lắc ở nhiệt độ 30°C qua đêm và sau đó kết tủa PEG/NaCl của hạt phagemit để được sử dụng trong vòng chọn lọc tiếp theo.

Việc chọn lọc được thực hiện trong 3 vòng bằng cách sử dụng các nồng độ kháng nguyên không đổi là 100nM. Trong vòng 2, để tránh làm giàu các chất gắn kết với neutravidin, việc bắt phức hợp kháng nguyên: thể thực khuẩn được thực hiện bằng cách bổ sung $5,4 \times 10^7$ hạt từ tính phủ streptavidin. Chất gắn kết đặc hiệu được nhận biết bằng ELISA như sau: 100ul FolR1 ở người, khỉ đầu chó, hoặc chuột được biotinyl hóa 25nM và 10ug/ml IgG người được phủ trên đĩa neutravidin và đĩa maxisorp, một cách tương ứng. Phần dịch nổi trên bề mặt vi khuẩn chứa Fab được bổ sung và các Fab gắn kết được phát hiện thông qua thẻ Flag của chúng bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng Flag/HRP. Các dòng vô tính biểu hiện tín hiệu trên FolR1 ở người và âm tính trên IgG người được liệt kê ngắn gọn để phân tích thêm và cũng được thử nghiệm theo cách tương tự kháng hai loại FolR1 còn lại. Chúng được biểu hiện trong vi khuẩn trong thể tích nuôi cấy 0,5 lít, ái lực được tinh chế và được đặc trưng thêm bằng phân tích SPR sử dụng cảm biến sinh học BioRad's ProteOn XPR36.

Các ái lực (K_D) của các dòng vô tính được chọn lọc được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng công cụ ProteOn XPR36 (Biorad) ở nhiệt độ 25°C với FolR1 ở người, khỉ đầu chó, và chuột được biotinyl hóa cũng như FolR2 và FolR3 ở người (đối chứng âm) được cố định trên chíp NLC bằng cách bắt neutravidin. Cố định

kháng nguyên (phối tử): kháng nguyên tái tổ hợp được pha loãng bằng PBST (phosphat 10mM, natri clorua 150mM độ pH = 7,4, 0,005% Tween 20) đến 10µg/ml, sau đó tiêm ở 30µl/phút theo hướng thẳng đứng. Tiêm chất phân tích: đối với phép đo 'động học một lần ngắm', chiều tiêm được thay đổi sang hướng nằm ngang, dãy pha loãng hai lần của Fab tinh chế (thay đổi khoảng nồng độ) được tiêm đồng thời dọc theo các kênh riêng rẽ 1-5, với thời gian kết hợp là 200 giây, và thời gian phân ly là 600 giây. Dung dịch đệm (PBST) được tiêm dọc theo kênh thứ sáu để tạo ra khoảng trống "nội tuyến" để tham khảo. Hằng số tốc độ kết hợp (k_{on}) và hằng số tốc độ phân ly (k_{off}) được tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một với một đơn giản trong phần mềm ProteOn Manager v3.1 bằng cách đồng thời điều chỉnh phù hợp biểu đồ nhạy cảm kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly (K_D) cân bằng được tính dưới dạng tỷ lệ k_{off}/k_{on}. Bảng 4 liệt kê các hằng số phân ly (K_D) cân bằng của các dòng vô tính được chọn đặc hiệu đối với FolR1.

Bảng 4: Hằng số phân ly (KD) cân bằng đối với kháng thể kháng FolR1 (mô hình Fab) được chọn bằng cách biểu hiện thể thực khuẩn từ thư viện con chuỗi nhẹ chung bao gồm VL7_46-13, chuỗi nhẹ được nhân hóa đặc hiệu đối với CD3ε. KD tính theo nM.

Dòng vô tính	huFolR1 [nM]	cyFolR1 [nM]	muFolR1 [nM]	huFolR2 [nM]	huFolR3 [nM]
16A3	21,7	18	Rất yếu	Không gắn kết	Không gắn kết
15A1	30,9	17,3	Rất yếu	Không gắn kết	Không gắn kết
18D3	93,6	40,2	Rất yếu	Không gắn kết	Không gắn kết
19E5	522	276	19,4	Không gắn kết	Không gắn kết
19A4	2050	4250	43,1	Không gắn kết	Không gắn kết
15H7	13,4	72,5	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
15B6	19,1	13,9	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
16D5	39,5	114	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
15E12	55,7	137	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
21D1	62,6	32,1	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
16F12	68	90,9	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
21A5	68,8	131	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
21G8	130	261	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
19H3	Không gắn kết	Không gắn kết	89,7	Không gắn kết	Không gắn kết
20G8	Không gắn kết	Không gắn kết	78,5	Không gắn kết	Không gắn kết

Ví dụ 7

Chọn lọc mảnh kháng thể từ thư viện nhiều khung làm việc di truyền đối với FolR1

Các kháng thể 11F8, 36F2, 9D11, 5D9, 6B6, và 14E4 thu được bằng cách chọn lọc biểu hiện thể thực khuẩn dựa trên thư viện con nhiều khung làm việc di truyền kháng các loài khác nhau (người, khỉ đầu chó và chuột) của FolR1. Trong các thư viện con nhiều khung làm việc này, các miền VL khác nhau với CDR3 được ngẫu nhiên hóa (3 chiều dài khác nhau) được ghép cặp với các miền VH khác nhau với CDR3 được ngẫu nhiên hóa (6 chiều dài khác nhau). Các dòng vô tính được chọn là của cặp VL/VH sau: 11F8 (Vk_1_5/VH_1_69), 36F2 (Vk_3_20/VH_1_46), 9D11 (Vk2D_28/VH1_46), 5D9 (Vk3_20/VH1_46), 6B6 (Vk3_20/VH1_46), và 14E4 (Vk3_20/VH3_23). Để thu được các kháng thể phản ứng chéo (hoặc phản ứng với FolR1 ở chuột) theo loài, các loài khác nhau của FolR1 được thay phiên (hoặc giữ cố định) theo các cách khác nhau trong 3 hoặc 4 vòng sàng lọc sinh học: 11F8 (FolR1 ở khỉ đầu chó – chuột – người); 36F2 (FolR1 ở người – chuột – khỉ đầu chó – chuột); 9D11 (FolR1 ở khỉ đầu chó – người – khỉ đầu chó); 5D9 (FolR1 ở người – khỉ đầu chó – người); 6B6 (FolR1 ở người – khỉ đầu chó – người) và 14E4 (3 vòng kháng FolR1 ở chuột).

FolR1 ở người, ở chuột và ở khỉ đầu chó dưới dạng kháng nguyên để chọn lọc biểu hiện thể thực khuẩn cũng như sàng lọc dựa trên ELISA và SPR được biểu hiện tạm thời dưới dạng thể dung hợp Fc monome đầu tận cùng N trong tế bào HEK EBNA và được biotinyl hóa đặc hiệu điểm *in vivo* thông qua việc đồng biểu hiện BirA biotin ligaza ở trình tự nhận diện thẻ avi được đặt ở đầu tận cùng C của phần Fc mang chuỗi thụ thể (Chuỗi phần phình Fc). Để đánh giá độ đặc hiệu với FolR1, hai thụ thể liên quan, FolR2 và FolR3 ở người được tạo ra theo cùng một cách.

Các vòng chọn lọc (sàng lọc sinh học) được thực hiện trong dung dịch theo mô hình sau:

1. Làm sạch trước ~ 10^{12} hạt phagemit trên đĩa maxisorp được phủ 10ug/ml IgG người không liên quan để hút cạn thư viện kháng thể nhận diện phần Fc của kháng nguyên.

2. Ủ hạt phagemit không gắn kết Fc với FolR1 ở người, khỉ đầu chó, hoặc chuột được biotinyl hóa 100nM trong 0,5 giờ khi có mặt cấu trúc phần phình thành phần lõm

Fc không được biotinyl hóa không liên quan 100nM để hút cạn thêm chất gắn kết Fc trong tổng thể tích 1ml.

3. Bắt FolR1 được biotinyl hóa và thể thực khuẩn gắn kết đặc hiệu được gắn bằng cách đưa vào 4 giếng của đĩa vi chuẩn được phủ từ trước neutravidin trong 10 phút (trong vòng 1 & 3).

4. Rửa các giếng tương ứng bằng cách sử dụng 5x PBS/Tween20 và 5x PBS.

5. Rửa giải hạt thể thực khuẩn bằng cách bổ sung 250ul TEA 100mM (trietylamin) trong mỗi giếng trong 10 phút và trung hòa bằng cách bổ sung 500ul Tris 1M/HCl độ pH = 7,4 vào các chất rửa giải được gom từ 4 giếng.

6. Làm sạch sau các chất rửa giải được trung hòa bằng cách ủ trên đĩa vi chuẩn được phủ từ trước neutravidin với FolR2 hoặc FolR3 được bắt biotin 100nM để cuối cùng loại bỏ chất gắn kết Fc và chất gắn kết không đặc hiệu.

7. Nhiễm lại tế bào *E. coli* TG1 pha log với phần dịch nổi trên bề mặt của hạt thể thực khuẩn đã được rửa giải, nhiễm thể thực khuẩn trợ giúp VCSM13, ủ trên thiết bị lắc ở nhiệt độ 30°C qua đêm và sau đó kết tủa PEG/NaCl của các hạt phagemit để được sử dụng trong vòng chọn lọc tiếp theo.

Việc chọn lọc được thực hiện trong 3 vòng bằng cách sử dụng nồng độ kháng nguyên không đổi bằng 100nM. Trong vòng 2 và 4, để tránh làm giàu các chất gắn kết với neutravidin, việc bắt phức hợp kháng nguyên : thể thực khuẩn được thực hiện bằng cách bổ sung $5,4 \times 10^7$ hạt từ tính phủ streptavidin. Chất gắn kết đặc hiệu được nhận biết bằng ELISA như sau: 100ul FolR1 ở người, khỉ đầu chó, hoặc chuột được biotinyl hóa 25nM và 10ug/ml IgG người được phủ trên đĩa neutravidin và đĩa maxisorp, một cách tương ứng. Phần dịch nổi trên bề mặt vi khuẩn chứa Fab được bổ sung và các Fab gắn kết được phát hiện thông qua thẻ Flag của chúng bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng Flag/HRP. Các dòng vô tính biểu hiện tín hiệu trên FolR1 ở người và âm tính trên IgG người được liệt kê ngắn gọn để phân tích thêm và cũng được thử nghiệm theo cách tương tự kháng hai loại FolR1 còn lại. Chúng được biểu hiện trong vi khuẩn trong thể tích nuôi cấy 0,5 lít, ái lực được tinh chế và được đặc trưng thêm bằng cách phân tích SPR sử dụng cảm biến sinh học BioRad's ProteOn XPR36.

Ái lực (K_D) của các dòng vô tính được chọn lọc được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng công cụ ProteOn XPR36 (Biorad) ở nhiệt độ 25°C với FolR1 ở người, khỉ đầu chó, và chuột được biotinyl hóa cũng như FolR2 và FolR3 ở người (đối chứng âm) được cố định trên chíp NLC bằng cách bắt neutravidin. Cố định kháng nguyên (phối tử): kháng nguyên tái tổ hợp được pha loãng bằng PBST (phosphat 10mM, natri clorua 150mM độ pH = 7,4, 0,005% Tween 20) đến 10µg/ml, sau đó tiêm ở 30µl/phút theo hướng thẳng đứng. Tiêm chất phân tích: đối với phép đo 'động học một lần nhắm', hướng tiêm được thay đổi thành hướng nằm ngang, dãy pha loãng hai lần của Fab tinh chế (thay đổi khoảng nồng độ) được tiêm đồng thời dọc theo các kênh riêng rẽ 1-5, với thời gian kết hợp là 150 hoặc 200 giây, và thời gian phân ly là 200 hoặc 600 giây, một cách tương ứng. Dung dịch đệm (PBST) được tiêm dọc theo kênh thứ sáu để tạo ra khoảng trống "nội tuyến" để tham khảo. Hằng số tốc độ kết hợp (k_{on}) và hằng số tốc độ phân ly (k_{off}) được tính sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một với một đơn giản trong phần mềm ProteOn Manager v3.1 bằng cách đồng thời điều chỉnh phù hợp biểu đồ nhạy cảm kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính là tỷ lệ k_{off}/k_{on}. Bảng 5 liệt kê hằng số phân ly cân bằng (K_D) của các dòng vô tính được chọn lọc đặc hiệu đối với FolR1.

Bảng 5: Hằng số phân ly cân bằng (K_D) đối với kháng thể kháng FolR1 (mô hình Fab) được chọn lọc bằng cách biểu hiện thể thực khuẩn từ thư viện con nhiều khung làm việc di truyền. K_D tính theo nM.

	K_D (nM)				
Dòng vô tính	huFolR1 [nM]	cyFolR1 [nM]	muFolR1 [nM]	huFolR2 [nM]	huFolR3 [nM]
11F8	632	794	1200	Không gắn kết	Không gắn kết
36F2	1810	1640	737	Không gắn kết	Không gắn kết
9D11	8,64	5,29	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
5D9	8,6	5,9	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
6B6	14,5	9,4	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
14E4	Không gắn kết	Không gắn kết	6,09	Không gắn kết	Không gắn kết

Ví dụ 8

Sản xuất và tinh chế chất gắn kết FolR1 trong mô hình IgG và mô hình đặc hiệu kép tế bào T

Để nhận biết chất gắn kết FolR1 có thể cảm ứng việc tiêu diệt phụ thuộc vào tế bào T của tế bào đích được chọn, các kháng thể được phân lập từ thư viện chuỗi nhẹ chung hoặc thư viện Fab được chuyển hóa thành mô hình IgG1 người tương ứng. Nói một cách ngắn gọn, chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi của chất gắn kết FolR1 đơn nhất từ việc biểu hiện thể thực khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR tiêu chuẩn bằng cách sử dụng các dòng vô tính Fab làm mẫu. Các sản phẩm PCR được tinh chế và được xen (bằng cách tách dòng dựa trên endonucleaza giới hạn và ligaza giới hạn, hoặc bằng cách 'thiết kế di truyền qua trung gian tái tổ hợp' sử dụng bộ kit InFusion của Invitrogen) vào vectơ biểu hiện thích hợp trong đó chúng được dung hợp với chuỗi nặng hằng định người hoặc chuỗi nhẹ hằng định người thích hợp. Cát-xét biểu hiện trong các vectơ này gồm có trình tự khởi đầu MPSV khảm và vị trí polyadenyl hóa tổng hợp. Ngoài ra, các plasmit chứa vùng oriP từ virut Epstein Barr để duy trì ổn định plasmit trong tế bào HEK293 chứa kháng nguyên nhân EBV (EBNA). Sau khi chuyển nhiễm qua trung gian PEI, các kháng thể được sản xuất tạm thời trong tế bào HEK293 EBNA và được tinh chế bằng sắc ký ái lực ProteinA tiêu chuẩn sau đó là sắc ký loại trừ kích cỡ như được mô tả:

Chuyển nhiễm và sản xuất tạm thời

Tất cả các kháng thể (đặc hiệu kép) (nếu không thu được từ nguồn thương mại) được sử dụng trong bản mô tả được sản xuất tạm thời trong tế bào HEK293 EBNA bằng cách sử dụng quy trình chuyển nhiễm qua trung gian PEI đối với vectơ được yêu cầu như được mô tả dưới đây. Tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy trong huyết thanh huyền phù tự do trong môi trường nuôi cấy CD CHO. Để sản xuất trong bình lắc 500ml, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm (đối với các quy mô thay thế, tất cả các lượng được điều chỉnh theo đó). Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20ml môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng bằng 200µg ADN. Sau khi bổ sung 540µl dung dịch PEI được khuấy trong 15 giây và sau đó được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ

trong phòng. Sau đó các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường 5% CO_2. Sau thời gian ủ, 160ml môi trường F17 được bổ sung và tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, axit valporic 1mM và Feed 1 7% được bổ sung vào. Sau 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, dung dịch này được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22µM) và natri azit ở nồng độ cuối cùng là 0,01% trọng lượng/thể tích được bổ sung, và giữ ở nhiệt độ 4°C. Sau khi sản xuất, phần dịch nổi trên bề mặt được thu gom và kháng thể chứa phần dịch nổi trên bề mặt được lọc qua thiết bị lọc vô trùng 0,22µM và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi tinh chế.

Tinh chế kháng thể

Tất cả các phân tử được tinh chế trong hai bước bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn, như tinh chế ái lực protein A (Äkta Explorer) và sắc ký loại trừ kích cỡ. Phần dịch nổi trên bề mặt thu được từ quá trình sản xuất tạm thời được điều chỉnh đến độ pH = 8,0 (sử dụng TRIS 2M độ pH = 8,0) và được nạp vào HiTrap PA FF (GE Healthcare, thể tích cột (cv) = 5ml) được cân bằng với 8 thể tích cột (cv) *dung dịch đệm A* (natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, độ pH = 7,5). Sau khi rửa bằng 10 cv *dung dịch đệm A,* protein được rửa giải bằng cách sử dụng gradien pH với *dung dịch đệm B* (natri xitrat 20mM độ pH = 3, NaCl 100mM, glyxin 100mM) trên 12 cv. Các phần chứa protein quan tâm được gộp lại và độ pH của dung dịch được điều chỉnh nhẹ đến độ pH = 6,0 (sử dụng Na_2HPO_4 0,5M độ pH = 8,0). Các mẫu được cô xuống còn 2 ml bằng cách sử dụng thiết bị siêu cô đặc (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius) và sau đó được áp dụng vào bậc điều chế HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 (GE Healthcare) được cân bằng với histidin 20mM, độ pH = 6,0, NaCl 140mM, Tween-20 0,01%. Thành phần kết tụ của các phần được rửa giải được phân tích bằng sắc ký phân tích loại trừ kích cỡ. Do đó, 30µl mỗi phần được nạp vào cột phân tích loại trừ kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) được cân bằng trong K_2HPO_4 25mM, NaCl 125mM, L-arginin monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), độ pH = 6,7 dung dịch chạy ở nhiệt độ 25°C. Các phần chứa ít hơn 2% oligome được gộp lại và được cô xuống còn nồng độ cuối cùng là 1 - 1,5 mg/ml bằng cách sử dụng thiết bị siêu cô đặc (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius). Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng

của các cấu trúc được phân tích bằng điện di mao dẫn SDS khi có và không có chất khử theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (công cụ Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Protein đã được tinh chế được làm đông trong N_2 lỏng và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Dựa trên các kết quả đặc trưng *in vitro*, các chất gắn kết được chọn được chuyển hóa thành mô hình đặc hiệu kép tế bào T. Trong các phân tử này, gốc gắn kết FolR1:CD3 được sắp xếp theo thứ tự 2:1 với FolR1 Fab được đặt ở đầu tận cùng N. Đối với các dòng vô tính được phân lập từ thư viện Fab tiêu chuẩn, phần gắn kết CD3 được tạo ra dưới dạng CrossFab (cắt CH1Cκ) trong khi đối với các dòng vô tính từ thư viện chuỗi nhẹ chung, không cần thiết phải cắt. Các phân tử đặc hiệu kép này được sản xuất và tinh chế tương tự với IgG.

Bảng 6: Hiệu suất và hàm lượng monome của chất gắn kết FolR1 mới trong mô hình IgG và TCB, một cách tương ứng.

			IgG		TCB	
	Dòng vô tính	Thư viện	Hiệu suất [mg/L]	Monome [%]	Hiệu suất [mg/L}	Monome [%]
	11F8	Fab	8,03	96,26	--	--
	14E4	Fab	8,90	98,12	--	--
	15B6	CLC	7,72	100,00	--	--
	15E12	CLC	6,19	100,00	--	--
	15H7	CLC	8,94	100,00	--	--
	16A3	CLC	0,60	n.d.	--	--
	16D5	CLC	36,50	96,96	4,36	97,19
	16F12	CLC	5,73	97,17	--	--
	18D3	CLC	0,90	n.d.	--	--
0	19A4	CLC	38,32	100,00	37,50	100,00
1	19E5	CLC	46,09	100,00	--	--
2	19H3	CLC	7,64	100,00	--	--
3	20G6	CLC	24,00	100,00	--	--
4	20H7	CLC	45,39	100,00	--	--
5	21A5	CLC	1,38	98,56	47,31	95,08
6	21D1	CLC	5,47	100,00	--	--
7	21G8	CLC	6,14	97,28	9,27	100,00

8	36F2	Fab	11,22	100,00	18,00	100,00
9	5D9	Fab	20,50	100,00	0,93	97,32
0	6B6	Fab	3,83	100,00	4,17	91,53
1	9D11	Fab	14,61	100,00	2,63	100,00

CLC: Chuỗi nhẹ chung

Ví dụ 9

Mô hình đặc hiệu kép tế bào T 2+1 và 1+1

Bốn mô hình đặc hiệu kép tế bào T khác nhau được xây dựng cho một chất gắn kết chuỗi nhẹ chung (16D5) và ba mô hình cho một chất gắn kết từ thư viện Fab (9D11) để so sánh các tính chất tiêu diệt của chúng *in vitro*.

Mô hình tiêu chuẩn là mô hình nghịch chuyển 2+1 như đã được mô tả (gốc gắn kết FolR1:CD3 được sắp xếp theo thứ tự 2:1 với FolR1 Fab được đặt ở đầu tận cùng N). Trong mô hình cổ điển 2+1, gốc gắn kết FolR1:CD3 được sắp xếp theo thứ tự 2:1 với CD3 Fab được đặt ở đầu tận cùng N. Hai mô hình hóa trị một cũng được xây dựng. 1+1 đầu đến đuôi có gốc gắn kết FolR1:CD3 được sắp xếp theo thứ tự 1:1 trên cùng một nhánh của phân tử với FolR1 Fab được đặt ở đầu tận cùng N. Trong mô hình cổ điển 1+1, các gốc gắn kết FolR1:CD3 có mặt một lần, mỗi gốc trên một nhánh của phân tử. Đối với dòng vô tính 9D11 được phân lập từ thư viện Fab tiêu chuẩn, phần gắn kết CD3 được tạo ra dưới dạng CrossFab (cắt CH1Cκ) trong khi đối với 16D5 từ thư viện chuỗi nhẹ chung, không cần phải cắt. Các phân tử đặc hiệu kép này được sản xuất và tinh chế tương tự với mô hình đặc hiệu kép tế bào T nghịch chuyển tiêu chuẩn.

Bảng 7: Tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của các mô hình đặc hiệu kép tế bào T khác nhau.

Cấu trúc	Monome [%] (SEC)	Hiệu suất
16D5 FolR1 TCB 2+1 (nghịch chuyển)	96%	5,4 mg/L
16D5 FolR1 TCB 2+1 (cổ điển)	90%	4,6 mg/L
16D5 FolR1 TCB 1+1 (đầu đến đuôi)	100 %	5,4 mg/L
16D5 FolR1 TCB 1+1 (cổ điển)	100%	0,7 mg/L
9D11 FolR1 TCB 2+1 (nghịch chuyển)	100%	2,6 mg/L
9D11 FolR1 TCB 1+1 (đầu đến đuôi)	100%	6,1 mg/L
9D11 FolR1 TCB 1+1 (cổ điển)	96%	1,3 mg/L

Mov19 FolR1 TCB 2+1 (nghịch chuyển)	98%	3 mg/L
Mov19 FolR1 TCB 1+1 (đầu đến đuôi)	100%	5,2 mg/L

Ví dụ 10

Đặc trưng sinh hóa của chất gắn kết FolR1 bằng cộng hưởng plasmon bề mặt

Khả năng gắn kết của chất gắn kết FolR1 dưới dạng IgG hoặc trong mô hình đặc hiệu kép tế bào T với các thụ thể folat tái tổ hợp khác nhau (FolR1, 2 và 3 người, FolR1 ở chuột và FolR1 ở khỉ đầu chó; tất cả dưới dạng thể dung hợp Fc) được đánh giá bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Tất cả các thử nghiệm SPR được thực hiện trên Biacore T200 ở nhiệt độ 25°C với HBS-EP làm dung dịch chạy (HEPES 0,01M độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%, Biacore, Freiburg/Đức).

Tiêm liều đơn

Trước tiên, IgG kháng FolR1 được phân tích bằng cách tiêm liều đơn (Bảng 1) để đặc trưng hóa khả năng phản ứng chéo của chúng (với FolR1 ở người, chuột và khỉ đầu chó) và độ đặc hiệu (với FolR1 ở người, FolR2 ở người, FolR3 ở người). Thể dung hợp Fc tái tổ hợp dạng monome được biotinyl hóa của người, khỉ đầu chó và thụ thể folat 1 chuột (FolR1-Fc) hoặc thụ thể folat 2 và 3 của người (FolR2-Fc, FolR3-Fc) được ghép cặp trực tiếp trên chíp SA bằng cách sử dụng hướng dẫn ghép cặp tiêu chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). Mức độ cố định là khoảng 300-400 RU. IgG được tiêm trong 60 giây ở nồng độ bằng 500nM. IgG gắn kết với huFolR2 và huFolR3 được bỏ đi vì thiếu độ đặc hiệu. Hầu hết chất gắn kết chỉ phản ứng chéo giữa FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó, khả năng phản ứng chéo bổ sung với FolR1 ở chuột trải qua hầu hết thời gian liên quan chặt chẽ với việc mất độ đặc hiệu.

Bảng 8: Khả năng phản ứng chéo và độ đặc hiệu của 25 chất gắn kết thụ thể folat 1 mới (dưới dạng IgG) cũng như hai IgG đối chứng (Mov19 và Farletuzumab). + có nghĩa là gắn kết, - có nghĩa là không gắn kết, +/- có nghĩa là gắn kết yếu.

Tên dòng vô tính	Gắn kết với huFolR1	Gắn kết với cyFolR1	Gắn kết với muFolR1	Gắn kết với huFolR2	Gắn kết với huFolR3
Mov19	+	+	-	-	-
Farletuzumab	+	+	-	-	-
16A3	+	+	+/-	-	-
18D3	+	+	-	-	-
19E5	+	+	+	+	+

19A4	-	-	+	+	+
15H7	+	+	+	-	-
15B6	+	+	-	-	-
16D5	+	+	-	-	-
15E12	+	+	+/-	+	+
21D1	+	+	+/-	-	-
16F12	+	+	-	-	-
21A5	+	+	-	-	+/-
21G8	+	+	-	+	+
19H3	-	-	+	-	-
20G6	-	-	+	-	-
20H7	-	-	+	-	-
9D11	+	+	-	-	-
5D9	+	+	-	+	+
6B6	+	+	-	+	+
11F8	+	+	+	+	+
36F2	+	+	+	-	-
14E4	-	-	+	-	-

Ái tính với thụ thể folat 1

Ái tính của tương tác giữa IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T và thụ thể folat tái tổ hợp được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 9).

Thể dung hợp Fc tái tổ hợp dạng monome được biotinyl hóa của người, thụ thể folat 1 ở khỉ đầu chó và chuột (FolR1-Fc) được ghép cặp trực tiếp trên chíp SA sử dụng hướng dẫn ghép cặp tiêu chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). Mức độ cố định là khoảng 300-400 RU. IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T được cho đi qua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2,1 đến 500nM với tốc độ dòng chảy 30µl/phút qua tế bào dòng chảy trong 180 giây. Sự phân ly được theo dõi trong 600 giây. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu được cố định với thể dung hợp Fc của thụ thể IL2 tái tổ hợp được biotinyl hóa. Để phân tích tương tác của 19H3 IgG và thụ thể folat 1 chuột, folat (Sigma F7876) được bổ sung trong dung dịch chạy HBS-EP ở nồng độ bằng 2,3µM. Các đường cong gắn kết thu được từ việc gắn kết hóa trị hai của IgG hoặc dạng đặc hiệu kép tế bào T được làm tròn thành gắn kết Langmuir 1:1 và được điều chỉnh phù hợp với mô hình đó (không đúng, nhưng nêu ý tưởng về ái tính). Hằng số ái tính biểu kiến cho các tương tác có nguồn gốc từ các hằng số tốc độ khi điều chỉnh phù hợp bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare).

Bảng 9: Gắn kết hóa trị hai (ái tính với KD biểu kiến) của chất gắn kết FolR1 được chọn dưới dạng IgG hoặc dưới dạng đặc hiệu kép tế bào T (TCB) trên FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó.

Chất phân tích	Phối tử	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD biểu kiến (M)
16D5 TCB	huFolR1	8,31E+04	3,53E-04	4,24E-09
	cyFolR1	1,07E+05	3,70E-04	3,45E-09
9D11 TCB	huFolR1	1,83E+05	9,83E-05	5,36E-10
	cyFolR1	2,90E+05	6,80E-05	2,35E-10
21A5 TCB	huFolR1	2,43E+05	2,64E-04	1,09E-09
	cyFolR1	2,96E+05	2,76E-04	9,32E-10
36F2 IgG	huFolR1	2,62E+06	1,51E-02	5,74E-9
	cyFolR1	3,02E+06	1,60E-02	5,31E-9
	muFolR1	3,7E+05	6,03E-04	1,63E-9
Mov19 IgG	huFolR1	8,61E+05	1,21E-04	1,4E-10
	cyFolR1	1,29E+06	1,39E-04	1,08E-10
Farletuzumab	huFolR1	1,23E+06	9E-04	7,3E-10
	cyFolR1	1,33E+06	8,68E-04	6,5E-10
19H3 IgG	muFolR1	7,1E+05	1,1E-03	1,55E-09

1. Ái lực với thụ thể folat 1

Ái lực của tương tác giữa IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T và thụ thể folat tái tổ hợp được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 10).

Để đo ái lực, việc ghép cặp trực tiếp khoảng 6000-7000 đơn vị cộng hưởng (RU) của kháng thể đặc hiệu kháng Fab người (bộ kit bắt Fab, GE Healthcare) được thực hiện trên chíp CM5 ở độ pH = 5,0 sử dụng bộ kit ghép cặp amin tiêu chuẩn (GE Healthcare). IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T được bắt ở 20nM với tốc độ chảy bằng 10µl/phút trong 20 hoặc 40 giây, tế bào dòng chảy đối chiếu được để lại mà không bắt. Dãy pha loãng (6,17 đến 500nM hoặc 12,35 đến 3000nM) của thể dung hợp Fc của thụ thể folat 1 ở người hoặc khỉ đầu chó được cho đi qua trên tất cả các tế bào dòng chảy ở 30µl/phút trong 120 hoặc 240 giây để ghi lại pha kết hợp. Pha phân ly được theo dõi trong 240 giây và được khởi phát bằng cách chuyển đổi từ dung dịch mẫu sang HBS-EP. Bề mặt chíp được tái tạo sau mỗi chu kỳ bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêm liều kép trong 60 giây Glyxin-HCl 10mM độ pH = 2,1 hoặc độ pH = 1,5. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu 1.

Hằng số ái lực cho các tương tác có nguồn gốc từ hằng số tốc độ bằng cách điều chỉnh phù hợp với gắn kết Langmuir 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare).

Bảng 10: Gắn kết hóa trị một (ái lực) của chất gắn kết FolR1 được chọn dưới dạng IgG hoặc dưới dạng đặc hiệu kép tế bào T (TCB) trên FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó.

Phối tử	Chất phân tích	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
16D5 TCB	huFolR1	1,53E+04	6,88E-04	4,49E-08
	cyFolR1	1,32E+04	1,59E-03	1,21E-07
9D11 TCB	huFolR1	3,69E+04	3,00E-04	8,13E-09
	cyFolR1	3,54E+04	2,06E-04	5,82E-09
21A5 TCB	huFolR1	1,79E+04	1,1E-03	6,16E-08
	cyFolR1	1,48E+04	2,06E-03	1,4E-07
Mov19 IgG	huFolR1	2,89E+05	1,59E-04	5,5E-10
	cyFolR1	2,97E+05	1,93E-04	6,5E-10
Farletuzumab	huFolR1	4,17E+05	2,30E-02	5,53E-08
	cyFolR1	5,53E+05	3,73E-02	6,73E-08

2. Ái lực với CD3

Ái lực của tương tác giữa dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 và CD3εδ-Fc tái tổ hợp ở người được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 11).

Để đo ái lực, việc ghép cặp trực tiếp khoảng 9000 đơn vị cộng hưởng (RU) của kháng thể đặc hiệu kháng Fab người (bộ kit bắt Fab, GE Healthcare) được thực hiện trên chíp CM5 ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin tiêu chuẩn (GE Healthcare). Dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 được bắt ở 20nM với tốc độ chảy bằng 10µl/phút trong 40 giây, tế bào dòng chảy đối chiếu được để lại mà không bắt. Dãy pha loãng (6,17 đến 500nM) của thể dung hợp CD3εδ-Fc người được cho đi qua trên tất cả các tế bào dòng chảy ở 30µl/phút trong 240 giây để ghi lại pha kết hợp. Pha phân ly được theo dõi trong 240 giây và được khởi phát bằng cách chuyển đổi từ dung dịch mẫu sang HBS-EP. Bề mặt chíp được tái tạo sau mỗi chu kỳ bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêm liều kép trong 60 giây Glyxin-HCl 10mM độ pH = 2,1. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu 1. Hằng số ái lực cho các tương tác có nguồn gốc từ hằng số tốc độ bằng cách điều chỉnh phù hợp với gắn kết Langmuir 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare).

Bảng 11: Gắn kết hóa trị một (ái lực) của dạng đặc hiệu kép tế bào T FolR1 (TCB) được chọn trên CD3-Fc người.

Phối tử	Chất phân tích	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
16D5 TCB	huCD3	4,25E+04	3,46E-03	8,14E-08
21A5 TCB	huCD3	3,72E+04	3,29E-03	8,8E-08

Phần gắn kết CD3 là giống nhau đối với tất cả các cấu trúc và ái lực là tương tự đối với dạng đặc hiệu kép tế bào T được đo (KD nằm trong khoảng từ 60 đến 90 nM).

Ví dụ 11

Gắn kết đồng thời dạng đặc hiệu kép tế bào T trên thụ thể folat 1 và CD3

Mức gắn kết đồng thời dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 trên thụ thể folat 1 tái tổ hợp và CD3εδ-Fc tái tổ hợp ở người được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt như được mô tả dưới đây. Thể dung hợp Fc tái tổ hợp dạng monome được biotinyl hóa của người, thụ thể folat 1 ở khỉ đầu chó và chuột (FolR1-Fc) được ghép cặp trực tiếp trên chíp SA bằng cách sử dụng hướng dẫn ghép cặp tiêu chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). Mức độ cố định là khoảng 300-400 RU. Dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 được tiêm trong 60 giây ở 500nM với tốc độ dòng chảy là 30µl/phút qua tế bào dòng chảy, sau đó tiêm hu CDεδ-Fc trong 60 giây ở 500nM. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu được cố định với thể dung hợp Fc của thụ thể IL2 tái tổ hợp được biotinyl hóa. Bốn dạng đặc hiệu kép tế bào T được thử nghiệm (16D5 TCB, 21A5 TCB, 51C7 TCB và 45D2 TCB) có thể gắn kết đồng thời với thụ thể folat 1 và CD3 ở người như được mong đợi.

Ví dụ 12

Phân khoảng epitop

Để phân khoảng epitop, IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T được cố định trực tiếp trên chíp CM5 ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin tiêu chuẩn (GE Healthcare), với đáp ứng cuối cùng khoảng 700 RU. Sau đó huFolR1-Fc 500nM được bắt trong 60 giây, sau đó là 500nM chất gắn kết khác nhau trong 30 giây. Bề mặt được tái tạo bằng hai lần tiêm glyxin 10mM độ pH = 2 trong 30 giây mỗi lần. Được đánh giá nếu các chất gắn kết khác nhau có thể gắn kết với huFolR1 được bắt trên chất gắn kết được cố định (Bảng 12).

Bảng 12: Đặc trưng epitop của chất gắn kết FolR1 được chọn dưới dạng IgG hoặc dưới dạng đặc hiệu kép tế bào T (TCB) trên FolR1 ở người. + có nghĩa là gắn kết, - có nghĩa là không có gắn kết, +/- có nghĩa là gắn kết yếu

		Chất phân tích trong dung dịch					
	trên huFolR1	16D5 TCB	21A5 TCB	9D11 TCB	36F2 IgG	Mov19 IgG	Farletuzumab
Được cố định	16D5 TCB	-	-	-	+	+	+
	21A5 TCB	-	-	-	+	+	+
	9D11 TCB	Không có gắn kết bổ sung trên FolR1 có thể có mỗi khi được bắt trên 9D11					
	36F2 IgG	Không thể đo, huFolR1 phân ly quá nhanh					
	Mov19 IgG	+	+	+/-	-	-	-

Dựa trên các kết quả này và số liệu bổ sung với việc gắn kết đồng thời trên huFolR1 được cố định, các chất gắn kết được phân lập trong ba nhóm. Không rõ ràng nếu 9D11 có epitop riêng do nó đổi chỗ tất cả các chất gắn kết khác. 16D5 và 21A5 dường như trong cùng một nhóm và Mov19, Farletuzumab (Coney et al., Cancer Res. 1991 Nov 15;51(22):6125-32; Kalli et al., Curr Opin Investig Drugs. 2007 Dec;8(12):1067-73) và 36F2 trong nhóm khác (Bảng 13). Tuy nhiên, 36F2 gắn kết với epitop khác so với Mov 19 và Farletuzumab do nó gắn kết với FolR1 ở người, khỉ đầu chó và chuột.

Bảng 13: chia nhóm epitop của chất gắn kết FolR1 được chọn dưới dạng IgG hoặc dưới dạng đặc hiệu kép tế bào T (TCB) trên FolR1 ở người

Epitop 1	Epitop 2	Epitop 3
16D5	9D11	Mov19
21A5		Farletuzumab
		36F2

Ví dụ 13

Chọn lọc chất gắn kết

Chất gắn kết FolR1 trong mô hình IgG được sàng lọc bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) và bằng thử nghiệm *in vitro* trên các tế bào để chọn lọc ứng viên tốt nhất.

IgG kháng FolR1 được phân tích bằng SPR để đặc trưng khả năng phản ứng chéo của chúng (với FolR1 ở người, ở chuột và ở khỉ đầu chó) và độ đặc hiệu (với FolR1 ở người, FolR2 ở người, FolR3 ở người). Khả năng gắn kết không đặc hiệu với FolR2 và 3 người được coi là yếu tố loại trừ. Khả năng gắn kết và độ đặc hiệu với FolR1 ở người được xác nhận trên tế bào. Một số chất gắn kết không gắn kết trên các tế bào biểu hiện

FolR1 dù là chúng nhận diện FolR1 ở người tái tổ hợp trong SPR. Nhiệt độ kết tụ được xác định nhưng không phải là yếu tố loại trừ do tất cả các chất gắn kết được chọn đều ổn định. Các chất gắn kết được chọn được thử nghiệm trong ELISA đa phản ứng để kiểm tra sự gắn kết không đặc hiệu, mà dẫn đến việc loại trừ bốn chất gắn kết. Quy trình này dẫn đến việc chọn lọc ban đầu của ba chất gắn kết: 36F2 (thư viện Fab), 9D11 (thư viện Fab) và 16D5 (chuỗi nhẹ chung). 36F2 phân ly nhanh khỏi huFolR1 và do đó, không được ưu tiên từ đầu.

Ví dụ 14

Khả năng gắn kết đặc hiệu chất gắn kết FolR1 vừa được tạo ra với tế bào khối u dương tính với FolR1 ở người

Chất gắn kết FolR1 mới được tạo ra thông qua việc biểu hiện thể thực khuẩn bằng cách sử dụng thư viện Fab hoặc thư viện chuỗi nhẹ chung sử dụng chuỗi nhẹ CD3. Các chất gắn kết được nhận biết được chuyển hóa thành mô hình IgG1 người và việc gắn kết với tế bào HeLa biểu hiện cao FolR1 được đề cập. Để làm phân tử đối chiếu, chất gắn kết FolR1 ở người Mov19 được bao gồm. Hầu hết các chất gắn kết được thử nghiệm trong thử nghiệm này cho thấy khả năng gắn kết từ trung bình đến tốt với FolR1 với một số dòng vô tính gắn kết bằng với Mov19 (xem Fig.2). Các dòng vô tính 16A3, 18D3, 15H7, 15B6, 21D1, 14E4 và 16F12 được loại trừ do việc gắn kết với FolR1 trên tế bào có thể không được xác nhận bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Trong bước tiếp theo, các dòng vô tính được chọn lọc được thử nghiệm về độ đặc hiệu với FolR1 ở người bằng cách loại trừ việc gắn kết với FolR2 ở người liên quan gần nhất. Các tế bào HEK được chuyển nhiễm tạm thời bằng FolR1 ở người hoặc FolR2 ở người để hướng đến độ đặc hiệu. Các dòng vô tính 36F2 và 9D11 có nguồn gốc từ thư viện Fab và các dòng vô tính 16D5 và 21A5 có nguồn gốc từ thư viện CLC gắn kết đặc hiệu với FolR1 ở người và không gắn kết với FolR2 ở người (xem Fig.3A-B). Tất cả các dòng vô tính được thử nghiệm khác cho thấy ít nhất một số dòng gắn kết với FolR2 ở người (xem Fig.3A-B). Do đó các dòng vô tính này được loại trừ khỏi việc đặc trưng thêm. Song song với đó độ phản ứng chéo của dòng vô tính FolR1 với FolR1 ở khỉ đầu chó được hướng đến bằng cách thực hiện các nghiên cứu gắn kết với tế bào HEK được chuyển nhiễm tạm thời bằng FolR1 ở khỉ đầu chó. Tất cả các dòng vô tính được thử nghiệm có thể gắn kết FolR1 ở khỉ đầu chó và bốn dòng vô tính đặc hiệu FolR1 ở người được chọn 36F2, 9D11, 16D5 và 21A5 gắn kết tương đương tốt FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó (Fig.4). Sau đó ba chất

gắn kết phản ứng chéo với khỉ đầu chó đặc hiệu FolR1 ở người được chuyển hóa thành mô hình TCB và được thử nghiệm về sự cảm ứng việc tiêu diệt tế bào T và sự hoạt hóa tế bào T. Các dòng vô tính này là 9D11 từ thư viện Fab và 16D5 và 21A5 từ thư viện CLC. Để làm phân tử đối chiếu Mov19 FolR1 TCB được bao gồm trong tất cả các nghiên cứu. Các FolR1 TCB này sau đó được sử dụng để so sánh việc cảm ứng sự tiếp nhận sau khi gắn kết với FolR1 trên tế bào HeLa. Tất cả ba dòng vô tính được thử nghiệm được tiếp nhận khi gắn kết với FolR1 so sánh được với việc tiếp nhận khi gắn kết Mov19 FolR1 TCB (Fig.5). 21A5 FolR1 TCB được làm gián đoạn do dấu hiệu đa phản ứng.

Ví dụ 15

Việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào đích khối u biểu hiện FolR1 được cảm ứng bằng kháng thể FolR1 TCB

FolR1 TCB được sử dụng để xác định việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FoLR1. Bảng các dòng tế bào đích tiềm năng được sử dụng để xác định vị trí gắn kết FolR1 bằng phân tích Qifikit.

Bảng được sử dụng gồm các tế bào khối u chứa tế bào khối u biểu hiện FolR1 ở mức độ cao, trung bình và thấp và dòng tế bào FolR1 âm.

Bảng 14: Vị trí gắn kết FolR1 trên tế bào khối u

Dòng tế bào	Nguồn gốc	Vị trí gắn kết FolR1
Hela	Ung thư tuyến cổ tử cung	2'240'716
Skov3	Ung thư tuyến buồng trứng	91'510
OVCAR5	Ung thư tuyến buồng trứng	22'077
HT29	Ung thư tuyến trực tràng ruột kết	10'135
MKN45	Ung thư tuyến dạ dày	54

Khả năng gắn kết của ba FolR1 TCB khác nhau (chứa chất gắn kết 9D11, 16D5 và Mov19) với bảng các dòng tế bào khối u này được xác định chỉ ra rằng FolR1 TCB gắn kết đặc hiệu với tế bào khối u biểu hiện FolR1 và không gắn kết đặc hiệu với dòng tế bào khối u âm tính FoLR1. Lượng cấu trúc gắn kết tỷ lệ với mức độ biểu hiện FolR1 và vẫn có khả năng gắn kết tốt của các cấu trúc này với dòng tế bào FolR1 thấp HT-29 phát hiện

được. Ngoài ra không có gắn kết của đối chứng âm DP47 TCB với dòng tế bào bất kỳ trong số các dòng tế bào được sử dụng (Fig.6A-E).

Dòng tế bào biểu hiện ở mức trung bình SKOV3 và dòng tế bào biểu hiện ở mức thấp HT-29 còn sử dụng để thử nghiệm việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T và sự hoạt hóa tế bào T bằng cách sử dụng 16D5 TCB và 9D11 TCB; DP47 TCB được bao gồm làm đối chứng âm. Cả hai dòng tế bào đều bị tiêu diệt khi có mặt 16D5 TCB và 9D11 TCB ở mức độ rất thấp và không có sự khác nhau về hoạt tính giữa cả hai TCB dù là 9D11 TCB gắn kết mạnh với FolR1 so với 16D5 TCB. Tổng thể việc tiêu diệt tế bào SKOV3 là cao hơn so với HT-29 mà phản ánh mức độ biểu hiện cao hơn của FolR1 trên tế bào SKOV3 (Fig.7A-D). Theo đó, việc điều hòa tăng mạnh của chỉ thị hoạt hóa CD25 và CD69 trên tế bào T $CD4^+$ và tế bào T $CD8^+$ được phát hiện. Việc hoạt hóa tế bào T tương tự ở mức cao khi có mặt tế bào SKOV3 và tế bào HT-29. Đối chứng âm DP47 TCB không cảm ứng việc tiêu diệt bất kỳ ở các nồng độ được sử dụng và không có sự điều hòa tăng đáng kể của CD25 và CD69 trên tế bào T.

Bảng 15: Giá trị EC50 của việc tiêu diệt tế bào khối u và sự hoạt hóa tế bào T với tế bào SKOV3

Cấu trúc	Tiêu diệt 24 giờ (pM)	Tiêu diệt 48 giờ (pM)	CD4+ CD69+ (%)	CD4+ CD25+ (%)	CD8+ CD69+ (%)	CD8+ CD25+ (%)
9D11 FolR1 TCB	1,1	0,03	0,51	0,46	0,019	0,03
16D5 FolR1 TCB	0,7	0,04	0,34	0,33	0,025	0,031

Bảng 16: Giá trị EC50 của việc tiêu diệt tế bào khối u và sự hoạt hóa tế bào T với tế bào HT-29

Cấu trúc	Tiêu diệt 24 giờ (pM)	Tiêu diệt 48 giờ (pM)	CD4+ CD69+ (%)	CD4+ CD25+ (%)	CD8+ CD69+ (%)	CD8+ CD25+ (%)
9D11 FolR1 TCB	2,3	0,1	1,22	1,11	0,071	0,084

16D5 FolR1 TCB	2,8	0,1	0,69	0,62	0,021	0,028

Ví dụ 16

Sự gắn kết với hồng cầu và sự hoạt hóa tế bào T trong máu nguyên vẹn

Để chứng minh rằng không có sự hoạt hóa tự phát khi không có tế bào khối u biểu hiện FolR1, các tác giả sáng chế thử nghiệm nếu có sự gắn kết của dòng vô tính FolR1 với hồng cầu mà có thể biểu hiện tiềm ẩn FolR1. Các tác giả sáng chế có thể không quan sát gắn kết đặc hiệu bất kỳ của 9D11 IgG, 16D5 IgG và Mov19 IgG với hồng cầu, làm đối chứng âm DP47 IgG được bao gồm (Fig.8).

Để loại bỏ sự gắn kết không đặc hiệu bất kỳ với tế bào máu hoặc sự hoạt hóa không đặc hiệu thông qua FolR1 TCB, 9D11 TCB, 16D5 TCB và Mov19 TCB được bổ sung vào máu nguyên vẹn và sự điều hòa tăng của CD25 và CD69 trên tế bào T $CD4^+$ và tế bào T $CD8^+$ được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. DP47 TCB được bao gồm làm đối chứng âm. Không có sự hoạt hóa nào của tế bào T có cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc được thử nghiệm có thể quan sát được bằng cách phân tích sự điều hòa tăng của CD25 và CD69 trên tế bào T $CD4^+$ và tế bào T $CD8^+$ (Fig.9).

Ví dụ 17

Loại bỏ vị trí N-glycosyl hóa trong chuỗi nhẹ 9D11

Trong khi phân tích các chất gắn kết FolR1 khác nhau để nhận biết điểm tỏa nhiệt của trình tự tiềm năng, ở cuối CDR L3 của dòng vô tính 9D11, một vị trí N-glycosyl hóa giả định được nhận biết. Thông thường, mô-típ liên ứng để N-glycosyl hóa được định nghĩa là N-X-S/T-X (trong đó X không phải là P). Trình tự của CDR L3 (MQASIMNRT) (SEQ ID NO: 61) ghép cặp hoàn hảo mô-típ liên ứng này có trình tự N-R-T. Do việc glycosyl hóa có thể không tái sản xuất hoàn toàn giữa các mẻ sản xuất khác nhau, điều này có thể có tác động đến khả năng gắn kết FolR1, nếu việc glycosyl hóa trong CDR L3 góp phần gắn kết kháng nguyên. Để đánh giá nếu vị trí N-glycosyl hóa này là quan trọng để gắn kết FolR1, hoặc có thể được thay thế mà không làm giảm khả năng gắn kết, các biến thể khác nhau của chuỗi nhẹ 9D11 được tạo ra trong đó vị trí N-glycosyl hóa được hoán vị bằng đột biến đặc hiệu điểm.

1. Chuyển nhiễm và sản xuất tạm thời

Bốn dạng đặc hiệu kép tế bào T được sản xuất tạm thời trong tế bào HEK293 EBNA bằng cách sử dụng quy trình chuyển nhiễm qua trung gian PEI đối với các vectơ được yêu cầu như được mô tả dưới đây. Các tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy trong huyết thanh huyền phù tự do trong môi trường nuôi cấy CD CHO. Để sản xuất trong bình lắc 500ml, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm (đối với các quy mô thay thế tất cả các lượng được điều chỉnh theo đó). Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20ml môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng bằng 200µg ADN. Sau khi bổ sung 540µl dung dịch PEI được khuấy trong 15 giây và sau đó được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường CO_2 5%. Sau thời gian ủ 160ml môi trường F17 được bổ sung và tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, axit valporic 1mM và Feed 1 7% được bổ sung. Sau 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100 m/s2, dung dịch này được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22µM) và natri azit ở nồng độ cuối cùng là 0,01% trọng lượng/thể tích được bổ sung, và giữ ở nhiệt độ 4°C. Sau khi sản xuất, phần dịch nổi trên bề mặt được thu gom và kháng thể chứa phần dịch nổi trên bề mặt được lọc thông qua thiết bị lọc vô trùng 0,22µM và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi tinh chế.

2. Tinh chế kháng thể

Tất cả các phân tử được tinh chế trong hai bước bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn, như tinh chế ái lực protein A (Äkta Explorer) và sắc ký loại trừ kích cỡ. Phần dịch nổi trên bề mặt thu được từ quá trình sản xuất tạm thời được điều chỉnh đến độ pH = 8,0 (sử dụng TRIS 2M độ pH = 8,0) và được nạp vào HiTrap PA HP (GE Healthcare, thể tích cột (cv) = 5ml) được cân bằng với 8 thể tích cột (cv) *dung dịch đệm A* (natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, NaCl 0,5M, Tween-20 0,01%, độ pH = 7,5). Sau khi rửa bằng 10 cv của *dung dịch đệm A,* protein được rửa giải bằng cách sử dụng gradien pH đến *dung dịch đệm B* (natri xitrat 20mM độ pH = 2,5, NaCl 0,5M, Tween-20 0,01%) trên 20 thể tích cột. Các phần chứa protein quan tâm được gộp lại và độ pH của dung dịch được điều chỉnh nhẹ đến độ pH = 6,0 (sử dụng TRIS 2M độ pH = 8,0). Các mẫu được cô xuống còn 1ml bằng cách sử dụng thiết bị siêu cô đặc (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY,

Sartorius) và sau đó được nạp vào Superdex^{TM} 200 10/300 GL (GE Healthcare) được cân bằng với histidin 20mM, độ pH = 6,0, NaCl 140mM, Tween-20 0,01%. Thành phần kết tụ của các phần được rửa giải được phân tích bằng sắc ký phân tích loại trừ kích cỡ. Do đó, 30µl mỗi phần được nạp vào cột phân tích loại trừ kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) được cân bằng trong K_2HPO= 25mM, NaCl 125mM, L-arginin monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), độ pH = 6,7 dung dịch chạy ở nhiệt độ 25°C. Các phần chứa ít hơn 2% oligome được gộp lại và được cô xuống còn nồng độ cuối cùng là 1 - 1,5 mg/ml bằng cách sử dụng thiết bị siêu cô đặc (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius). Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của các cấu trúc được phân tích bằng điện di mao dẫn SDS khi có và không có chất khử theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (công cụ Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Protein đã được tinh chế được làm đông trong N_2 lỏng và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

3. Nhiệt độ kết tụ

Độ ổn định của bốn cấu trúc được thử nghiệm trên Optim1000 (Avacta, PALL Corporation) bằng gradien gia nhiệt từ 25° đến 80° ở 0,1°C/phút. Nhiệt độ bắt đầu kết tụ được ghi lại.

Bảng 34: Hiệu suất, hàm lượng monome và nhiệt độ kết tụ của bốn đột biến bất hoạt vị trí N-glycosyl hóa của chất gắn kết 9D11 trong mô hình đặc hiệu kép tế bào T nghịch chuyển 2+1. Tất cả bốn đột biến hoạt động tương tự với chất gắn kết 9D11 kiểu dại

Dòng vô tính	Đột biến	Hiệu suất [mg/L}	Monome [%]	Nhiệt độ kết tụ
9D11	T102N	1,34	97	56°
9D11	T102A	1,29	100	56°
9D11	N100Q	2,5	100	56°
9D11	N100S	2,05	100	56°
9D11	-	2,6	100	57°

Các biến thể sau được tạo ra: N100S (N95S); N100Q (N95Q), T102A (T97A) và T102N (T97N) (đánh số theo Kabat được nêu trong ngoặc đơn) và được chuyển hóa thành mô hình đặc hiệu kép tế bào T. Sau khi sản xuất tạm thời trong tế bào HEK293 EBNA và tinh chế các biến thể khác nhau được phân tích về việc gắn kết đích và hoạt tính tiêu diệt tế bào so với dòng vô tính 9D11 gốc.

Bảng 17: Các đoạn mồi được sử dụng để loại bỏ vị trí N-glycosyl hóa trong CDR L3 của 9D11 (xem trình tự dưới đây)

#	Trao đổi axit amin	Đoạn mồi đột biến
1	N95S	GAB-7735
2	N95Q	GAB-7734
3	T97A	GAB7736
4	T97N	GAB-7737

Ví dụ 18

Việc gắn kết và tiêu diệt qua trung gian tế bào T với biến thể 9D11 a-glyco

Do vị trí glycosyl hóa trong các CDR, bốn biến thể 9D11 khác nhau được sản xuất với đột biến loại bỏ vị trí glycosyl hóa (Ví dụ 17). Bốn biến thể này được thử nghiệm so với 9D11 gốc để gắn kết với FolR1 trên tế bào HeLa (Fig.10) và cảm ứng việc tiêu diệt tế bào khối u trên SKOV3 và HT-29 (Fig.11A-B, E-F). Không biến thể nào trong số các biến thể này thể hiện sự khác nhau về khả năng gắn kết hoặc cảm ứng việc tiêu diệt tế bào khối u. Đồng thời việc tiêu diệt không đặc hiệu của dòng tế bào FolR1 âm MKN-45 được hướng đến (Fig.11C-D). Tương tự, không có khác biệt giữa các biến thể và chất gắn kết gốc có thể quan sát được. Không cấu trúc nào trong số các cấu trúc này cảm ứng việc tiêu diệt không đặc hiệu trên tế bào khối u FoLR1 âm.

Ví dụ 19

Biểu hiện FolR1 trên tế bào biểu mô sơ cấp

FolR1 được biểu hiện ở mức độ thấp trên tế bào biểu mô sơ cấp. Ở đây các tác giả sáng chế muốn thử nghiệm nếu các mức độ này là đủ để cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T khi có mặt FolR1 TCB. Để thử nghiệm như vậy các tác giả sáng chế sử dụng tế bào biểu mô phế quản người sơ cấp, tế bào biểu mô dây đám rối màng mạch người sơ cấp, tế bào biểu mô vỏ thận người sơ cấp và tế bào biểu mô sắc tố võng mạc người sơ cấp. Để làm đối chứng dương, tế bào SKOV3 FolR1 dương hoặc tế bào HT-29 FolR1 dương được bao gồm. Trước tiên các tác giả sáng chế kiểm tra sự biểu hiện FolR1 trên các tế bào sơ cấp được sử dụng và xác định số lượng vị trí gắn kết FolR1 trên các tế bào này. Tế bào biểu mô cuống phổi, tế bào biểu mô vỏ thận và tế bào biểu mô sắc tố võng mạc biểu hiện mức độ FolR1 rất thấp nhưng đáng kể so với mức độ được biểu hiện

trên tế bào khối u. Tế bào biểu mô dây đám rối màng mạch không biểu hiện mức độ FolR1 đáng kể.

Bảng 18: Vị trí gắn kết FolR1 trên tế bào biểu mô sơ cấp

Dòng tế bào	Vị trí gắn kết
Biểu mô cuống phổi	492
Biểu mô dây đám rối màng mạch	104
Biểu mô vỏ thận	312
Biểu mô sắc tố võng mạc	822
Skov3	69'890

Tế bào biểu mô sơ cấp cho thấy sự biểu hiện FolR1 trên bề mặt được sử dụng để giải quyết thắc mắc nếu các tế bào này có thể bị tiêu diệt bởi tế bào T khi có mặt FolR1 TCB. Không có mức độ tiêu diệt đáng kể nào có thể được đo nhưng việc cảm ứng sự hoạt hóa tế bào T khi có mặt tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, tế bào biểu mô cuống phổi và tế bào vỏ thận dẫn đến việc điều hòa tăng CD25 và CD69 được phát hiện. Sự hoạt hóa mạnh nhất được thấy là với tế bào biểu mô sắc tố võng mạc dẫn đến việc điều hòa tăng CD25 và CD69 cả trên tế bào T $CD4^+$ và tế bào T $CD8^+$. Khi có mặt tế bào biểu mô cuống phổi, sự hoạt hóa thấp hơn của tế bào T được cảm ứng với việc điều hòa tăng CD69 trên tế bào T $CD4^+$ và tế bào T $CD8^+$ nhưng điều hòa tăng ở mức độ rất thấp của CD25 chỉ trên tế bào T $CD4^+$ mà không trên tế bào T $CD8^+$. Sự hoạt hóa thấp nhất của tế bào T thu được khi có mặt tế bào biểu mô thận mà không có điều hòa tăng của CD25 trên tế bào T $CD4^+$ và tế bào T $CD8^+$ và CD69 chỉ được điều hòa tăng trên tế bào T $CD8^+$ (Fig.12A-X).

Ví dụ 20

So sánh các mô hình TCB khác nhau chứa chất gắn kết 16D5 hoặc chất gắn kết 9D11

Để xác định nếu mô hình nghịch chuyển TCB 2+1 là mô hình hoạt hóa nhất với chất gắn kết FolR1 được chọn, các mô hình khác nhau chứa 16D5 hoặc 9D11 được sản xuất và được so sánh về khả năng gắn kết tế bào đích, tiêu diệt qua trung gian tế bào T và hoạt hóa tế bào T. Chất gắn kết 16D5 được thử nghiệm trong mô hình TCB 2+1 nghịch chuyển (Fig.1A), TCB 2+1 cổ điển (Fig.1D), TCB 1+1 cổ điển (Fig.1C) và TCB 1+1 đầu

đến đuôi (Fig.1B); chất gắn kết 9D11 được thử nghiệm trong mô hình TCB 2+1 nghịch chuyển (Fig.1A), TCB 1+1 cổ điển (Fig.1C) và TCB 1+1 đầu đến đuôi (Fig.1B).

Tất cả các cấu trúc được thử nghiệm về khả năng gắn kết với FolR1 trên tế bào HeLa. Phân tử hóa trị hai để gắn kết với FolR1 gắn kết mạnh hơn so với các cấu trúc hóa trị một do ái tính. Sự khác nhau giữa cấu trúc hóa trị hai so với cấu trúc hóa trị một thể hiện nhiều hơn ở 16D5. Lý do có thể là do do ái lực thấp hơn của 16D5, tác dụng ái tính đối với chất gắn kết này mạnh hơn. Giữa hai 1+1 TCB, không có khác biệt đáng kể về khả năng gắn kết nhưng có sự khác biệt giữa hai cấu trúc 2+1. Cấu trúc 2+1 nghịch chuyển gắn kết mạnh hơn với FolR1 so với cấu trúc 2+1 cổ điển. Điều này chỉ ra rằng, trong cấu trúc 2+1 cổ điển, việc gắn kết với FoLR1 bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của CD3 Fab trong khi đó, trong cấu trúc nghịch chuyển, sự gắn kết ít bị ảnh hưởng.

Bằng cách thử nghiệm việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T có các cấu trúc này, các tác giả sáng chế có thể thể hiện rằng việc gắn kết mạnh hơn của 2+1 TCB nghịch chuyển được chuyển hóa thành việc tiêu diệt tế bào khối u và sự hoạt hóa tế bào T mạnh hơn so với 2+1 TCB cổ điển. 16D5 FolR1 TCB 2+1 cổ điển chỉ hoạt hóa nhiều hơn một chút so với cấu trúc 1+1 đầu đến đuôi tương ứng. Cấu trúc 1+1 đầu đến đuôi có hoạt tính nhiều hơn đáng kể so với cấu trúc 1+1 cổ điển. Điều này không phản ánh tình huống được thấy khi gắn kết và có thể là do sự liên kết chéo tốt hơn với cấu trúc đầu đến đuôi. Tổng thể việc tiêu diệt tế bào khối u và sự hoạt hóa tế bào T là so sánh được với tất cả các cấu trúc được thử nghiệm, sự khác nhau về hoạt lực được thấy có các khác biệt là chỉ theo giá trị EC50. Nhìn chung, có thể tóm tắt rằng FolR1 TCB 2+1 nghịch chuyển không phụ thuộc vào chất gắn kết được sử dụng là mô hình được ưu tiên để cảm ứng việc tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian tế bào T và sự hoạt hóa tế bào T (xem Fig.13A-C và Fig.14A-C).

Bảng 19: Giá trị EC50 của việc gắn kết tế bào đích và việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T với các mô hình TCB khác nhau

Cấu trúc	EC50 gắn kết (nM)	Tiêu diệt 24 giờ (pM)	Tiêu diệt 48 giờ (pM)
16D5 FolR1 TCB 2+1 nghịch chuyển	11,03	1,43	0,18
16D5 FolR1 TCB 2+1 cổ điển	17,07	5,60	2,18

16D5 FolR1 TCB 1+1 cổ điển	107,3	n.d.	n.d.
16D5 FolR1 TCB 1+1 đầu đến đuôi	102,6	26,24	6,06
9D11 FolR1 TCB 2+1 nghịch chuyển	17,52	0,74	0,14
9D11 FolR1 TCB 1+1 cổ điển	38,57	20,92	n.d.
9D11 FolR1 TCB 1+1 đầu đến đuôi	44,20	4,73	n.d.

Bảng 20: Giá trị EC50 về sự hoạt hóa tế bào T khi có mặt tế bào SKOV3 với các mô hình TCB khác nhau

Cấu trúc	CD4+CD25+ (%)	CD4+CD69+ (%)	CD8+CD25+ (%)	CD8+CD69+ (%)
16D5 FolR1 TCB 2+1 nghịch chuyển	1,96	0,33	2,10	n.d.
16D5 FolR1 TCB 2+1 cổ điển	13,83	3,67	12,88	4,47
16D5 FolR1 TCB 1+1 cổ điển	38,54	n.d.	n.d.	n.d.
16D5 FolR1 TCB 1+1 đầu đến đuôi	17,14	7,47	25,15	n.d.
9D11 FolR1 TCB 2+1 nghịch chuyển	1,41	0,27	1,24	0,35
9D11 FolR1 TCB 1+1 cổ điển	34,01	n.d.	34,39	7,40
9D11 FolR1 TCB 1+1 đầu đến đuôi	3,73	2,47	4,98	2,89

Ví dụ 21

Dòng tế bào khối u và tế bào sơ cấp

Tế bào HeLa (CCL-2) thu được từ ATCC và được nuôi cấy trong DMEM với FCS 10% và Glutamin 2mM, SKOV3 (HTB-77) thu được từ ATCC và được nuôi cấy trong

RPMI với FCS 10% và Glutamin 2mM, OVCAR5 thu được từ NCI và được nuôi cấy trong RPMI với FCS 10% và Glutamin 2mM, HT-29 (ACC-299) thu được từ DSMZ và được nuôi cấy trong môi trường McCoy's 5A với FCS 10% và Glutamin 2mM, MKN-45 (ACC-409) thu được từ DSMZ và được nuôi cấy trong RPMI với FCS 10% và Glutamin 2mM.

Tất cả các tế bào biểu mô sơ cấp được thử nghiệm thu được từ ScienCell Research Laboratories. Tế bào biểu mô phế quản người (HBEpiC, danh mục số 3210 được nuôi cấy trong môi trường tế bào biểu mô cuống phổi (BEpiCM, Cat. No. 3211, ScienCell). Tế bào biểu mô ruột kết người (HCoEpiC), danh mục số 2950 được nuôi cấy trong môi trường tế bào biểu mô ruột kết (CoEpiCM, Cat. No. 2951, ScienCell). Tế bào biểu mô sắc tố võng mạc người (HRPEpiC), danh mục số 6540 được nuôi cấy trong môi trường tế bào biểu mô (EpiCM, Cat. No. 4101, ScienCell). Tế bào biểu mô vỏ thận người (HRCEpiC), danh mục số 4110, được nuôi cấy trong môi trường tế bào biểu mô (EpiCM, Cat. No. 4101, ScienCell). Tế bào biểu mô dây đám rối màng mạch người (HCPEpiC), danh mục số 1310 được nuôi cấy trong môi trường tế bào biểu mô (EpiCM, Cat. No. 4101, ScienCell).

Ví dụ 22

Gắn kết đích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy

Tế bào đích như được chỉ định được thu gom bằng dung dịch đệm phân ly tế bào, được rửa bằng PBS và được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm FACS. Việc nhuộm kháng thể được thực hiện trong đĩa đáy tròn 96 giếng. Do đó 200000 tế bào được nuôi cấy trong mỗi giếng. Đĩa này được ly tâm trong 4 phút ở tốc độ 4000 m/s^2 và phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ. Các kháng thể thử nghiệm được pha loãng trong dung dịch đệm FACS và 20µl dung dịch kháng thể được bổ sung vào các tế bào trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Để loại bỏ kháng thể không gắn kết, các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS trước khi bổ sung kháng thể thứ cấp được pha loãng (IgG ở dê kháng người của mảnh AffiniPure F(ab')2 được tiếp hợp FITC, mảnh Fcg, Jackson ImmunoResearch #109-096-098 hoặc IgG ở dê kháng người của mảnh AffiniPure F(ab')2 được tiếp hợp PE, mảnh Fcg đặc hiệu, Jackson ImmunoResearch #109-116-170. Sau 30 phút ủ ở nhiệt độ 4°C, kháng thể thứ cấp không gắn kết được rửa trôi. Trước khi đo, các tế bào được tái tạo huyền phù trong 200µl dung dịch đệm FACS và được phân

tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy bằng cách sử dụng BD Canto II hoặc BD Fortessa.

Ví dụ 23

Tiếp nhận

Các tế bào được thu gom và khả năng sống được xác định. Tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường lạnh sạch ở 2 tế bào Mio/ml và huyền phù tế bào được chuyển vào trong ống falcon 15ml đối với mỗi kháng thể. Các kháng thể nên được thử nghiệm về việc tiếp nhận được bổ sung với nồng độ cuối cùng là 20µg trong mỗi ml vào tế bào. Các ống này được ủ trong 45 phút trong phòng lạnh trên thiết bị lắc. Sau khi ủ, các tế bào được rửa ba lần bằng PBS lạnh để loại bỏ các kháng thể không gắn kết. 0,2 tế bào Mio trong mỗi giếng được chuyển vào đĩa FACS khi thời gian chỉ là không. Các tế bào được đánh dấu được tái tạo huyền phù trong môi trường ấm và được ủ ở nhiệt độ 37°C. Ở các thời điểm được chỉ định 0,2 tế bào Mio trong mỗi giếng được chuyển vào trong PBS lạnh, được rửa khi được dàn trên đĩa trên đĩa FACS. Để phát hiện cấu trúc vẫn còn trên bề mặt, các tế bào được nhuộm màu với kháng thể thứ cấp kháng Fc người được gắn nhãn PE. Do đó 20µl kháng thể được pha loãng được bổ sung trong mỗi giếng và đĩa được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó các tế bào được rửa hai lần để loại bỏ các kháng thể không gắn kết và sau đó được trộn với PFA 1% để ngăn chặn việc tiếp nhận bất kỳ khác. Huỳnh quang được đo bằng cách sử dụng BD FACS CantoII.

Ví dụ 24

Phân tích QIFIKIT®

QIFIKIT® chứa chuỗi hạt, đường kính 10µM và được phủ các lượng phân tử Mab chuột khác nhau nhưng được xác định kỹ (CD5 kháng người ái lực cao, dòng vô tính CRIS-1, isotyp IgG2a). Các hạt này bắt chước các tế bào có các mật độ kháng nguyên khác nhau đã được đánh dấu bằng Mab chuột sơ cấp, isotyp IgG. Nói một cách ngắn gọn, các tế bào được đánh dấu bằng kháng thể đơn dòng sơ cấp của chuột nhắt được định hướng kháng kháng nguyên đáng quan tâm. Trong một giếng thử nghiệm riêng rẽ, các tế bào được đánh dấu bằng kháng thể đơn dòng chuột nhắt không thích hợp (đối chứng isotyp). Sau đó, các tế bào, hạt thiết lập và hạt định cỡ được đánh dấu bằng kháng thể thứ cấp kháng chuột nhắt được tiếp hợp fluorescein được bao gồm trong bộ kit. Kháng thể sơ cấp được sử dụng để đánh dấu tế bào phải được sử dụng ở nồng độ bão hòa. Kháng thể sơ

cấp có thể là isotyp IgG bất kỳ ở chuột nhắt. Trong các điều kiện này, số lượng phân tử kháng thể sơ cấp được gắn kết tương ứng với số lượng vị trí kháng nguyên có trên bề mặt tế bào. Kháng thể thứ cấp cũng được sử dụng ở nồng độ bão hòa. Do đó, độ huỳnh quang tương quan với số lượng phân tử kháng thể sơ cấp được gắn kết trên các tế bào và trên các hạt này.

Ví dụ 25

Việc tiêu diệt tế bào khối u qua trung gian tế bào T và sự hoạt hóa tế bào T

Tế bào đích được thu gom bằng Trypsin/EDTA, được đếm và khả năng sống được kiểm tra. Tế bào được tái tạo huyền phù trong môi trường tương ứng của chúng với nồng độ cuối cùng là 300000 tế bào/ml. Sau đó 100µl tế bào đích huyền phù được chuyển vào mỗi giếng của đĩa đáy phẳng 96 giếng. Đĩa được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ để cho phép các tế bào bám dính vào đĩa. Vào ngày tiếp theo, PBMC được phân lập từ máu nguyên vẹn từ đối tượng cho khỏe mạnh. Máu được pha loãng theo tỷ lệ 2:1 với PBS và được đặt lên trên 15ml Histopaque-1077 (# 10771, Sigma-Aldrich) trong ống Leucosep và được ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 450 m/s^2 mà không nghỉ. Sau khi ly tâm vạch chứa tế bào được gom bằng ống pipet 10ml và được chuyển vào ống 50ml. Các ống này được làm đầy PBS cho đến 50ml và được ly tâm (tốc độ 4000 m/s^2, 10 phút, nhiệt độ trong phòng). Phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và viên được tái tạo huyền phù trong PBS. Sau khi ly tâm (300g, 10 phút, nhiệt độ trong phòng), phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ, 2 ống được gộp lại và bước rửa được lặp lại (tại thời điểm này, ly tâm ở tốc độ 350 m/s^2, 10 phút, nhiệt độ trong phòng). Sau đó các tế bào được tái tạo huyền phù và các viên được gom trong 50ml PBS để đếm tế vào. Sau khi đếm, các tế bào được ly tâm (tốc độ 350 m/s^2, 10 phút, nhiệt độ trong phòng) và được tái tạo huyền phù ở 6 tế bào Mio/ml trong RPMI với FCS 2% và Glutamin 2nM. Môi trường được loại bỏ khỏi các tế bào đích được dàn trên đĩa và các kháng thể thử nghiệm được pha loãng trong RPMI với FCS 2% và Glutamin 2nM được bổ sung cũng như 300000 tế bào của dung dịch tế bào tác động được chuyển vào mỗi giếng dẫn đến tỷ lệ E:T bằng 10:1. Để xác định mức giải phóng tối đa, các tế bào đích được làm tan bằng Triton X-100. Mức giải phóng LDH được xác định sau 24 giờ và 48 giờ bằng cách sử dụng bộ kit phát hiện độ độc hại tế bào (#1644793, Roche Applied Science). Mức điều hòa tăng chỉ thị hoạt hóa trên tế bào T sau khi tiêu diệt tế bào khối u được đo bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Nói một cách ngắn gọn, PBMC

được thu gom, được chuyển vào đĩa đáy tròn 96 giếng và được nhuộm bằng các kháng thể CD4 PE-Cy7 (#3557852, BD Bioscience), CD8 FITC (#555634, BD Bioscience), CD25 APC (#555434, BD Bioscience), CD69 PE (#310906, BioLegend) được pha loãng trong dung dịch đệm FACS. Sau 30 phút ủ ở nhiệt độ 4°C, các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS. Trước khi đo huỳnh quang bằng cách sử dụng BD Canto II, các tế bào được tái tạo huyền phù trong 200µl dung dịch đệm FACS.

Ví dụ 26

Hoạt hóa tế bào T trong máu nguyên vẹn

280µl máu sạch được bổ sung vào đĩa giếng sâu hình nón có 96 giếng. Sau đó 20µl TCB đã pha loãng được bổ sung vào máu và được trộn kỹ bằng cách lắc đĩa. Sau 24 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ, máu được trộn và 35µl được chuyển vào đĩa đáy tròn 96 giếng. Sau đó 20µl hỗn hợp nhuộm kháng thể được bổ sung gồm có CD4 PE-Cy7 (#3557852, BD Bioscience), CD8 FITC (#555634, BD Bioscience), CD25 APC (#555434, BD Bioscience), CD69 PE (#310906, BioLegend) và CD45 V500 (#560777, BD Horizon) và được ủ trong 15 phút trong bóng tối ở nhiệt độ trong phòng. Trước khi đo 200µl dung dịch làm tan BD FACS vừa được điều chế (#349202, BD FCAS) được bổ sung vào máu. Sau 15 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, các tế bào được đo bằng BD Fortessa.

Ví dụ 27

Nghiên cứu SDPK (dược động học liều đơn) của FolR1 TCB được nhân hóa (dòng vô tính 16D5) ở chuột nhắt NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG) thiếu hụt miễn dịch

Chuột nhắt cái NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG), 6-7 tuần tuổi khi bắt đầu thử nghiệm (nuôi ở Taconic, Đan mạch) được duy trì trong điều kiện không có thể sinh bệnh đặc hiệu với chu kỳ hằng ngày là 12 giờ sáng/12 giờ tối theo hướng dẫn được cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được nhận xét và được phê chuẩn bởi chính quyền địa phương (P 2011/128). Sau khi đến, động vật được duy trì trong một tuần để quen với môi trường mới và để quan sát. Việc theo dõi sức khỏe liên tục được thực hiện trên cơ sở thường xuyên.

Chuột nhắt được tiêm trong tĩnh mạch với 10/1/0,1µg/chuột nhắt của FolR1 TCB trong khi đó 3 chuột nhắt được lấy máu trong mỗi nhóm và chỉ định thời gian. Tất cả các

con chuột nhắt được tiêm với tổng thể tích là 200µl dung dịch thích hợp. Để thu được lượng thích hợp FolR1 TCB trong mỗi 200µl, các dung dịch gốc được pha loãng bằng PBS khi cần. Các mẫu huyết thanh được gom 5 phút, 1 giờ, 3 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 168 giờ sau liệu pháp tiêm.

Fig.15 cho thấy rằng 16D5 FolR1 TCB thể hiện các tính chất PK như IgG điển hình và theo tỷ lệ liều lượng ở chuột nhắt NOG với độ thanh thải chậm.

Bảng 21: Điều kiện thử nghiệm.

Hợp chất	Liều lượng	Dung dịch đệm phối trộn	Nồng độ (mg/mL)
FOLR1 TCB (16D5)	10µg (tương ứng với khoảng 0,5mg/kg)	Histidin 20mM, NaCl 140mM, pH6,0	5,43 (= dung dịch gốc)
FOLR1 TCB (16D5)	1µg (tương ứng với khoảng 0,05mg/kg)	Histidin 20mM, NaCl 140mM, pH6,0	5,43 (= dung dịch gốc)
FOLR1 TCB (16D5)	0,1µg (tương ứng với khoảng 0,005mg/kg)	Histidin 20mM, NaCl 140mM, pH6,0	5,43 (= dung dịch gốc)

Ví dụ 28

Độ hiệu nghiệm in vivo của FolR1 TCB (dòng vô tính 16D5) sau khi chuyển PBMC người vào chuột nhắt NOG mang Skov3

FolR1 TCB được thử nghiệm trong dòng tế bào canxinom buồng trứng người Skov3, được tiêm dưới da vào chuột nhắt NOG được ghép PBMC.

Tế bào canxinom buồng trứng Skov3 thu được từ ATCC (HTB-77). Dòng tế bào khối u được nuôi cấy trong RPMI chứa FCS 10% (Gibco) ở nhiệt độ 37°C trong môi trường bão hòa nước ở CO_2 5%. Đường cấy chuyển 35 được sử dụng để cấy chuyển, ở khả năng sống > 95%. $5x10^6$ tế bào trong mỗi con vật được tiêm dưới da vào sườn phải của động vật với tổng cộng 100µl môi trường nuôi cấy tế bào RPMI (Gibco).

Chuột nhắt cái NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG), 6-7 tuần tuổi khi bắt đầu thử nghiệm (được nuôi ở Taconic, Đan mạch) được duy trì trong điều kiện không có thể sinh bệnh đặc hiệu với chu kỳ hằng ngày là 12 giờ sáng/12 giờ tối theo hướng dẫn được cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và được phê chuẩn bởi chính quyền địa phương (P 2011/128). Sau khi đến, các con vật được

duy trì trong một tuần để quen với môi trường mới và để quan sát. Việc theo dõi sức khỏe liên tục được thực hiện trên cơ sở thường xuyên.

Theo phương pháp này (Fig.16), chuột nhắt được tiêm dưới da vào ngày nghiên cứu 0 với $5x10^6$ Skov3. Vào ngày nghiên cứu 21, PBMC người của đối tượng cho khỏe mạnh được phân lập thông qua phương pháp Ficoll và $10x10^6$ tế bào được tiêm i.p. vào chuột nhắt mang khối u. Hai ngày sau đó, chuột nhắt được chọn ngẫu nhiên và được chia đều trong năm nhóm điều trị (n=12) sau đó tiêm trong tĩnh mạch 10/1/0,1µg/con FolR1 TCB hoặc 10µg/con TCB đối chứng DP47 một lần hằng tuần trong ba tuần. Tất cả các con chuột nhắt được tiêm trong tĩnh mạch 200µl dung dịch thích hợp. Chuột nhắt trong nhóm chất dẫn được tiêm PBS. Để thu được lượng thích hợp của TCB trong mỗi 200µl, dung dịch gốc được pha loãng bằng PBS khi cần. Sự sinh trưởng khối u được đo một lần hằng tuần bằng cách sử dụng thước đo (Fig.17) và thể tích khối u được tính như sau:

T_V: $(W^2/2) \times L$ *(W: chiều rộng, L: chiều dài)*

Việc tiêm một lần hằng tuần FolR1 TCB dẫn đến tác dụng kháng u phụ thuộc vào liều. Trong khi đó liều lượng 10µg/con và 1µg/con cảm ứng sự co khối u và 0,1µg/con cảm ứng sự ứ đọng khối u (Fig.17, Bảng 22). Đạt được mức co khối u tối đa ở liều lượng 10µg/con so với DP47 TCB đối chứng không được hướng đích.

Bảng 22: Độ hiệu nghiệm in vivo.

Hợp chất	Liều lượng	Ức chế sự sinh trưởng khối u
TCB TCB đối chứng DP47	10µg (tương ứng với khoảng 0,5mg/kg)	7%
FOLR1 TCB (16D5)	10µg (tương ứng với khoảng 0,5mg/kg)	90%
FOLR1 TCB (16D5)	1µg (tương ứng với khoảng 0,05mg/kg)	74%
FOLR1 TCB (16D5)	0,1µg (tương ứng với khoảng 0,005mg/kg)	56%

Đối với kết quả PD đọc được, ba con chuột nhắt trong mỗi nhóm điều trị được giết vào ngày nghiên cứu 32, các khối u được loại bỏ và các huyền phù tế bào đơn lẻ được điều chế bằng cách tiêu hóa enzym với Colagenaza V, Dispaza II và DNAza để phân tích FACS sau đó (Fig.19 và 20). Các tế bào đơn lẻ khi được sử dụng trực tiếp để nhuộm kháng nguyên ngoại bào và chỉ thị hoạt hóa hoặc được kích thích lại bằng cách sử dụng

5ng/ml PMA và 500ng/ml Ionomyxin khi có mặt chất ức chế vận chuyển protein Monensin trong 5 giờ trong môi trường nuôi cấy bình thường. Sau khi kích thích lại, các tế bào được nhuộm màu cho kháng nguyên bề mặt, sau đó là bước cố định và thẩm thấu. Các mẫu cố định sau đó được nhuộm nội bào cho TNF-α, IFN-γ, IL-10 và IL-2 và được phân tích bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Cùng một quy trình được sử dụng để làm mất hạt các tế bào, nhưng kháng thể kháng CD107a được bổ sung trong giai đoạn kích thích lại và các mẫu cố định được nhuộm cho thành phần perforin và granzyme-B nội bào. Phân tích FACS bộc lộ số lượng tế bào T $CD4^+$ và tế bào T $CD8^+$ thâm nhiễm cao hơn về mặt thống kê trong mô khối u khi xử lý bằng FolR1 TCB so với chất dẫn thuốc và TCB đối chứng không được hướng đích. Hơn nữa, số lượng TNF-α, IFN-γ và IL-2 sản sinh cũng như tế bào T $CD4^+$ và dương tính với CD8 $perforin^+$/$granzym\text{-}B^+$ được phát hiện trong khối u được điều trị bằng FolR1 TCB. Tế bào T thâm nhiễm khối u được điều trị bằng FolR1 TCB cũng cho thấy tốc độ làm mất hạt cao hơn so với nhóm đối chứng.

Vào ngày kết thúc thử nghiệm 38, tất cả các con vật bị giết; các khối u được lấy ra và cân lên (Fig.18). Trọng lượng của các khối u được điều trị bằng 10 và 1μg/con FolR1 TCB cho thấy chênh lệch đáng kể về mặt thống kê so với các nhóm đối chứng.

Bảng 23: Điều kiện thử nghiệm.

Hợp chất	Liều lượng	Dung dịch đệm phối trộn	Nồng độ (mg/mL)
PBS			
FOLR1 TCB (16D5)	10μg	Histidin 20mM, NaCl 140mM, pH6,0	3,88 (= dung dịch gốc)
FOLR1 TCB (16D5)	1μg	Histidin 20mM, NaCl 140mM, pH6,0	3,88 (= dung dịch gốc)
FOLR1 TCB (16D5)	0,1μg	Histidin 20mM, NaCl 140mM, pH6,0	3,88 (= dung dịch gốc)
TCB DP47	10μg	Histidin 20mM, NaCl 140mM, pH6,0	4,35 (= dung dịch gốc)

Ví dụ 29

Tạo ra kháng thể đặc hiệu kép FolR1/CD3– kappa - lambda

Để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép (hóa trị một đối với mỗi kháng nguyên) mà có thể gắn kết đồng thời với CD3 ở người và thụ thể folat alpha người (FolR1) mà không sử dụng phương pháp hetero-dime hóa bất kỳ (ví dụ công nghệ phần phình thành phần lõm), tổ hợp của thư viện chuỗi nhẹ chung với công nghệ gọi là công nghệ CrossMab được áp dụng: vùng biến đổi của chất gắn kết CD3 được nhân hóa (CH2527_VL7_46/13) được dung hợp với miền CH1 của kháng thể IgG1 người tiêu chuẩn để tạo ra phân tử cắt VLVH (được dung hợp với Fc) chung đối với cả hai độ đặc hiệu. Để tạo ra bản sao đã cắt (VHCL), miền chuỗi nặng biến đổi đặc hiệu CD3 (CH2527_VH_23/12) được dung hợp với chuỗi nhẹ λ hằng định ở người trong khi đó miền chuỗi nặng biến đổi đặc hiệu đối với FolR1 ở người (dòng vô tính 16D5, được phân lập từ thư viện chuỗi nhẹ chung) được dung hợp với chuỗi nhẹ κ hằng định ở người. Điều này thúc đẩy việc tinh chế kháng thể đặc hiệu kép được mong đợi bằng cách áp dụng các bước tinh chế sau đó với cột KappaSelect và LambdaFabSelect (GE Healthcare) để loại bỏ các kháng thể homodime không mong muốn.

Tất cả các vectơ biểu hiện kháng thể được tạo ra bằng cách sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn như được mô tả trong Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Chất phản ứng sinh phân tử được sử dụng theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Các gen hoặc mảnh gen được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc được tạo ra từ oligonucleotit tổng hợp ở Geneart AG (Regensburg, Đức) bằng cách tổng hợp gen tự động. Các mảnh ADN được khuếch đại bằng PCR hoặc tái tạo dòng thuần được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN (Synergene GmbH, Switzerland). ADN plasmit được biến nạp và được khuếch đại trong chủng vật chủ *E. coli* thích hợp để điều chế ADN plasmit bậc chuyển nhiễm bằng cách sử dụng bộ kit Maxiprep tiêu chuẩn (Qiagen). Để sản xuất phân tử đặc hiệu kép, các tế bào HEK293 EBNA được chuyển nhiễm với plasmit mã hóa các gen tương ứng bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên polyetylenimin (PEI) tiêu chuẩn. Tỷ lệ plasmit được sử dụng của ba vectơ biểu hiện là 1:1:1. Các tế bào được chuyển nhiễm được nuôi cấy trong 7 ngày trước khi phần dịch nổi trên bề mặt được thu gom để tinh chế. Kháng thể đặc hiệu kép FolR1/CD3– kappa - lambda được sản xuất và tinh chế như sau.

1. Chuyển nhiễm và sản xuất tạm thời

Kháng thể đặc hiệu kép kappa-lambda được sản xuất tạm thời trong tế bào HEK293 EBNA bằng cách sử dụng quy trình chuyển nhiễm qua trung gian PEI đối với các vectơ được yêu cầu như được mô tả dưới đây. Tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy trong huyết thanh huyền phù tự do trong môi trường nuôi cấy CD CHO. Để sản xuất trong bình lắc 500ml, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm (đối với các quy mô thay thế, tất cả các lượng được điều chỉnh theo đó). Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20ml môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng bằng 200µg ADN. Sau khi bổ sung 540µl dung dịch PEI được khuấy trong 15 giây và sau đó được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường CO_2 5%. Sau thời gian ủ 160ml môi trường F17 được bổ sung và tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, axit valporic 1mM và Feed 1 7% được bổ sung. Sau 7 ngày phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, dung dịch được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22µM) và natri azit ở nồng độ cuối cùng là 0,01% trọng lượng/thể tích được bổ sung, và giữ ở nhiệt độ 4°C.

2. Tinh chế

Kháng thể đặc hiệu kép kappa-lambda được tinh chế trong ba bước, sử dụng bước ái lực đặc hiệu đối với chuỗi nhẹ kappa, sau đó là bước ái lực đặc hiệu đối với chuỗi nhẹ lambda và cuối cùng là bước sắc ký loại trừ kích cỡ để loại bỏ các chất kết tụ. Phần dịch nổi trên bề mặt thu được từ quá trình sản xuất tạm thời được điều chỉnh đến độ pH = 8,0 (sử dụng TRIS 2M độ pH = 8,0) và được nạp vào cơ chất ái lực Capture Select kappa, hoặc HiTrap KappaSelect, GE Healthcare, thể tích cột (cv) = 1 ml, được cân bằng với 5 thể tích cột (cv) *dung dịch đệm A* (Tris 50mM, glyxin 100mM, NaCl 150mM, độ pH = 8,0). Sau khi rửa bằng 15 cv *dung dịch đệm A,* protein được rửa giải bằng cách sử dụng gradien pH đến *dung dịch đệm B* (Tris 50mM, glyxin 100mM, NaCl 150mM, độ pH = 2,0) trên 25 cv. Các phần chứa protein quan tâm được gộp lại và độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến độ pH = 8,0 (sử dụng TRIS 2M độ pH = 8,0). Các phần đã gom và trung hòa được nạp vào cơ chất ái lực Capture Select lambda (hiện tại: HiTrap

LambdaFabSelect, GE Healthcare, thể tích cột (cv) = 1 ml) được cân bằng với 5 thể tích cột (cv) *dung dịch đệm A* (Tris 50mM, glyxin 100mM, NaCl 150mM, độ pH = 8,0). Sau khi rửa bằng 15 cv *dung dịch đệm A,* protein được rửa giải bằng cách sử dụng gradien pH cho *dung dịch đệm B* (Tris 50mM, glyxin 100mM, NaCl 150mM, độ pH = 2,0) trên 25 cv. Các phần chứa protein quan tâm được gộp lại và độ pH của dung dịch được điều chỉnh đến độ pH = 8,0 (sử dụng TRIS 2M độ pH = 8,0). Dung dịch này được cô bằng cách sử dụng thiết bị siêu cô đặc (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius) và sau đó được nạp vào Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare) được cân bằng với histidin 20mM, độ pH = 6,0, NaCl 140mM, Tween-20 0,01%. Các phần được gom sau khi loại trừ kích cỡ được cô lại bằng cách sử dụng thiết bị siêu cô đặc (Vivaspin 15R 30.000 MWCO HY, Sartorius).

Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của các cấu trúc được phân tích bằng điện di mao dẫn SDS khi có và không có chất khử theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (công cụ Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Chỉ một lượng nhỏ protein có thể được tinh chế với hiệu suất cuối cùng bằng 0,17mg/L.

Ví dụ 30

Việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T với kháng thể đặc hiệu kép FolR1/CD3– kappa - lambda

Hoạt tính Kappa lambda FolR1 TCB được thử nghiệm trên tế bào SKOV3 khi có mặt PBMC mới được phân lập. Để làm đối chứng âm, DP47 TCB được bao gồm. Việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào SKOV3 được xác định sau 24 giờ và 48 giờ bằng cách giải phóng LDH. Sau 48 giờ, các tế bào T được thu gom và mức điều hòa tăng CD69 và CD25 trên tế bào T CD4 và tế bào T CD8 được đo bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

Cấu trúc kappa lambda FolR1 cảm ứng việc tiêu diệt tế bào SKOV3 theo cách phụ thuộc vào nồng độ được đi kèm với việc điều hòa tăng CD69 và CD25 cả trên tế bào T CD4 và trên tế bào T CD8.

Tế bào SKOV3 được ủ với PBMC khi có mặt Kappa lambda FolR1 TCB hoặc DP47 TCB. Sau 24 giờ và 48 giờ việc tiêu diệt tế bào khối u được xác định bằng cách đo mức giải phóng LDH (Fig.21). Tế bào SKOV3 được ủ với PBMC khi có mặt Kappa

lambda FolR1 TCB hoặc DP47 TCB. Sau 48 giờ mức điều hòa tăng CD25 và CD69 trên tế bào T CD4 và tế bào T CD8 được đo bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy (Fig.22).

Ví dụ 31

Đặc trưng hóa sinh chất gắn kết FolR1 16D5 và 36F2 bằng cộng hưởng plasmon bề mặt

Khả năng gắn kết của 16D5 kháng FolR1 trong mô hình đặc hiệu kép tế bào T hóa trị một hoặc hóa trị hai khác nhau và 36F2 kháng FolR1 dưới dạng IgG hoặc dưới dạng đặc hiệu kép tế bào T đối với thụ thể folat 1 ở người, khỉ đầu chó và chuột tái tổ hợp (tất cả đều dưới dạng thể dung hợp Fc) được đánh giá bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Tất cả các thử nghiệm SPR được thực hiện trên Biacore T200 ở nhiệt độ 25°C với HBS-EP làm dung dịch chạy (HEPES 0,01M độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%, Biacore, GE Healthcare).

1. Phân tử được thử nghiệm

Phân tử được sử dụng để xác định ái lực và ái tính được mô tả trong Bảng 24.

Bảng 24: Tên và mô tả 6 cấu trúc được sử dụng trong phân tích SPR

Tên	Mô tả
16D5 TCB	mô hình nghịch chuyển đặc hiệu kép tế bào T 2+1(chuỗi nhẹ chung)
16D5 TCB cổ điển	mô hình cổ điển đặc hiệu kép tế bào T 2+1(chuỗi nhẹ chung)
16D5 TCB 1+1	đặc hiệu kép tế bào T 1+1 (chuỗi nhẹ chung)
16D5 TCB 1+ 1 HT	đầu đến đuôi đặc hiệu kép tế bào T 1+1 (chuỗi nhẹ chung)
36F2 IgG	IgG1 người với P329G LALA
36F2 TCB	mô hình nghịch chuyển đặc hiệu kép tế bào T 2+1, crossfab

2. Ái tính đối với thụ thể folat 1

Ái tính của tương tác giữa IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T và thụ thể folat tái tổ hợp được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 25).

Thể dung hợp Fc tái tổ hợp dạng monome được biotinyl hóa của người, thụ thể folat 1 ở khỉ đầu chó và chuột (FolR1-Fc) được ghép cặp trực tiếp trên chíp SA sử dụng hướng dẫn ghép cặp tiêu chuẩn (Biacore, GE Healthcare). Mức độ cố định là khoảng 300-400 RU. IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T được cho đi qua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 3,7 đến 900nM với tốc độ dòng chảy là 30µl/phút qua tế bào dòng

chảy trong 180 giây. Sự phân ly được theo dõi trong 240 hoặc 600 giây. Bề mặt chíp được tái tạo sau mỗi chu kỳ bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêm liều kép Glyxin-HCl 10mM độ pH = 2 trong 30 giây. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu được cố định với thể dung hợp Fc CD134 tái tổ hợp được biotinyl hóa ở chuột. Đường cong gắn kết thu được từ việc gắn kết hóa trị hai của IgG hoặc dạng đặc hiệu kép tế bào T được làm tròn thành gắn kết Langmuir 1:1 (dù là nó là gắn kết 1:2) và được điều chỉnh phù hợp với mô hình đó để có KD biểu kiến tượng trưng cho ái tính của gắn kết hóa trị hai. Hằng số ái tính biểu kiến cho các tương tác có nguồn gốc từ hằng số tốc độ khi điều chỉnh phù hợp bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare). Đối với mô hình đặc hiệu kép tế bào T 1+1, tương tác thực tế là 1:1 và KD tượng trưng cho ái lực do chỉ có một chất gắn kết FolR1 trong cấu trúc này.

Bảng 25: Gắn kết hóa trị hai (ái tính với KD biểu kiến) của 16D5 kháng FolR1 và 36F2 dưới dạng IgG hoặc dưới dạng đặc hiệu kép tế bào T (TCB) trên FolR1 ở người, khỉ đầu chó và chuột.

Chất phân tích	Phối tử	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD biểu kiến
36F2 IgG	huFolR1	2,07E+06	1,3E-02	6 nM
	cyFolR1	2,78E+06	1,75E-02	6 nM
	muFolR1	4,28E+05	8,23E-04	2 nM
36F2 TCB	huFolR1	2,45E+06	9,120E-03	4 nM
	cyFolR1	4,31E+06	1,45E-02	3 nM
	muFolR1	6,97E+05	9,51E-04	1nM
16D5 TCB	huFolR1	1,57E+05	3,92E-04	3 nM
	cyFolR1	2,01E+05	3,81E-04	2 nM
16D5 TCB cổ điển	huFolR1	2,04E+05	1,84E-04	0,9 nM
	cyFolR1	2,50E+05	3,05E-04	1nM
16D5 TCB 1+ 1 HT	huFolR1	5,00E+04	2,25E-03	45 nM
	cyFolR1	5,75E+04	4,10E-03	70 nM
16D5 TCB 1+1	huFolR1	3,65E+04	2,04E-03	56 nM
	cyFolR1	4,09E+04	3,60E-03	90 nM

3. Ái lực đối với thụ thể folat 1

Ái lực của tương tác giữa IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T và thụ thể folat tái tổ hợp được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 26).

Để đo ái lực, việc ghép cặp trực tiếp khoảng 12000 đơn vị cộng hưởng (RU) của kháng thể đặc hiệu kháng Fab người (bộ kit bắt Fab, GE Healthcare) được thực hiện trên chíp CM5 ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin tiêu chuẩn (GE Healthcare). IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T được bắt ở 20nM với tốc độ chảy bằng 10µl/phút trong 40 giây, tế bào dòng chảy đối chiếu được để lại mà không bắt. Dãy pha loãng (12,3 đến 3000nM) của thể dung hợp Fc của thụ thể folat 1 ở người, khỉ đầu chó hoặc chuột được cho đi qua trên tất cả các tế bào dòng chảy là 30µl/phút trong 240 giây để ghi lại pha kết hợp. Pha phân ly được theo dõi trong 300 giây và được khởi phát bằng cách chuyển đổi từ dung dịch mẫu sang HBS-EP. Bề mặt chíp được tái tạo sau mỗi chu kỳ bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêm liều kép trong 60 giây Glyxin-HCl 10mM độ pH = 1,5. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu 1. Hằng số ái lực cho các tương tác có nguồn gốc từ hằng số tốc độ bằng cách điều chỉnh phù hợp với gắn kết Langmuir 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare).

Bảng 26: Gắn kết hóa trị một (ái lực) của 16D5 kháng FolR1 và 36F2 dưới dạng IgG hoặc dưới dạng đặc hiệu kép tế bào T (TCB) trên FolR1 ở người, khỉ đầu chó và chuột.

Chất phân tích	Phối tử	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
36F2 IgG	huFolR1	9,10E+04	6,65E-02	730 nM
	cyFolR1	1,02E+05	5,78E-02	570 nM
	muFolR1	8,32E+04	1,78E-02	210nM
36F2 TCB	huFolR1	5,94E+04	6,13E-02	1000nM
	cyFolR1	6,29E+04	5,42E-02	860 nM
	muFolR1	5,68E+04	1,75E-02	300nM
16D5 TCB	huFolR1	2,23E+04	7,33E-04	33 nM
	cyFolR1	1,57E+04	1,60E-03	100nM
16D5 TCB cổ điển	huFolR1	1,03E+04	7,59E-04	74 nM
	cyFolR1	9,18E+03	1,61E-03	175 nM
16D5 TCB 1+ 1 HT	huFolR1	2,05E+04	7,08E-04	35 nM
	cyFolR1	1,67E+04	1,53E-03	92 nM
16D5 TCB 1+1	huFolR1	1,43E+04	9,91E-04	69 nM
	cyFolR1	1,20E+04	1,80E-03	150 nM

Ái lực (gắn kết hóa trị một) đối với FolR1-Fc người và ở khỉ đầu chó của 36F2 TCB là tương tự và khoảng 1000nM đối với cả hai, trong khi đó ái lực đối với FolR1-Fc chuột tốt hơn một chút và khoảng 300nM. 36F2 có thể được sử dụng trong mô hình chuột và động vật linh trưởng, không cần phải có chất thay thế.

Ái tính (KD biểu kiến) của 36F2 TCB đối với FolR1 ở người là thấp hơn khoảng 30 lần so với ái lực của 16D5 TCB đối với FolR1 ở người. Trong mô hình hóa trị hai, 36F2 TCB nằm trong khoảng nanomol thấp, trong khi đó 16D5 TCB nằm trong khoảng picomol thấp (chênh lệch gấp 1000 lần).

FolR1 được biểu hiện trên các tế bào khối u được biểu hiện quá mức, ở mức độ gián đoạn và mức độ cao, trên bề mặt của tế bào ung thư trong phổ ác tính biểu mô, bao gồm bệnh ung thư buồng trứng, vú, thận, trực tràng ruột kết, phổi và các bệnh ung thư dạng rắn khác và cũng được biểu hiện trên bề mặt đỉnh của tập hợp con giới hạn chứa các tế bào biểu mô được phân cực trong mô bình thường. Các tế bào bình thường không khối u này chỉ biểu hiện FolR1 ở mức độ thấp, và bao gồm, ví dụ, tế bào biểu mô cuống phổi trên bề mặt túi phổi, đường viền khoang vỏ thận của tế bào ống, biểu mô sắc tố võng mạc (màng đáy bên) và dây đám rối màng mạch.

16D5 TCB gắn kết với tế bào mô bình thường biểu hiện lượng FolR1 thấp mà dẫn đến việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của chúng. Điều này có thể, ít nhất một phần, giải thích cho sự dung nạp hạn chế quan sát được ở 10μg/kg ở khỉ đầu chó. Các tác giả muốn xác định xem liệu việc làm giảm ái lực của phân tử đặc hiệu kép tế bào T có thể làm tăng sự biệt hóa giữa mô mật độ đích cao và thấp không và, nhờ đó, làm giảm độ độc hại bằng cách sử dụng gắn kết hóa trị hai và ái tính. Chất gắn kết ái lực thấp thường không được chọn làm ứng viên thích hợp để phân tích thêm vì ái lực thấp thường liên quan đến hoạt lực và độ hiệu nghiệm thấp. Tuy nhiên, chất gắn kết FolR1 ái lực thấp 36F2 được nghiên cứu trong một vài mô hình và được đặc trưng về các tính chất sinh học của nó. Đối với 36F2 được sử dụng trong mô hình đặc hiệu kép tế bào T hóa trị hai, tác dụng ái tính (khác nhau giữa gắn kết hóa trị một và gắn kết hóa trị hai) là gấp khoảng 250 lần (1000nM so với 4nM). Ở mật độ đích thấp, ái lực xác định tương tác và với 1000nM gây ra hoạt lực thấp của TCB. Tuy nhiên, ở mật độ đích cao, ái tính của phân tử bắt đầu có hiệu lực và với 4nM tạo ra hoạt tính cao của TCB (xem Ví dụ 32).

Theo một phương pháp khác, các tác giả tạo ra mô hình hóa trị một của 16D5 và biến thể ái lực thấp của 16D5 (ái lực khoảng 10-40 nM) trong mô hình hóa trị hai. Chất gắn kết 16D5 được sử dụng trong mô hình hóa trị một (1+1) có ái lực bằng khoảng 50nM. Sự biệt hóa giữa mô mật độ đích cao và thấp có thể đạt được tốt hơn bằng cách tận dụng tác dụng ái tính.

Ví dụ 32

Việc tiêu diệt tế bào T của tế bào SKov-3 được cảm ứng bằng 36F2 TCB, Mov19 TCB và 21A5 TCB

Việc tiêu diệt tế bào T được điều tiết bởi 36F2 TCB, Mov19 TCB và 21A5 TCB được đánh giá trên tế bào SKov-3 (FolR1 trung bình). PBMC người được sử dụng làm tế bào tác động và việc tiêu diệt được phát hiện ở 24 giờ và 48 giờ ủ với kháng thể đặc hiệu kép. Nói một cách ngắn gọn, các tế bào đích được thu gom với Trypsin/EDTA, được rửa, và được dàn trên đĩa ở mật độ là 25 000 tế bào/giếng bằng cách sử dụng đĩa đáy phẳng 96 giếng. Các tế bào được để bám dính qua đêm. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque của chế phẩm tế bào lympho đã được làm giàu (lớp hồng cầu) thu được từ người hiến khỏe mạnh. Máu sạch được pha loãng bằng PBS vô trùng và được đặt trên gradien Histopaque(Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (tốc độ 4500 m/s^2, 30 phút, nhiệt độ trong phòng), huyết tương bên trên kỳ nghỉ phân bào chứa PBMC được loại bỏ và PBMC được chuyển vào trong ống falcon mới sau đó được làm đầy bằng 50ml PBS. Hỗn hợp được ly tâm (tốc độ 4000 m/s^2, 10 phút, nhiệt độ trong phòng), phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và viên PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô trùng (bước ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2, 10 phút). Tập hợp PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và được bảo quản trong môi trường RPMI1640 chứa FCS 10% và L-alanyl-L-glutamin 1% (Biochrom, K0302) ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong thiết bị ủ tế bào cho đến khi sử dụng tiếp (không quá 24 giờ). Đối với thử nghiệm tiêu diệt, kháng thể được bổ sung ở các nồng độ được chỉ định (ba lần trong khoảng từ 0,005pM đến 5nM). PBMC được bổ sung vào tế bào đích ở tỷ lệ E:T cuối cùng là 10:1. Việc tiêu diệt tế bào đích được đánh giá sau 24 giờ và 48 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% bằng cách định lượng mức LDH được giải phóng vào phần dịch nổi trên bề mặt tế bào bằng tế bào chết theo chương trình/hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Đạt được mức làm tan tối đa các tế bào đích (= 100%) bằng cách ủ các tế bào đích với Triton X-100 1%. Mức làm tan tối thiểu (= 0%) dùng để chỉ các tế bào đích được cùng ủ với tế bào tác động mà không có cấu trúc đặc hiệu kép.

Các kết quả cho thấy rằng việc tiêu diệt được cảm ứng bằng 36F2 được giảm mạnh so với Mov19 TCB và 21A5 TCB (Fig.23A-B). Các giá trị EC50 liên quan đến thử nghiệm tiêu diệt, được tính bằng cách sử dụng GraphPadPrism6 được tóm tắt trong Bảng 27.

Bảng 27: Giá trị EC50 (pM) để tiêu diệt qua trung gian tế bào T các tế bào SKov-3 biểu hiện FolR1 được cảm ứng bằng 36F2 TCB, Mov19 TCB và 21A5 TCB.

	EC50 [pM]	
Kháng thể	24 giờ	48 giờ
36F2 TCB	1406,07*	134,5
Mov19 TCB	0,75	0,05
21A5 TCB	2,83	0,10

** đường cong không đạt bão hòa, giá trị là giả định*

Ví dụ 33

Việc tiêu diệt tế bào T được cảm ứng bằng 36F2 TCB và 16D5 TCB trong các mô hình đặc hiệu kép tế bào T hóa trị một và hóa trị hai khác nhau

Việc tiêu diệt tế bào T được điều tiết bởi kháng thể 36F2 TCB, 16D5 TCB, 16D5 TCB cổ điển, 16D5 TCB 1+1 và 16D5 TCB HT của tế bào khối u Hela (FolR1 cao, khoảng 2 triệu bản sao, Bảng 14, Fig.27), Skov-3 (FolR1 trung bình, khoảng 70000-90000 bản sao, Bảng 14, Fig.27) và HT-29 (FolR1 thấp, khoảng 10000, Bảng 14, Fig.27) người được đánh giá. Kháng thể DP47 TCB được bao gồm làm đối chứng âm. PBMC người được sử dụng làm tế bào tác động và việc tiêu diệt được phát hiện ở 24 giờ ủ với kháng thể đặc hiệu kép. Nói một cách ngắn gọn, các tế bào đích được thu gom với Trypsin/EDTA, được rửa, và được dàn trên đĩa ở mật độ là 25 000 tế bào/giếng bằng cách sử dụng đĩa đáy phẳng 96 giếng. Các tế bào được để bám dính qua đêm. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque của chế phẩm tế bào lympho đã được làm giàu (lớp hồng cầu) thu được từ người hiến khỏe mạnh. Máu sạch được pha loãng bằng PBS vô trùng và được đặt trên gradien Histopaque (Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (tốc độ 4500 m/s^2, 30 phút, nhiệt độ trong phòng), huyết tương trên kỳ nghỉ phân bào chứa PBMC được loại bỏ và các PBMC được chuyển vào trong ống falcon mới sau đó được làm đầy bằng 50ml PBS. Hỗn hợp được ly tâm (tốc độ 4000 m/s^2, 10 phút, nhiệt độ trong phòng), phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và viên PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô trùng (bước ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2, 10 phút). Tập hợp PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và được bảo quản trong môi trường RPMI1640 chứa FCS 10% và L-alanyl-L-glutamin 1% (Biochrom, K0302) ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong thiết bị ủ tế bào cho đến khi sử dụng tiếp (không quá 24 giờ). Đối với thử nghiệm tiêu diệt, kháng thể được bổ sung ở các nồng độ được chỉ định (ba lần trong khoảng từ 0,01pM đến 100nM). PBMC được bổ sung vào tế bào đích ở tỷ lệ

E:T cuối cùng là 10:1. Việc tiêu diệt tế bào đích được đánh giá sau 24 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% bằng cách định lượng LDH được giải phóng vào phần dịch nổi trên bề mặt tế bào bằng tế bào chết theo chương trình/hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Mức làm tan tối đa các tế bào đích (= 100%) đạt được bằng cách ủ các tế bào đích với Triton X-100 1%. Mức làm tan tối thiểu (= 0%) dùng để chỉ các tế bào đích được cùng ủ với tế bào tác động mà không có cấu trúc đặc hiệu kép.

Các kết quả cho thấy rằng việc tiêu diệt đặc hiệu đích của tất cả ba dòng tế bào đích dương tính với FolR1 được cảm ứng bằng 36F2 TCB yếu hơn nhiều so với việc tiêu diệt được cảm ứng bằng 16D5 TCB (Fig.24A-C, Bảng 29). Việc tiêu diệt đặc hiệu đích được cảm ứng bằng 16D5 TCB hóa trị một (16D5 HT và 16D5 1+1) yếu hơn so với 16D5 TCB hóa trị hai (16D5 TCB và 16D5 TCB cổ điển). Các giá trị EC50 liên quan đến thử nghiệm tiêu diệt, được tính bằng cách sử dụng GraphPadPrism6, được tóm tắt trong Bảng 28. Quan trọng là, số liệu này cho thấy rằng việc sử dụng chất gắn kết 36F2 FolR1 trong mô hình 2+1 TCB hóa trị hai mở rộng cửa sổ điều trị bệnh so với 16D5 FolR1 TCB (Fig.24A-C). Trong khi đó mức giảm hoạt lực giữa 16D5 và 36F2 FolR1 TCB là khoảng 45 lần đối với tế bào HeLa (biểu hiện FolR1 cao, xem Bảng 28: 16D5 TCB = 0,8 so với 36F2 TCB 36,0) và khoảng 297 lần đối với tế bào SKOV3 (biểu hiện FolR1 trung bình, xem Bảng 28: 16D5 TCB = 0,6 so với 36F2 TCB 178,4), mức giảm này gần như là 7000 lần đối với HT29 có biểu hiện FolR1 thấp (xem Bảng 28: 16D5 TCB = 5,7 so với 36F2 TCB 39573). Do đó, 36F2 FolR1 TCB biệt hóa giữa tế bào biểu hiện cao và thấp mà đặc biệt quan trọng để làm giảm độ độc hại do tế bào của một số mô bình thường không khối u biểu hiện nồng độ FolR1 rất thấp (khoảng ít hơn 1000 bản sao trong mỗi tế bào). Phù hợp với quan sát này, các kết quả được nêu trong Ví dụ 35 dưới đây cho thấy rằng 36F2 TCB không cảm ứng việc tiêu diệt tế bào T của các tế bào sơ cấp (Fig.26A-D) trong khi đó đối với 16D5 TCB một số lần tiêu diệt có thể được quan sát trên tế bào HRCEpiC và HRPEpiC sau 48 giờ ủ (Fig.26B và C). Đặc tính quan trọng này của 36F2 TCB cho phép định liều để điều trị khối u dương tính với FolR1 sao cho nó điều tiết việc tiêu diệt có hoạt lực của các mô khối u có biểu hiện FolR1 cao hoặc trung bình, nhưng không điều tiết việc tiêu diệt có hoạt lực của mô bình thường có biểu hiện thấp (phân cực một phần). Lưu ý là, đặc tính này dường như được điều tiết bởi ái tính của 36F2 TCB trong mô hình nghịch chuyển 2+1 hóa trị hai, do nó không được quan sát khi sử dụng mô hình hóa trị một 1+1 mang cùng một chất gắn kết 36F2 ái lực thấp.

Theo một cách khác, 36F2 TCB trong mô hình 2+1 hóa trị hai bao gồm gốc gắn kết FolR1 của ái lực tương đối thấp nhưng nó có tác dụng ái tính cho phép biệt hóa giữa tế bào biểu hiện FolR1 cao và thấp. Do tế bào khối u biểu hiện FolR1 ở mức độ cao hoặc trung bình, TCB này gắn kết có chọn lọc với tế bào khối u và tế bào không ung thư không bình thường biểu hiện FolR1 ở mức độ thấp hoặc không biểu hiện.

Ngoài các đặc tính thuận lợi trên đây, 36F2 TCB trong mô hình nghịch chuyển 2+1 hóa trị hai cũng có ưu điểm là nó không yêu cầu liên kết ngang hóa học hoặc phương pháp lai khác. Điều này khiến cho nó thích hợp để sản xuất dược phẩm để điều trị cho bệnh nhân, ví dụ, bệnh nhân có khối u ung thư dương tính với FolR1. 36F2 TCB trong mô hình nghịch chuyển 2+1 hóa trị hai có thể được sản xuất bằng cách sử dụng quy trình CHO tiêu chuẩn với các chất kết tụ thấp. Hơn nữa, 36F2 TCB trong 2+1 hóa trị hai bao gồm trình tự người và trình tự được nhân hóa khiến ưu việt hơn đối với phân tử sử dụng polypeptit chuột cống và chuột mà kháng nguyên ở mức độ cao khi được dùng cho người. Hơn nữa, 36F2 TCB trong mô hình 2+1 hóa trị hai được xử lý kỹ thuật để loại bỏ gắn kết FcgR và, như vậy, không gây ra liên kết chéo FcgR và phản ứng truyền, tăng cường thêm độ an toàn của nó khi được dùng cho bệnh nhân.

Như được thể hiện ở các kết quả được mô tả trên đây, hình đầu đến đuôi của nó tạo cho 36F2 TCB trong mô hình nghịch chuyển 2+1 hóa trị hai một phân tử hoạt lực cao cảm ứng hoàn toàn việc tiêu diệt tế bào đích. Hóa trị hai của nó làm tăng cường ái tính và hoạt lực, nhưng cũng cho phép biệt hóa giữa tế bào biểu hiện cao và thấp. Ưu tiên cho tế bào biểu hiện đích cao hoặc trung bình do tác dụng ái tính của nó làm giảm độ độc hại thu được từ việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của các tế bào bình thường biểu hiện FolR1 ở mức độ thấp.

Một ưu điểm khác của 36F2 TCB trong mô hình 2+1 hóa trị hai và các phương án khác được nêu trong bản mô tả là việc phát triển lâm sàng của chúng không đòi hỏi sử dụng phân tử thay thế do chúng gắn kết với FolR1 ở người, khỉ đầu chó và chuột. Như vậy, các phân tử được nêu trong bản mô tả nhận diện epitop khác với kháng thể đối với FolR1 được mô tả trên đây mà không nhận diện FolR1 từ tất cả ba loài.

Bảng 28: Giá trị EC50 (pM) đối với việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 được cảm ứng bằng 36F2 TCB và 16D5 TCB trong các mô hình đặc hiệu kép tế bào T hóa trị một và hóa trị hai khác nhau sau 24 giờ ủ.

Kháng thể	Hela (FolR1 cao)	Skov-3 (FolR1 trung bình)	HT-29 (FolR1 thấp)
16D5 TCB	0,8	0,6	5,7
16D5 TCB cổ điển	4,6	2,0	13,0
16D5 TCB HT	11,6	12,3	15,1
16D5 TCB 1+1	23,8	48,9	883,8*
36F2 TCB	36,0	178,4	*39573,0**

** đường cong không đạt bão hòa, chỉ có giá trị giả định*

Bảng 29 thể hiện sự so sánh các giá trị EC50 của 16D5 TCB và 36F2 TCB trên các dòng tế bào khác nhau được thử nghiệm. Ngoài các giá trị EC50 thu được, delta (EC50 của 16D5 TCB trừ đi EC50 của 36F2 TCB) và chênh lệch x lần (EC50 của 16D5 TCB chia cho EC50 của 36F2 TCB) được tính.

Bảng 29: So sánh các giá trị EC50 của 16D5 TCB và 36F2 TCB.

Kháng thể	Hela (FolR1 cao)	Skov-3 (FolR1 trung bình)	HT-29 (FolR1 thấp)
16D5 TCB	0,82	0,63	5,73
36F2 TCB	35,99	178,40	39573,00*
Δ	35,17	177,77	39567,27
x lần	43,83	284,61	6906,58

** đường cong không đạt bão hòa, chỉ có giá trị giả định*

Các giá trị EC50 được tính rõ ràng cho thấy rằng chênh lệch giữa 36F2 TCB và 16D5 TCB càng lớn thì mức biểu hiện FolR1 trên các tế bào đích càng thấp.

Các tính toán giống nhau như được thực hiện để so sánh các giá trị EC50 của 16D5 TCB và 36F2 TCB được thực hiện đối với 16D5 TCB và hai 16D5 TCB hóa trị một (16D5 TCB HT và 16D5 1+1). Bảng 30 và 31 thể hiện so sánh các giá trị EC50 của 16D5 TCB so với 16D5 TCB HT (Bảng 30) và 16D5 TCB so với 16D5 TCB 1+1 (Bảng 31) cũng như các delta tương ứng (EC50 của 16D5 TCB trừ EC50 của 16D5 TCB HT/1+1) và chênh lệch x lần (EC50 của 16D5 TCB chia cho EC50 của 16D5 TCB HT/1+1).

Bảng 30: So sánh giá trị EC50 của 16D5 TCB (2+1 nghịch chuyển) và 16D5 TCB HT.

Kháng thể	Hela (FolR1 cao)	Skov-3 (FolR1 trung bình)	HT-29 (FolR1 thấp)
16D5 TCB	0,82	0,63	5,73
16D5 TCB HT	11,61	12,27	15,11
Δ	10,79	11,65	9,38
x lần	14,14	19,58	2,64

Bảng 31: So sánh các giá trị EC50 của 16D5 TCB và 16D5 TCB 1+1.

Kháng thể	Hela (FolR1 cao)	Skov-3 (FolR1 trung bình)	HT-29 (FolR1 thấp)
16D5 TCB	0,82	0,63	5,73
16D5 TCB 1+1	23,84	48,86	883,78*
Δ	23,02	48,24	878,05
x lần	29,03	77,95	154,24

** đường cong không đạt bão hòa, chỉ có giá trị giả định*

So sánh các giá trị EC50 của 16D5 TCB và 36F2 TCB (Bảng 29) cho thấy rằng chênh lệch về giá trị EC50 càng lớn thì biểu hiện FolR1 trên các tế bào đích càng thấp. Tác dụng này không thể thấy được khi so sánh 16D5 TCB và 16D5 TCB hóa trị một (Bảng 29 và Bảng 30). Đối với 16D5 TCB 1+1 (Bảng 31) cũng có sự tăng nhẹ ở chênh lệch giữa EC50 của 16D5 TCB và 16D5 TCB 1+1 với mức biểu hiện FolR1 giảm nhưng với lượng lớn không bằng lượng được thông báo như có thể được thấy khi so sánh 16D5 TCB với 36F2 TCB.

Ví dụ 34

Điều hòa tăng CD25 và CD69 trên tế bào tác động $CD8^+$ và $CD4^+$ sau khi tiêu diệt tế bào T của tế bào khối u biểu hiện FolR1 được cảm ứng bằng kháng thể 36F2 TCB và 16D5 TCB

Hoạt hóa tế bào T $CD8^+$ và $CD4^+$ sau khi tiêu diệt tế bào T của tế bào khối u Hela, SKov-3 và HT-29 biểu hiện FolR1 được điều tiết bởi 36F2 TCB và 16D5 TCB được đánh giá bằng phân tích FACS bằng cách sử dụng các kháng thể nhận diện chỉ thị hoạt hóa tế bào T CD25 (chỉ thị hoạt hóa muộn) và CD69 (chỉ thị hoạt hóa sớm). DP47 TCB được bao gồm làm đối chứng không gắn kết. Kháng thể và các điều kiện thử nghiệm tiêu diệt chủ yếu như được mô tả trên đây (Ví dụ 32) sử dụng cùng một khoảng nồng độ kháng thể (0,01pM – 100nM ba lần), tỷ lệ E:T 10:1 và thời gian ủ là 48 giờ.

Sau khi ủ, PBMC được chuyển vào đĩa đáy tròn 96 giếng, được ly tâm ở tốc độ 4000 m/s^2 trong 4 phút và được rửa hai lần bằng PBS chứa BSA 0,1%. Việc nhuộm bề mặt cho CD8 (CD8 kháng người PE, BD #555635), CD4 (CD4 kháng người Brilliant Violet 421™, Biolegend #300532), CD69 (CD69 kháng người FITC, BD #555530) và CD25 (CD25 kháng người APC BD #555434) được thực hiện theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào được rửa hai lần bằng 150µl/giếng PBS chứa BSA 0,1%. Sau khi ly tâm, các mẫu được tái tạo huyền phù trong 200µl/giếng PBS 0,1% để đo FACS. Các mẫu được phân tích ở BD FACS Canto II.

36F2 TCB cảm ứng việc điều hòa tăng đặc hiệu đích của chỉ thị hoạt hóa (CD25, CD69) trên và tế bào T CD8$^+$ CD4$^+$ sau khi tiêu diệt tế bào Hela (Fig.25A) và tế bào SKov-3 (Fig.25B). So với 16D5 TCB, việc điều hòa tăng CD25 và CD69 trên tế bào T CD8$^+$ và CD4$^+$ được cảm ứng bằng 36F2 yếu hơn nhiều.

Trên HT-29 (FolR1 thấp), việc điều hòa tăng các chỉ thị hoạt hóa chỉ có thể được thấy ở nồng độ cao nhất của 36F2 TCB. Ngược lại, với 16D5 TCB, việc điều hòa tăng của CD25 và CD69 có thể dễ được thấy ở các nồng độ kháng thể thấp hơn nhiều (Fig.25C).

Như được thấy rõ trong thử nghiệm làm tan khối u, việc phân tích chỉ thị hoạt hóa (CD25 và CD69) trên các tế bào T (CD4$^+$ và CD8$^+$) sau khi tiêu diệt rõ ràng cho thấy rằng chênh lệch giữa 16D5 TCB và 36F2 TCB trở nên lớn hơn thì mức độ biểu hiện FolR1 trên các tế bào đích thấp hơn.

Ví dụ 35

Việc tiêu diệt tế bào T của tế bào sơ cấp được cảm ứng bằng 36F2 TCB và 16D5 TCB

Việc tiêu diệt tế bào T được điều tiết bởi 36F2 TCB và 16D5 TCB được đánh giá trên tế bào sơ cấp (tế bào biểu mô vỏ thận người (HRCEpiC) (ScienCell Research Laboratories; Cat No 4110) và tế bào biểu mô sắc tố võng mạc người (HRPEpiC) (ScienCell Research Laboratories; Cat No 6540)). Tế bào HT-29 (FolR1 thấp) được bao gồm làm dòng tế bào đối chứng. DP47 TCB được dùng làm đối chứng không gắn kết. PBMC người được sử dụng làm tế bào tác động và việc tiêu diệt được phát hiện ở 24 giờ và 48 giờ ủ với kháng thể đặc hiệu kép. Nói một cách ngắn gọn, các tế bào đích được thu gom với Trypsin/EDTA, được rửa, và được dàn trên đĩa ở mật độ là 25 000 tế bào/giếng bằng cách sử dụng đĩa đáy phẳng 96 giếng. Các tế bào được để bám dính qua đêm. Tế

bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque của chế phẩm tế bào lympho đã được làm giàu (lớp hồng cầu) thu được từ người hiến khỏe mạnh. Máu sạch được pha loãng bằng PBS vô trùng và được đặt trên gradien Histopaque (Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (tốc độ 4500 m/s^2, 30 phút, nhiệt độ trong phòng), huyết tương trên kỳ nghỉ phân bào chứa PBMC được loại bỏ và các PBMC được chuyển vào trong ống falcon mới sau đó được làm đầy bằng 50ml PBS. Hỗn hợp được ly tâm (tốc độ 4000 m/s^2, 10 phút, nhiệt độ trong phòng), phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và viên PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô trùng (bước ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2, 10 phút). Tập hợp PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và được bảo quản trong môi trường RPMI1640 chứa FCS 10% và L-alanyl-L-glutamin 1% (Biochrom, K0302) ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong thiết bị ủ tế bào cho đến khi sử dụng tiếp (không quá 24 giờ). Đối với thử nghiệm tiêu diệt, kháng thể được bổ sung ở các nồng độ được chỉ định (khoảng 0,01pM – 10nM ba lần). PBMC được bổ sung vào tế bào đích ở tỷ lệ E:T cuối cùng là 10:1. Việc tiêu diệt tế bào đích được đánh giá sau 24 giờ và 48 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% bằng cách định lượng LDH được giải phóng vào phần dịch nổi trên bề mặt tế bào bằng tế bào chết theo chương trình/hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Đạt được mức làm tan tối đa các tế bào đích (= 100%) bằng cách ủ các tế bào đích với Triton X-100 1%. Mức làm tan tối thiểu (= 0%) dùng để chỉ các tế bào đích được cùng ủ với tế bào tác động mà không có cấu trúc đặc hiệu kép.

Các kết quả cho thấy rằng 36F2 TCB không cảm ứng việc tiêu diệt tế bào T của tế bào sơ cấp (Fig.26A - D) trong khi đó đối với 16D5 TCB, một số tiêu diệt có thể quan sát được trên tế bào HRCEpiC và HRPEpiC sau 48 giờ ủ (Fig.26B và D). Như được mô tả trên đây, khác biệt lớn trong việc tiêu diệt tế bào T giữa các tế bào HT-29 được quan sát giữa 16D5 TCB và 36F2 TCB (Fig.26E, F).

Ví dụ 36

Chế phẩm của DP47 GS TCB (2+1 Crossfab-IgG P329G LALA nghịch chuyển = "TCB không được hướng đích")

"TCB không được hướng đích" được sử dụng làm đối chứng trong các thử nghiệm trên đây. Kháng thể đặc hiệu kép kết hợp với CD3e nhưng không gắn kết với kháng nguyên bất kỳ khác và do đó không thể liên kết chéo tế bào T với tế bào đích bất kỳ (và

sau đó không thể cảm ứng việc tiêu diệt bất kỳ). Do đó nó được sử dụng làm đối chứng âm trong các thử nghiệm để theo dõi sự hoạt hóa tế bào T không đặc hiệu bất kỳ. TCB không được hướng đích này được điều chế như được mô tả trong WO2014/131712. Nói một cách ngắn gọn, vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã được tách dòng phụ trong khung với chuỗi nặng hằng định hoặc chuỗi nhẹ hằng định được xen trước vào vectơ biểu hiện của động vật có vú nhận tương ứng. Việc biểu hiện kháng thể được điều khiển bằng trình tự khởi đầu MPSV và mang trình tự tín hiệu polyA tổng hợp ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra mỗi vectơ chứa trình tự EBV OriP.

Phân tử được sản xuất bằng cách đồng chuyển nhiễm tế bào HEK293-EBNA bằng các vectơ biểu hiện của động vật có vú bằng cách sử dụng polyetylenimin. Tế bào được chuyển nhiễm bằng các vectơ biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:2:1:1 ("vectơ chuỗi nặng Fc(phần lõm)" : "vectơ chuỗi nhẹ" : "vectơ chuỗi nhẹ Crossfab" : "vectơ chuỗi nặng Fc(phần phình)-FabCrossfab").

Để chuyển nhiễm, các tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy trong huyết thanh huyền phù tự do trong môi trường nuôi cấy CD CHO. Để sản xuất trong bình lắc 500ml, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20ml môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng bằng 200 g ADN. Sau khi bổ sung 540µl dung dịch PEI được khuấy trong 15 giây và sau đó được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường CO_2 5%. Sau thời gian ủ, 160ml môi trường F17 được bổ sung và tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, axit valporic 1mM và Feed 1 7% được bổ sung. Sau 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, dung dịch được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22µM) và natri azit ở nồng độ cuối cùng là 0,01% trọng lượng/thể tích được bổ sung, và giữ ở nhiệt độ 4°C.

Protein đã tiết ra được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực sử dụng ProteinA. Phần dịch nổi trên bề mặt được nạp trên cột HiTrap ProteinA HP (CV=5mL, GE Healthcare) được cân bằng với 40ml natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, natri clorua 0,5M, độ pH = 7,5. Protein không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa bằng ít nhất 10 thể tích cột natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, natri

clorua 0,5M, độ pH = 7,5. Protein đích được rửa giải trong gradien trên 20 thể tích cột từ natri xitrat 20mM, natri clorua 0,5M, độ pH = 7,5 đến natri xitrat 20mM, natri clorua 0,5M, độ pH = 2,5. Dung dịch protein được trung hòa bằng cách bổ sung 1/10 natri phosphat 0,5M, độ pH = 8. Protein đích được cô và được lọc trước khi nạp trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) được cân bằng với histidin 20mM, dung dịch natri clorua 140mM có độ pH = 6,0.

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

Độ tinh khiết và phân tử lượng của phân tử được phân tích bằng phân tích CE-SDS khi có và không có chất khử. Hệ Caliper LabChip GXII (Caliper lifescience) được sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. 2ug mẫu được sử dụng để phân tích.

Thành phần kết tụ của mẫu kháng thể được phân tích bằng cách sử dụng cột phân tích loại trừ kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) trong K_2HPO_4 25mM, NaCl 125mM, L-Arginin Monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), độ pH = 6,7 dung dịch chạy ở nhiệt độ 25°C.

Bảng 32: Tóm tắt việc sản xuất và tinh chế DP47 GS TCB.

Cấu trúc	Độ chuẩn [mg/l]	Hiệu suất [mg/l]	Kết tụ sau bước tinh chế thứ nhất [%]	HMW [%]	LMW [%]	Monome [%]
DP47 GS TCB	103,7	8,04	8	2,3	6,9	91,8

Bảng 33: Phân tích CE-SDS của DP47 GS TCB.

	Đỉnh	kDa	Chuỗi tương ứng
DP47 GS TCB không giảm (A)	1	165,22	Phân tử có 2 chuỗi nhẹ bị mất
	2	181,35	Phân tử có 1 chuỗi nhẹ bị mất
	3	190,58	phân tử hiệu chỉnh không có glycosyl hóa liên kết với N
	4	198,98	Phân tử hiệu chỉnh
DP47 GS TCB giảm (B)	1	27,86	Chuỗi nhẹ DP47 GS
	2	35,74	Chuỗi nhẹ huCH2527
	3	63,57	Fc(phần lõm)
	4	93,02	Fc(phần phình)

Ví dụ 37

Khả năng gắn kết của 16D5 TCB và 9D11 TCB và biến thể khử amit CD3 tương ứng của chúng N100A và S100aA với tế bào Jurkat biểu hiện CD3

Khả năng gắn kết của 16D5 TCB và biến thể khử amit CD3 tương ứng 16D5 TCB N100A và 16D5 TCB S100aA và 9D11 TCB và biến thể khử amit 9D11 TCB N100A và 9D11 TCB S100aA với CD3 ở người được đánh giá trên dòng tế bào lympho T được làm bất diệt biểu hiện CD3 (Jurkat). Nói một cách ngắn gọn, các tế bào được thu gom, được đếm, được kiểm tra về khả năng sống và được tái tạo huyền phù ở $2x10^6$ tế bào/ml trong dung dịch đệm FACS (100µl PBS BSA 0,1%). 100µl huyền phù tế bào (chứa $0,2x10^6$ tế bào) được ủ trong đĩa đáy tròn 96 giếng trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C ở các nồng độ khác nhau của kháng thể đặc hiệu kép (686pM - 500nM). Sau hai bước rửa bằng PBS lạnh BSA 0,1%, các mẫu được ủ lại trong 30 phút nữa ở nhiệt độ 4°C với kháng thể thứ cấp đặc hiệu mảnh Fcg dê kháng IgG người mảnh AffiniPure F(ab')2 được tiếp hợp PE (Jackson Immuno Research Lab PE #109-116-170). Sau khi rửa các mẫu hai lần bằng PBS lạnh BSA 0,1%, chúng được phân tích ngay bằng FACS sử dụng FACS CantoII (phần mềm FACS Diva). Đường cong gắn kết thu được bằng cách sử dụng GraphPadPrism6 (Fig.28A-B).

Các kết quả thể hiện gắn kết giảm của các biến thể khử amit hóa N100A và S100aA với CD3 so với các kháng thể gốc 16D5 TCB (Fig.28A) và 9D11 TCB (Fig.28B).

Ví dụ 38

Việc tiêu diệt tế bào T của tế bào SKov-3 và tế bào HT-29 được cảm ứng bằng 16D5 TCB và 9D11 TCB và các biến thể khử amit CD3 N100A và S100aA của chúng

Việc tiêu diệt tế bào T được điều tiết bởi 16D5 TCB và các biến thể khử amit CD3 tương ứng 16D5 TCB N100A và 16D5 TCB S100aA và 9D11 TCB và biến thể khử amit 9D11 TCB N100A và 9D11 TCB S100aA được đánh giá trên tế bào SKov-3 (FolR1 trung bình) và HT-29 (FolR1 thấp). PBMC người được sử dụng làm tế bào tác động và việc tiêu diệt được phát hiện ở 24 giờ ủ với kháng thể đặc hiệu kép. Nói một cách ngắn gọn, các tế bào đích được thu gom với Trypsin/EDTA, được rửa, và được dàn trên đĩa ở mật độ bằng 25 000 tế bào/giếng bằng cách sử dụng đĩa đáy phẳng 96 giếng. Các tế bào được để bám dính qua đêm. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque của chế phẩm tế bào lympho đã được làm giàu (lớp hồng

cầu) thu được từ người hiến khỏe mạnh. Máu sạch được pha loãng bằng PBS vô trùng và được đặt trên gradien Histopaque (Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (tốc độ 4500 m/s^2, 30 phút, nhiệt độ trong phòng), huyết tương trên kỳ nghỉ phân bào chứa PBMC được loại bỏ và các PBMC được chuyển vào trong ống falcon mới sau đó được làm đầy bằng 50ml PBS. Hỗn hợp được ly tâm (tốc độ 4000 m/s^2, 10 phút, nhiệt độ trong phòng), phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và viên PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô trùng (bước ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2, 10 phút). Tập hợp PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và được bảo quản trong môi trường RPMI1640 chứa FCS 10% và L-alanyl-L-glutamin 1% (Biochrom, K0302) ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong thiết bị ủ tế bào cho đến khi sử dụng tiếp (không quá 24 giờ). Đối với thử nghiệm tiêu diệt, kháng thể được bổ sung ở các nồng độ được chỉ định (khoảng 0,01pM – 10nM ba lần). PBMC được bổ sung vào tế bào đích ở tỷ lệ E:T cuối cùng là 10:1. Việc tiêu diệt tế bào đích được đánh giá sau 24 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% bằng cách định lượng LDH được giải phóng vào phần dịch nổi trên bề mặt tế bào bằng tế bào chết theo chương trình/hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Mức làm tan tối đa các tế bào đích đạt được (= 100%) bằng cách ủ các tế bào đích với Triton X-100 1%. Mức làm tan tối thiểu (= 0%) dùng để chỉ các tế bào đích được cùng ủ với tế bào tác động mà không có cấu trúc đặc hiệu kép.

Các kết quả cho thấy rằng trên tế bào SKov-3, việc tiêu diệt được cảm ứng bằng biến thể khử amit CD3 16D5 TCB N100A và 16D5 S100aA so sánh được với việc cảm ứng được cảm ứng bằng 16D5 TCB (Fig.29A). Kết quả giống như vậy cũng đúng đối với 9D11 TCB và các biến thể 9D11 TCB N100A và 9D11 TCB S100aA của nó (Fig.29B). Trên tế bào HT-29 biểu hiện FolR1 thấp, biến thể S100aA thể hiện hiệu quả tiêu diệt suy giảm là trường hợp đối với 16D5 TCB (Fig.30A) cũng như đối với 9D11 TCB (Fig.30B). Các giá trị EC50 liên quan đến thử nghiệm tiêu diệt, được tính bằng cách sử dụng GraphPadPrism6 được nêu trong Bảng 35. Error! Reference source not found.

Bảng 35: Giá trị EC50 (pM) đối với việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào SKov-3 và tế bào HT-29 biểu hiện FolR1 được cảm ứng bằng 16D5 TCB và 9D11 TCB và các biến thể khử amit hóa N100A và A100aA của chúng.

	EC50 [pM]	
Kháng thể	SKov-3	HT-29
16D5 TCB	1,283	56,67

16D5 TCB N100A	1,886	91,95
16D5 TCB S100aA	1,939	165,6
9D11 TCB	1,283	2,827
9D11 TCB N100A	1,886	37,72
9D11 TCB S100aA	1,939	n.d.*

** không được xác định*

Ví dụ 39

Đặc trưng hóa sinh bằng cộng hưởng plasmon bề mặt dưới dạng TCB của hai biến thể của chất gắn kết CD3 (N100A và S100aA) để loại bỏ vị trí khử amit hóa

Khả năng gắn kết của hai 16D5 TCB có biến thể của chất gắn kết CD3 (N100A hoặc S100aA) với CD3 tái tổ hợp người (CD3epsilon-CD3delta heterodime dưới dạng thể dung hợp Fc) được đánh giá bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Tất cả các thử nghiệm SPR được thực hiện trên Biacore T200 ở nhiệt độ 25°C với HBS-EP làm dung dịch chạy (HEPES 0,01M độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%, Biacore, Freiburg/Đức).

Ái lực với CD3ed-Fc

Ái lực của tương tác giữa dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 và CD3 epsilon-delta heterodime tái tổ hợp được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 36).

Để đo ái lực, việc ghép cặp trực tiếp khoảng 6000 đơn vị cộng hưởng (RU) của kháng thể đặc hiệu kháng Fab người (bộ kit bắt Fab, GE Healthcare) được thực hiện trên chíp CM5 ở độ pH = 5,0 sử dụng bộ kit ghép cặp amin tiêu chuẩn (GE Healthcare). Dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 được bắt ở 200nM với tốc độ chảy bằng 20µl/phút trong 60 giây, tế bào dòng chảy đối chiếu được để lại mà không bắt. Dãy pha loãng (4,1 đến 3000nM) của thể dung hợp Fc của thụ thể folat 1 người và ở khỉ được cho đi qua trên tất cả các tế bào dòng chảy ở 30µl/phút trong 240 giây để ghi lại pha kết hợp. Pha phân ly được theo dõi trong 240 giây và được khởi phát bằng cách chuyển đổi từ dung dịch mẫu sang HBS-EP. Bề mặt chíp được tái tạo sau mỗi chu kỳ bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêm liều kép trong 60 giây Glyxin-HCl 10mM độ pH = 1,5. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu 1. Hằng số ái lực cho các tương tác có nguồn gốc từ hằng số tốc độ bằng cách điều chỉnh phù hợp với gắn kết Langmuir 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare).

Bảng 36: Gắn kết hóa trị một (ái lực) của hai biến thể khử amit 16D5 CD3 dưới dạng TCB trên CD3-Fc người.

Phối tử	Chất phân tích	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
16D5 TCB N100A	huCD3	1,23E+04	4,67E-03	380 nM
16D5 TCB S100aA	huCD3	1,21E+04	5,49E-03	460 nM
16D5 TCB	huCD3	2,03E+04	4,41E-03	220 nM

Hai biến thể khử amit CD3 có ái lực giảm nhẹ so với chất gắn kết CD3 kiểu dại (CH2527), nhưng chênh lệch không nghiêm trọng.

Ví dụ 40

Sản xuất và tinh chế hai biến thể của tế bào T 16D5 đặc hiệu kép có các đột biến để loại bỏ vị trí khử amit hóa trong chất gắn kết CD3: 16D5 TCB N100A, 16D5 TCB S100aA

Chuyển nhiễm và sản xuất tạm thời

Hai biến thể khử amit hóa 16D5 TCB được sản xuất tạm thời trong tế bào HEK293 EBNA bằng cách sử dụng quy trình chuyển nhiễm qua trung gian PEI đối với các vectơ được yêu cầu như được mô tả dưới đây. Tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy trong huyết thanh huyền phù tự do trong môi trường nuôi cấy CD CHO. Để sản xuất trong bình lắc 500ml, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm (đối với các quy mô thay thế tất cả các lượng được điều chỉnh theo đó). Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20ml môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng bằng 200µg ADN. Sau khi bổ sung 540µl dung dịch PEI được khuấy trong 15 giây và sau đó được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường CO_2 5%. Sau thời gian ủ, 160ml môi trường F17 được bổ sung và tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm axit valporic 1mM và Feed 1 7% được bổ sung. Sau 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, dung dịch được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22µM) và natri azit ở nồng độ cuối cùng là 0,01% trọng lượng/thể tích được bổ sung, và giữ ở nhiệt độ 4°C. Sau khi sản xuất phần dịch nổi trên bề mặt được thu

gom, được lọc thông qua thiết bị lọc vô trùng 0,22µM và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi tinh chế.

Tinh chế

Hai biến thể khử amit hóa 16D5 TCB được tinh chế trong hai bước bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn, như tinh chế ái lực protein A (Äkta Explorer) và sắc ký loại trừ kích cỡ. Phần dịch nổi trên bề mặt thu được từ sản xuất tạm thời được điều chỉnh đến độ pH = 8,0 (sử dụng TRIS 2M độ pH = 8,0) và được nạp vào MabSelect SuRe (GE Healthcare, thể tích cột (cv) = 2ml) được cân bằng với 8 thể tích cột (cv) *dung dịch đệm A* (natri phosphat 20mM độ pH = 7,5, natri xitrat 20mM). Sau khi rửa bằng 10 cv *dung dịch đệm A,* protein được rửa giải bằng cách sử dụng gradien pH đến *dung dịch đệm B* (natri xitrat 20mM độ pH = 3,0, NaCl 100mM, glyxin 100mM) trên 20 thể tích cột. Các phần chứa protein quan tâm được gộp lại và độ pH của dung dịch được điều chỉnh nhẹ đến độ pH = 6,0 (sử dụng Na_2HPO_4 0,5M độ pH = 8,0). Các mẫu được cô xuống còn 1ml bằng cách sử dụng thiết bị siêu cô đặc (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore) và sau đó được nạp vào bậc điều chế HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 (GE Healthcare) được cân bằng với histidin 20mM, độ pH = 6,0, NaCl 140mM. Thành phần kết tụ của các phần được rửa giải được phân tích bằng sắc ký phân tích loại trừ kích cỡ. Do đó, 30µl của mỗi phần được nạp vào cột phân tích loại trừ kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) được cân bằng trong K_2HPO_4 25mM, NaCl 125mM, L-arginin monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), độ pH = 6,7 dung dịch chạy ở nhiệt độ 25°C. Các phần chứa ít hơn 2% oligome được gộp lại. Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của các cấu trúc được phân tích bằng điện di mao dẫn SDS (CE-SDS) khi có và không có chất khử theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (công cụ thước đo LabChipGX, Perkin Elmer). Protein đã được tinh chế được làm đông trong N_2 lỏng và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Bảng 36: Hiệu suất, hàm lượng monome và độ tinh khiết bằng CE-SDS của hai biến thể khử amit hóa 16D5 trong mô hình đặc hiệu kép tế bào T.

Tên	Đột biến trong chất gắn kết CD3	Hiệu suất [mg/L]	Monome [%]	Độ tinh khiết bằng CE-SDS [%]
16D5 TCB	N100A	9	100	89
16D5	S100aA	23	100	83

TCB				
16D5 TCB	Kiểu dại	9	100	93

Cả hai TCB được sản xuất với chất lượng tốt, tương tự với cấu trúc có chất gắn kết CD3 kiểu dại.

Ví dụ 41

Sản xuất và tinh chế hai biến thể chất gắn kết 16D5 (D52dE và D52dQ) dưới dạng IgG để loại bỏ điểm tỏa nhiệt trong CDR

Chuyển nhiễm và sản xuất tạm thời

Hai IgG được sản xuất tạm thời trong tế bào HEK293 EBNA bằng cách sử dụng quy trình chuyển nhiễm qua trung gian PEI đối với các vectơ được yêu cầu như được mô tả dưới đây. Tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy trong huyết thanh huyền phù tự do trong môi trường nuôi cấy CD CHO. Để sản xuất trong bình lắc 500ml, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm (đối với các quy mô thay thế tất cả các lượng được điều chỉnh theo đó). Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20ml môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng bằng 200µg ADN. Sau khi bổ sung 540µl dung dịch PEI được khuấy trong 15 giây và sau đó được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường CO_2 5%. Sau thời gian ủ, 160ml môi trường F17 được bổ sung và tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm axit valporic 1mM và Feed 1 7% được bổ sung. Sau 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, dung dịch được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22µM) và natri azit ở nồng độ cuối cùng là 0,01% trọng lượng/thể tích được bổ sung, và giữ ở nhiệt độ 4°C. Sau khi sản xuất, các phần dịch nổi trên bề mặt được thu gom và kháng thể chứa phần dịch nổi trên bề mặt được lọc thông qua thiết bị lọc vô trùng 0,22µM và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi tinh chế.

Tinh chế kháng thể

Hai IgG được tinh chế trong hai bước bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn, như tinh chế ái lực protein A (Äkta Explorer) và sắc ký loại trừ kích cỡ. Phần dịch nổi trên bề mặt thu được từ sản xuất tạm thời được điều chỉnh đến độ pH = 8,0 (sử dụng TRIS 2M độ pH = 8,0) và được nạp vào POROS MabCapture A (Applied Biosystems, thể tích cột (cv) = 1ml) được cân bằng với 8 thể tích cột (cv) *dung dịch đệm A* (natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, độ pH = 7,5). Sau khi rửa bằng 10 cv *dung dịch đệm A,* protein được rửa giải bằng cách sử dụng bước pH đến *dung dịch đệm B* (natri xitrat 20mM độ pH = 3,0, NaCl 100mM, glyxin 100mM) trên 5 cv. 5ml chứa protein quan tâm được bảo quản trong vòng trên Äkta Explorer và sau đó được nạp vào HiLoad 16/60 Superdex™ 200 (GE Healthcare) được cân bằng với histidin 20mM, độ pH = 6,0, NaCl 140mM (không sử dụng TWEEn). Các phần chứa IgG được gộp lại và được cô bằng cách sử dụng thiết bị siêu cô đặc (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore). Thành phần kết tụ của bể cuối cùng được phân tích bằng sắc ký phân tích loại trừ kích cỡ. Do đó, 30µl được nạp vào cột phân tích loại trừ kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) được cân bằng trong K_2HPO_4 25mM, NaCl 125mM, L-arginin monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), độ pH = 6,7 dung dịch chạy ở nhiệt độ 25°C. Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của các cấu trúc được phân tích bằng điện di mao dẫn SDS (CE-SDS) khi có và không có chất khử theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (công cụ Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Protein đã được tinh chế được bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

Bảng 37: Hiệu suất, hàm lượng monome và độ tinh khiết bằng CE-SDS của hai biến thể điểm tỏa nhiệt 16D5 IgG.

Dòng vô tính	Đột biến HC/LC	Hiệu suất [mg/L}	Monome [%]	Độ tinh khiết bằng CE-SDS [%]
16D5	D52dE	24	100	96
16D5	D52dQ	20	100	96

Cả hai IgG được sản xuất tốt và với chất lượng tốt.

Ví dụ 42

Đặc trưng hóa sinh bằng cộng hưởng plasmon bề mặt của hai biến thể của chất gắn kết 16D5 (D52dE và D52dQ) dưới dạng IgG để loại bỏ điểm tỏa nhiệt trong CDR

Khả năng gắn kết của hai biến thể của chất gắn kết 16D5 (D52dE và D52dQ) dưới dạng IgG với thụ thể folat 1 tái tổ hợp người và ở khỉ đầu chó (cả hai đều dưới dạng thể dung hợp Fc) được đánh giá bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Tất cả các thử nghiệm SPR được thực hiện trên Biacore T200 ở nhiệt độ 25°C với HBS-EP làm dung dịch chạy (HEPES 0,01M độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%, Biacore, Freiburg/Đức).

1. Ái tính với thụ thể folat 1

Ái tính của tương tác giữa IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T và thụ thể folat tái tổ hợp được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 38).

Thể dung hợp Fc tái tổ hợp dạng monome được biotinyl hóa của người, thụ thể folat 1 ở khỉ đầu chó và chuột (FolR1-Fc) được ghép cặp trực tiếp trên chíp SA sử dụng hướng dẫn ghép cặp tiêu chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). Mức độ cố định là khoảng 160. IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T được cho đi qua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 3,7 đến 900nM với tốc độ dòng chảy là 30µl/phút thông qua tế bào dòng chảy trong 180 giây. Sự phân ly được theo dõi trong 600 giây. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu được cố định với thể dung hợp Fc của thụ thể IL2 chuột tái tổ hợp được biotinyl hóa. Đường cong gắn kết thu được từ gắn kết hóa trị hai của IgG hoặc đặc hiệu kép tế bào T được làm tròn đến gắn kết Langmuir 1:1 (dù là nó là gắn kết 1:2) và được điều chỉnh phù hợp với mô hình đó để có được KD biểu kiến tượng trưng cho ái tính của gắn kết hóa trị hai. Hằng số ái tính biểu kiến cho các tương tác có nguồn gốc từ hằng số tốc độ khi điều chỉnh phù hợp bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare).

Bảng 38: Gắn kết hóa trị hai (ái tính với KD biểu kiến) của hai biến thể điểm tỏa nhiệt 16D5 dưới dạng IgG trên FolR1 ở người, chuột và khỉ đầu chó (không có gắn kết trên muFolR1 như được mong đợi).

Chất phân tích	Phối tử	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD biểu kiến
16D5 D52dE IgG	huFolR1	1,62E+05	5,45E-04	3,4 nM
	cyFolR1	2,98E+06	7,47E-03	2,5 nM
16D5 D52dQ IgG	huFolR1	8,40E+04	7,75E-04	9,2 nM
	cyFolR1	4,12E+05	2,04E-03	5 nM

16D5 TCB	huFolR1	2,25E+05	5,00E-04	2,2 nM
	cyFolR1	2,71E+05	6,63E-04	2,5 nM

2. Ái lực với thụ thể folat 1

Ái lực của tương tác giữa IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T và thụ thể folat tái tổ hợp được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 39).

Để đo ái lực, việc ghép cặp trực tiếp khoảng 10000 đơn vị cộng hưởng (RU) của kháng thể đặc hiệu kháng Fab người (bộ kit bắt Fab, GE Healthcare) được thực hiện trên chíp CM5 ở độ pH = 5,0 sử dụng bộ kit ghép cặp amin tiêu chuẩn (GE Healthcare). IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T được bắt ở 20nM với tốc độ chảy bằng 10µl/phút trong 40 giây, tế bào dòng chảy đối chiếu được để lại mà không bắt. Dãy pha loãng (12,35 đến 3000nM) của thể dung hợp Fc của thụ thể folat 1 người và ở khỉ đầu chó được cho đi qua trên tất cả các tế bào dòng chảy ở 30µl/phút trong 240 giây để ghi lại pha kết hợp. Pha phân ly được theo dõi trong 300 giây và được khởi phát bằng cách chuyển đổi từ dung dịch mẫu sang HBS-EP. Bề mặt chíp được tái tạo sau mỗi chu kỳ bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêm liều kép trong 60 giây Glyxin-HCl 10mM độ pH = 1,5. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu 1. Hằng số ái lực cho các tương tác có nguồn gốc từ hằng số tốc độ bằng cách điều chỉnh phù hợp với gắn kết Langmuir 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare).

Bảng 39: Gắn kết hóa trị một (ái lực) của hai biến thể điểm tỏa nhiệt 16D5 dưới dạng IgG trên FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó.

Phối tử	Chất phân tích	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
16D5 D52dE IgG	huFolR1	2,40E+04	2,27E-03	95 nM
	cyFolR1	2,25E+04	1,20E-02	530 nM
16D5 D52dQ IgG	huFolR1	6,97E+03	1,62E-03	230 nM
	cyFolR1	8,20E+03	3,32E-03	410nM
16D5 TCB	huFolR1	2,05E+04	7,05E-04	35 nM
	cyFolR1	1,72E+04	1,62E-03	90 nM

Hai biến thể điểm tỏa nhiệt 16D5 có ái tính (gắn kết hóa trị hai) tương tự so với chất gắn kết 16D5 kiểu dại. Ái tính được làm giảm nhẹ đối với biến thể D52dQ và chênh lệch này thậm chí dễ thấy được hơn ở ái lực (gắn kết hóa trị một).

Ví dụ 43

Sản xuất và tinh chế dưới dạng IgG của mười hai biến thể của chất gắn kết 16D5 có các đột biến trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ để làm giảm ái lực với FolR1

Chuyển nhiễm và sản xuất tạm thời

Mười hai IgG được sản xuất tạm thời trong tế bào HEK293 EBNA bằng cách sử dụng quy trình chuyển nhiễm qua trung gian PEI đối với các vectơ được yêu cầu như được mô tả dưới đây. Tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy trong huyết thanh huyền phù tự do trong môi trường nuôi cấy CD CHO. Để sản xuất trong bình lắc 500ml, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm (đối với các quy mô thay thế, tất cả các lượng được điều chỉnh theo đó). Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20ml môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng bằng 200µg ADN. Sau khi bổ sung 540µl dung dịch PEI được khuấy trong 15 giây và sau đó được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường CO_2 5%. Sau thời gian ủ, 160ml môi trường F17 được bổ sung và tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm axit valporic 1mM và Feed 1 7% được bổ sung. Sau 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, dung dịch được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22µM) và natri azit ở nồng độ cuối cùng là 0,01% trọng lượng/thể tích được bổ sung, và giữ ở nhiệt độ 4°C. Sau khi sản xuất phần dịch nổi trên bề mặt được thu gom và kháng thể chứa phần dịch nổi trên bề mặt được lọc thông qua thiết bị lọc vô trùng 0,22µM và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho đến khi tinh chế.

Tinh chế kháng thể

Tất cả các phân tử được tinh chế trong hai bước bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn, như tinh chế ái lực protein A (Äkta Explorer) và sắc ký loại trừ kích cỡ. Phần dịch nổi trên bề mặt thu được từ sản xuất tạm thời được điều chỉnh đến độ pH = 8,0 (sử dụng TRIS 2M độ pH = 8,0) và được nạp vào POROS MabCapture A (Applied Biosystems, thể tích cột (cv) = 1 ml) được cân bằng với 8 thể tích cột (cv) *dung dịch đệm A* (natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, độ pH = 7,5). Sau khi rửa bằng 10 cv

dung dịch đệm A, protein được rửa giải bằng cách sử dụng bước độ pH đến *dung dịch đệm B* (natri xitrat 20mM độ pH = 3,0, NaCl 100mM, glyxin 100mM) trên 5 cv. 5ml chứa protein quan tâm được bảo quản trong vòng trên Äkta Explorer và sau đó được nạp vào HiLoad 16/60 Superdex™ 200 (GE Healthcare) được cân bằng với histidin 20mM, độ pH = 6,0, NaCl 140mM, Tween-20 0,01%. Các phần chứa IgG được gộp lại và được cô bằng cách sử dụng thiết bị siêu cô đặc (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore). Thành phần kết tụ của bể cuối cùng được phân tích bằng sắc ký phân tích loại trừ kích cỡ. Do đó, 30µl được nạp vào cột phân tích loại trừ kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) được cân bằng trong K_2HPO_4 25mM, NaCl 125mM, L-arginin monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), độ pH = 6,7 dung dịch chạy ở nhiệt độ 25°C. Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của các cấu trúc được phân tích bằng điện di mao dẫn SDS (CE-SDS) khi có và không có chất khử theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (công cụ Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Protein đã được tinh chế được bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

Bảng 40: Hiệu suất, hàm lượng monome và độ tinh khiết bằng CE-SDS của mười hai biến thể 16D5 IgG

Dòng vô tính	Đột biến HC/LC	Hiệu suất [mg/L}	Monome [%]	Độ tinh khiết bằng CE-SDS [%]
16D5	W98Y/wt	32	100	100
16D5	W98Y/K53A	24	100	100
16D5	S35H/wt	21	100	100
16D5	S35H/K53A	18	100	100
16D5	S35H/S93A	18	100	100
16D5	W96Y/wt	40	100	100
16D5	W96Y/K53A	21	100	100
16D5	W96Y/S93A	25	98	100
16D5	R50S/K53A	10	98	100
16D5	R50S/S93A	7	100	100
16D5	G49S/K53A	42	100	100
16D5	G49S/S93A	45	100	100

Tất cả mười hai IgG được sản xuất tốt và có chất lượng tốt.

Ví dụ 44

Đặc trưng hóa sinh các biến thể tổ hợp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ 16D5 dưới dạng IgG bằng cộng hưởng plasmon bề mặt

Khả năng gắn kết của chất gắn kết biến thể tổ hợp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ FolR1 16D5 dưới dạng IgG với các thụ thể folat tái tổ hợp khác nhau (FolR1 ở người, ở chuột và ở khỉ đầu chó; tất cả đều dưới dạng thể dung hợp Fc) được đánh giá bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Tất cả các thử nghiệm SPR được thực hiện trên Biacore T200 ở nhiệt độ 25°C với HBS-EP làm dung dịch chạy (HEPES 0,01M độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%, Biacore, Freiburg/Đức).

Ái tính với thụ thể folat 1

Ái tính của tương tác giữa IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T và thụ thể folat tái tổ hợp được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 41).

Thể dung hợp Fc tái tổ hợp dạng monome được biotinyl hóa của người, thụ thể folat 1 ở khỉ đầu chó và chuột (FolR1-Fc) được ghép cặp trực tiếp trên chíp SA bằng cách sử dụng hướng dẫn ghép cặp tiêu chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). Mức độ cố định là khoảng 300. IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T được cho đi qua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 11,1 đến 900nM với tốc độ dòng chảy là 30µl/phút thông qua tế bào dòng chảy trong 180 giây. Sự phân ly được theo dõi trong 240 hoặc 600 giây. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu được cố định với thể dung hợp Fc của thụ thể IL2 chuột tái tổ hợp được biotinyl hóa. Đường cong gắn kết thu được từ gắn kết hóa trị hai của IgG hoặc dạng đặc hiệu kép tế bào T được làm tròn thành gắn kết Langmuir 1:1 (dù là nó là gắn kết 1:2) và được điều chỉnh phù hợp với mô hình đó để có được KD biểu kiến tượng trưng cho ái tính của gắn kết hóa trị hai. Hằng số ái tính biểu kiến cho các tương tác có nguồn gốc từ hằng số tốc độ khi điều chỉnh phù hợp bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare). Đối với động học ái lực thấp có pha kết hợp và pha phân ly quá nhanh để được điều chỉnh phù hợp bằng mô hình gắn kết Langmuir 1:1, mô hình phân tích trạng thái ổn định được áp dụng bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare). Việc phân tích trạng thái ổn định tạo KD của phản ứng gắn kết ở trạng thái cân bằng.

Bảng 41: Gắn kết hóa trị hai (ái tính với KD biểu kiến) của mười hai biến thể của chất gắn kết 16D5 dưới dạng IgG trên FolR1 ở người, chuột và khỉ đầu chó.

Chất phân tích biến thể HC/biến thể LC	Phối tử	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD biểu kiến
W98Y/K53A	huFolR1			Gắn kết yếu
	cyFolR1			Gắn kết yếu
S35H/K53A	huFolR1	2,10E+04	2,91E-02	1400nM
	cyFolR1	3,47E+04	4,04E-02	1100nM
W96Y/K53A	huFolR1			580 nM (trạng thái ổn định)
	cyFolR1			660 nM (trạng thái ổn định)
W98Y/wt	huFolR1	1,36E+05	3,28E-02	240 nM
	cyFolR1	1,71E+05	3,61E-02	200nM
S35H/S93A	huFolR1	2,43E+05	2,20E-02	90 nM
	cyFolR1	6,12E+05	6,77E-02	110nM
G49S/K53A	huFolR1	1,90E+05	1,15E-02	60 nM
	cyFolR1	3,93E+05	3,28E-02	80 nM
R50S/K53A	huFolR1	3,28E+05	1,97E-02	60 nM
	cyFolR1	5,50E+05	4,55E-02	80 nM
S35H/wt	huFolR1	1,32E+05	5,68E-03	40 nM
	cyFolR1	2,23E+05	1,24E-02	55 nM
R50S/S93A	huFolR1	1,25E+05	3,23E-03	30 nM
	cyFolR1	4,39E+05	7,80E-03	20 nM
W96Y/S93A	huFolR1	6,55E+05	1,89E-02	30 nM
	cyFolR1	6,25E+05	1,74E-02	30 nM
G49S/S93A	huFolR1	1,52E+05	3,06E-03	20 nM
	cyFolR1	3,58E+05	6,22E-03	20 nM
W96Y/wt	huFolR1	1,29E+05	2,13E-03	20 nM
	cyFolR1	1,73E+05	2,11E-03	10nM
36F2 TCB	huFolR1	2,44E+06	1,37E-02	6 nM
	cyFolR1	4,12E+06	2,15E-02	5 nM
	muFolR1	4,86E+05	1,20E-03	2,5 nM
16D5 TCB	huFolR1	1,41E+05	4,25E-04	3 nM
	cyFolR1	1,78E+05	6,39E-04	3,5 nM

Ái lực với thụ thể folat 1

Ái lực của tương tác giữa IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T và thụ thể folat tái tổ hợp được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 42).

Để đo ái lực, việc ghép cặp trực tiếp khoảng 10000 đơn vị cộng hưởng (RU) của kháng thể đặc hiệu Fab kháng người (bộ kit bắt Fab, GE Healthcare) được thực hiện trên chíp CM5 ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin tiêu chuẩn (GE Healthcare). IgG kháng FolR1 hoặc đặc hiệu kép tế bào T được bắt ở 200nM với tốc độ chảy bằng 10ul/phút trong 40 giây, tế bào dòng chảy đối chiếu được để lại mà không bắt. Dãy pha loãng (12,35 đến 3000nM) của thể dung hợp Fc của thụ thể folat 1 người được cho đi qua trên tất cả các tế bào dòng chảy ở 30µl/phút trong 240 giây để ghi lại pha kết hợp. Pha phân ly được theo dõi trong 300 giây và được khởi phát bằng cách chuyển đổi từ dung dịch mẫu sang HBS-EP. Bề mặt chíp được tái tạo sau mỗi chu kỳ bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêm liều kép trong 60 giây Glyxin-HCl 10mM độ pH = 1,5. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu 1. Hằng số ái lực cho các tương tác có nguồn gốc từ hằng số tốc độ bằng cách điều chỉnh phù hợp với gắn kết Langmuir 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare).

Bảng 42: Gắn kết hóa trị một (ái lực) của mười hai biến thể 16D5 của chất gắn kết FolR1 dưới dạng IgG trên FolR1 ở người, khỉ đầu chó và chuột.

Phối tử Biến thể HC/biến thể LC	Chất phân tích	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
W98Y/K53A	huFolR1			Không có gắn kết
S35H/K53A	huFolR1			Gắn kết yếu
W96Y/K53A	huFolR1			Gắn kết yếu
W98Y/wt	huFolR1			5400nM (trạng thái ổn định)
G49S/K53A	huFolR1	9,19E+03	1,74E-02	1900nM
R50S/K53A	huFolR1	1,35E+04	2,45E-02	1800nM
36F2 TCB	huFolR1	5,00E+04	8,57E-02	1700nM
S35H/S93A	huFolR1	8,43E+03	1,12E-02	1300nM
S35H/wt	huFolR1	8,96E+03	1,13E-02	1200nM
R50S/S93A	huFolR1	1,57E+04	1,23E-02	780 nM
G49S/S93A	huFolR1	1,05E+04	7,99E-03	760 nM
W96Y/wt	huFolR1	9,95E+03	5,44E-03	550 nM
W96Y/S93A	huFolR1	4,05E+04	1,72E-02	420 nM
16D5 TCB	huFolR1	1,18E+04	7,22E-04	60 nM

Mười hai biến thể "ái lực giảm" của chất gắn kết 16D5 FolR1 được phân tích bằng cộng hưởng plasmon bề mặt so với chất gắn kết kiểu dại 16D5 và chất gắn kết 36F2. Mục đích là để tìm ra biến thể 16D5 có ái lực và ái tính so sánh được với 36F2. Khi xác định gắn kết hóa trị một (ái lực) có các biến thể có ái lực cao hơn và các biến thể có ái lực thấp hơn so với 36F2. Tuy nhiên, trong gắn kết hóa trị hai (ái tính), tất cả các biến thể có giá trị KD biểu kiến cao hơn so với 36F2. Điều này chủ yếu là do tốc độ kết hợp (ka) nhanh của 36F2 mà dẫn đến KD biểu kiến nhỏ đối với 36F2. Tác dụng ái tính lớn khi 36F2 gắn kết hóa trị hai dường như duy nhất đối với chất gắn kết này. Như được lưu ý trên đây, 36F2 là chất gắn kết phản ứng chéo ở người, chuột và khỉ đầu chó duy nhất có thể được nhận biết.

Ví dụ 45

Gắn kết các biến thể 16D5 HC/LC với FolR1 ở người được biểu hiện trên tế bào HeLa

Khả năng gắn kết của 36F2 TCB, 16D5 TCB và các biến thể HC/LC khác nhau của 16D5 với FolR1 ở người được đánh giá trên tế bào HeLa. Nói một cách ngắn gọn, các tế bào được thu gom, được đếm, được kiểm tra về khả năng sống và được tái tạo huyền phù ở $2x10^6$ tế bào/ml trong dung dịch đệm FACS (100µl PBS BSA 0,1%). 100µl huyền phù tế bào (chứa $0,2x10^6$ tế bào) được ủ trong đĩa đáy tròn 96 giếng trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C ở các nồng độ khác nhau của kháng thể đặc hiệu kép (229pM - 500nM). Sau hai bước rửa bằng PBS lạnh BSA 0,1%, các mẫu được ủ lại trong 30 phút nữa ở nhiệt độ 4°C với kháng thể thứ cấp đặc hiệu mảnh Fcg ở dê kháng IgG người mảnh AffiniPure F(ab')2 được tiếp hợp PE (Jackson Immuno Research Lab PE #109-116-170). Sau khi rửa các mẫu hai lần bằng PBS lạnh BSA 0,1%, chúng được cố định bằng PFA 1% qua đêm. Sau đó các mẫu được ly tâm, được tái tạo huyền phù trong PBS BSA 0,1% và được phân tích bằng FACS bằng cách sử dụng FACS CantoII (phần mềm FACS Diva). Đường cong gắn kết thu được bằng cách sử dụng GraphPadPrism6 (Fig.32A-E). 36F2 TCB gắn kết FolR2, không được dung nạp tốt ở chuột nhắt, và không biểu hiện độ hiệu nghiệm mong muốn.

Ví dụ 46

Sản xuất và tinh chế bốn biến thể của dạng đặc hiệu kép tế bào T 16D5 có các đột biến để làm giảm ái lực với FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó: 16D5 TCB G49S/S93A, G49S/K53A, W96Y, W96Y/D52E

Chuyển nhiễm và sản xuất tạm thời

Bốn biến thể bổ sung của 16D5 TCB được làm giảm ái lực đối với FolR1 được sản xuất tạm thời trong tế bào HEK293 EBNA bằng cách sử dụng quy trình chuyển nhiễm qua trung gian PEI đối với các vectơ được yêu cầu như được mô tả dưới đây. Để chuyển nhiễm, tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy trong huyết thanh huyền phù tự do trong môi trường nuôi cấy Excell chứa L-Glutamin 6mM và môi trường nuôi cấy G418 250mg/l. Để sản sinh trong 600ml bình ống xoay (thể tích vận hành tối đa 400mL) 600 triệu tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20ml môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng bằng 400µg ADN. Sau khi bổ sung 1080µl dung dịch PEI (2,7µg/ml) được khuấy trong 15 giây và sau đó được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình ống xoay 600ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường CO_2 5%. Sau thời gian ủ 360ml Excell + L-Glutamin 6mM + Pepsoy 5g/L + môi trường VPA 1,0mM được bổ sung và các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm Feed 7 7% được bổ sung. Sau 7 ngày phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong 20 - 30 phút ở 36000 m/s^2 (ly tâm Sigma 8K), dung dịch được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22mm) và natri azit ở nồng độ cuối cùng là 0,01% trọng lượng/thể tích được bổ sung, và giữ ở nhiệt độ 4°C.

Tinh chế

Biến thể ái lực giảm 16D5 TCB được tinh chế trong hai bước bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn, như tinh chế ái lực protein A (Äkta Explorer) và sắc ký loại trừ kích cỡ. Phần dịch nổi trên bề mặt thu được từ sản xuất tạm thời được điều chỉnh đến độ pH = 8,0 (sử dụng TRIS 2M độ pH = 8,0) và được nạp vào HiTrap Protein A (GE Healthcare, thể tích cột (cv) = 5 ml) được cân bằng với 8 thể tích cột (cv) *dung dịch đệm A* (natri phosphat 20mM độ pH = 7,5, natri xitrat 20mM). Sau khi rửa bằng 10 cv *dung dịch đệm A,* protein được rửa giải bằng cách sử dụng gradien pH đến *dung dịch đệm B* (natri xitrat 20mM độ pH = 3,0, NaCl 100mM, glyxin 100mM) trên 20 thể tích cột. Các phần chứa protein quan tâm được gộp lại và độ pH của dung dịch được điều chỉnh nhẹ đến độ pH = 6,0 (sử dụng Na_2HPO_4 0,5M độ pH = 8,0). Các mẫu được cô xuống còn 1ml

bằng cách sử dụng thiết bị siêu cô đặc (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore) và sau đó được nạp vào bậc điều chế HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 (GE Healthcare) được cân bằng với histidin 20mM, độ pH = 6,0, NaCl 140mM, Tween 20 0,01%. Thành phần kết tụ của các phần được rửa giải được phân tích bằng sắc ký phân tích loại trừ kích cỡ. Do đó, 30µl mỗi phần được nạp vào cột phân tích loại trừ kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) được cân bằng trong K_2HPO_4 25mM, NaCl 125mM, L-arginin monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), độ pH = 6,7 dung dịch chạy ở nhiệt độ 25°C. Các phần chứa ít hơn 2% oligome được gộp lại. Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của các cấu trúc được phân tích bằng điện di mao dẫn SDS (CE-SDS) khi có và không có chất khử theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (công cụ Thước đo LabChipGX, Perkin Elmer). Protein đã được tinh chế được làm đông trong N_2 lỏng và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Bảng 43: Hiệu suất, hàm lượng monome và độ tinh khiết bằng CE-SDS của các biến thể 16D5 ái lực giảm trong mô hình đặc hiệu kép tế bào T.

Tên	Đột biến để làm giảm ái lực	Hiệu suất [mg/L]	Monome [%]	Độ tinh khiết bằng CE-SDS [%]
16D5 TCB	G49S S93A	10,3	100	88
16D5 TCB	G49S K53A	22,3	98,5	96
16D5 TCB	W96Y	15,2	98,7	92,5
16D5 TCB	W96Y D52E	9,9	99,3	92,9
16D5 TCB	Kiểu dại	5,4	96	91,6

Tất cả các biến thể có ái lực giảm có thể được tạo ra với chất lượng tốt.

Ví dụ 47

Gắn kết 36F2 TCB, 16D5 TCB và hai biến thể ái lực giảm 16D5 16D5 W96Y/D52E TCB và 16D5 G49S/S93A TCB với FolR1 ở người được biểu hiện trên tế bào HeLa

Khả năng gắn kết của 36F2 TCB, 16D5 TCB và hai biến thể ái lực giảm 16D5 16D5 W96Y/D52E TCB và 16D5 G49S/S93A TCB với FolR1 ở người được đánh giá trên tế bào HeLa. Nói một cách ngắn gọn, các tế bào được thu gom, được đếm, được kiểm tra về khả năng sống và được tái tạo huyền phù ở $2x10^6$ tế bào/ml trong dung dịch đệm FACS (100µl PBS BSA 0,1%). 100µl huyền phù tế bào (chứa $0,2x10^6$ tế bào) được ủ trong đĩa đáy tròn 96 giếng trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C ở các nồng độ khác nhau của kháng thể đặc hiệu kép (30pM - 500nM). Sau hai bước rửa bằng PBS lạnh BSA 0,1%,

các mẫu được ủ lại trong 30 phút nữa ở nhiệt độ 4°C với kháng thể thứ cấp đặc hiệu mảnh Fcg IgG ở dê kháng người mảnh AffiniPure F(ab')2 tiếp hợp với FITC (Jackson Immuno Research Lab PE #109-096-098). Sau khi rửa các mẫu hai lần bằng PBS lạnh BSA 0,1%, các mẫu được ly tâm, được tái tạo huyền phù trong PBS BSA 0,1% và được phân tích bằng FACS sử dụng FACS CantoII (phần mềm FACS Diva). Đường cong gắn kết thu được bằng cách sử dụng GraphPadPrism6 (Fig.33).

Ví dụ 48

Sản xuất và tinh chế ba dạng đặc hiệu kép tế bào T có ái lực trung bình với FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó: 14B1, 6E10, 2C7

Chuyển nhiễm và sản xuất tạm thời

TCB ái lực trung bình được sản xuất tạm thời trong tế bào HEK293 EBNA bằng cách sử dụng quy trình chuyển nhiễm qua trung gian PEI đối với các vectơ được yêu cầu như được mô tả dưới đây. Để chuyển nhiễm, tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy trong huyết thanh huyền phù tự do trong môi trường nuôi cấy Excell chứa L-Glutamin 6mM và 250 mg/l môi trường nuôi cấy G418. Để sản sinh trong bình ống xoay 600ml (thể tích vận hành tối đa 400mL), 600 triệu tế bào HEK293 EBNA được nuôi cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2, phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20ml môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện được trộn trong 20ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng bằng 400µg ADN. Sau khi bổ sung 1080µl dung dịch PEI (2,7µg/ml) được khuấy trong 15 giây và sau đó được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình ống xoay 600ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường CO_2 5%. Sau thời gian ủ 360ml Excell + L-Glutamin 6mM + Pepsoy 5g/L + môi trường VPA 1,0mM được bổ sung và các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, Feed 7 7% được bổ sung. Sau 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy được gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong 20 - 30 phút ở tốc độ 36000 m/s^2 (ly tâm Sigma 8K), dung dịch được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22µm) và natri azit ở nồng độ cuối cùng là 0,01% trọng lượng/thể tích được bổ sung, và giữ ở nhiệt độ 4°C.

Tinh chế

TCB ái lực trung bình được tinh chế trong hai bước bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn, như tinh chế ái lực protein A (Äkta Explorer) và sắc ký loại trừ kích cỡ. Phần dịch nổi trên bề mặt thu được từ sản xuất tạm thời được điều chỉnh đến độ pH = 8,0 (sử dụng TRIS 2M độ pH = 8,0) và được nạp vào HiTrap Protein A (GE Healthcare, thể tích cột (cv) = 5ml) được cân bằng với 8 thể tích cột (cv) *dung dịch đệm A* (natri phosphat 20mM độ pH = 7,5, natri xitrat 20mM). Sau khi rửa bằng 10 cv *dung dịch đệm A,* protein được rửa giải bằng cách sử dụng gradien pH đến *dung dịch đệm B* (natri xitrat 20mM độ pH = 3,0, NaCl 100mM, glyxin 100mM) trên 20 thể tích cột. Các phần chứa protein quan tâm được gộp lại và độ pH của dung dịch được điều chỉnh nhẹ đến độ pH = 6,0 (sử dụng Na_2HPO_4 0,5M độ pH = 8,0). Các mẫu được cô xuống còn 1ml bằng cách sử dụng thiết bị siêu cô đặc (Amicon Ultra-15, 30.000 MWCO, Millipore) và sau đó được nạp vào cột loại điều chế HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 (GE Healthcare) được cân bằng với histidin 20mM, độ pH = 6,0, NaCl 140mM, Tween 20 0,01%. Thành phần kết tụ của các phần được rửa giải được phân tích bằng sắc ký phân tích loại trừ kích cỡ. Do đó, 30µl mỗi phần được nạp vào cột phân tích loại trừ kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Toso h) được cân bằng trong K_2HPO_4 25mM, NaCl 125mM, L-arginin monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), độ pH = 6,7 dung dịch chạy ở nhiệt độ 25°C. Các phần chứa ít hơn 2% oligome được gộp lại. Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở 280nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của các cấu trúc được phân tích bằng điện di mao dẫn SDS (CE-SDS) khi có và không có chất khử theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (công cụ Caliper LabChipGX, Perkin Elmer). Protein đã được tinh chế được làm đông trong N_2 lỏng và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Bảng 44: Hiệu suất, hàm lượng monome và độ tinh khiết bằng CE-SDS của TCB ái lực trung bình.

Tên	Hiệu suất [mg/L]	Monome [%]	Độ tinh khiết bằng CE-SDS [%]
6E10 TCB	2,3	93	95
14B1 TCB	1,8	94	70
9C7 TCB	3,4	98	99

Tất cả các dạng đặc hiệu kép tế bào T ái lực trung bình có thể được sản xuất. Hiệu suất không cao. Chất lượng là tốt đối với 9C7 và chấp nhận được đối với 14B1 và 6E10.

Ví dụ 49

Gắn kết các biến thể 16D5 HC/LC với FolR1 ở người được biểu hiện trên tế bào HT-29

Khả năng gắn kết của 36F2 TCB, 16D5 TCB và các biến thể HC/LC khác nhau (Fig.34A-E) của 16D5 với FolR1 ở người được đánh giá trên tế bào HT-29. Nói một cách ngắn gọn, các tế bào được thu gom, được đếm, được kiểm tra về khả năng sống và được tái tạo huyền phù ở $2x10^6$ tế bào/ml trong dung dịch đệm FACS (100µl PBS BSA 0,1%). 100µl huyền phù tế bào (chứa $0,2x10^6$ tế bào) được ủ trong đĩa đáy tròn 96 giếng trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C ở các nồng độ khác nhau của kháng thể đặc hiệu kép (229pM - 500nM). Sau hai bước rửa bằng PBS lạnh BSA 0,1%, các mẫu được ủ lại trong 30 phút nữa ở nhiệt độ 4°C với kháng thể thứ cấp đặc hiệu mảnh Fcg dê kháng IgG người mảnh AffiniPure F(ab')2 được tiếp hợp PE (Jackson Immuno Research Lab PE #109-116-170). Sau khi rửa các mẫu hai lần bằng PBS lạnh BSA 0,1%, chúng được cố định bằng PFA 1% qua đêm. Sau đó các mẫu được ly tâm, được tái tạo huyền phù trong PBS BSA 0,1% và được phân tích bằng FACS bằng cách sử dụng FACS CantoII (phần mềm FACS Diva). Đường cong gắn kết thu được bằng cách sử dụng GraphPadPrism6 (Fig.34A-E).

Ví dụ 50

Gắn kết chất gắn kết FolR1 trung bình với FolR1 và FolR2 ở người và chuột nhắt

Khả năng phản ứng chéo của chất gắn kết FolR1 trung bình (6E10 TCB, 14B1 TCB và 9C7 TCB), cũng như 16D5 TCB và 36F2 TCB với FolR1 và FolR2 ở người và chuột nhắt được đánh giá trong thử nghiệm gắn kết FACS trên tế bào HEK293T được chuyển nhiễm.

Nói một cách ngắn gọn, các tế bào được thu gom, được đếm, được kiểm tra về khả năng sống và được tái tạo huyền phù ở $2x10^6$ tế bào/ml trong dung dịch đệm FACS (100µl PBS BSA 0,1%). 100µl huyền phù tế bào (chứa $0,2x10^6$ tế bào) được ủ trong đĩa đáy tròn 96 giếng trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C với 100nM kháng thể đặc hiệu kép. Sau hai bước rửa bằng PBS lạnh BSA 0,1%, các mẫu được ủ lại trong 30 phút nữa ở nhiệt độ 4°C với kháng thể thứ cấp đặc hiệu mảnh Fcγ dê kháng IgG người mảnh Fluorescein (FITC) AffiniPure $F(ab')_2$ (Jackson Immuno Research Lab PE #109-096-098). Sau khi rửa các mẫu hai lần bằng PBS lạnh BSA 0,1%, chúng được cố định bằng PFA 1% qua đêm. Sau đó các mẫu được ly tâm, được tái tạo huyền phù trong PBS BSA 0,1% và được phân tích bằng FACS bằng cách sử dụng FACS CantoII (phần mềm FACS Diva). Các sơ đồ thu được bằng cách sử dụng GraphPadPrism6 (Fig.35A-D).

Các kết quả cho thấy rằng 36F2 TCB và 14B1 TCB phản ứng chéo với FolR1 ở chuột nhắt và FolR2 ở người và chuột nhắt. Đối với 6E10 TCB, gắn kết yếu với FolR2 ở người có thể quan sát được. 16D5 TCB và 9C7 TCB đặc hiệu đối với FolR1 ở người và không thể hiện sự phản ứng chéo với FolR1 ở chuột nhắt hoặc FolR2 ở người và chuột nhắt.

Ví dụ 51

Đặc trưng hóa sinh bằng cộng hưởng plasmon bề mặt của biến thể ái lực giảm 16D5 và các chất gắn kết ái lực trung bình bổ sung trong mô hình đặc hiệu kép tế bào T

Khả năng gắn kết của biến thể ái lực giảm 16D5 kháng FolR1 và các chất gắn kết ái lực trung bình bổ sung trong mô hình đặc hiệu kép tế bào T hóa trị hai với thụ thể folat 1 ở người, khỉ đầu chó và chuột tái tổ hợp (tất cả dưới dạng thể dung hợp Fc) được đánh giá bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Tất cả các thử nghiệm SPR được thực hiện trên Biacore T200 ở nhiệt độ 25°C với HBS-EP làm dung dịch chạy (HEPES 0,01M độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%, Biacore, GE Healthcare). Phân tử được sử dụng để xác định ái lực và ái tính được mô tả trong Bảng 45.

Bảng 45: Tên, mô tả và hình vẽ tham chiếu của chín cấu trúc được sử dụng trong phân tích SPR.

Tên	Mô tả	Hình vẽ tham chiếu
Biến thể ái lực giảm 16D5 16D5 TCB 16D5 G49S/S93A TCB 16D5 G49S/K53A TCB 16D5 W96Y TCB 16D5 W96Y/D52E TCB	Mô hình nghịch chuyển đặc hiệu kép tế bào T 2+1(chuỗi nhẹ chung)	Fig.1A
Chất gắn kết ái lực trung bình 36F2 TCB 6E10 TCB 14B1 TCB 9C7 TCB	Mô hình nghịch chuyển đặc hiệu kép tế bào T 2+1, crossfab	Fig.1F

Tiêm liều đơn

Trước tiên, TCB kháng FolR1 được phân tích bằng cách tiêm liều đơn (Bảng 46) để đặc trưng khả năng phản ứng chéo (với FolR1 ở người, chuột và khỉ đầu chó) và độ đặc hiệu (với FolR1 ở người, FolR2 ở người, FolR3 ở người) của chúng. Thể dung hợp

Fc tái tổ hợp dạng monome được biotinyl hóa của người, thụ thể folat 1 ở khỉ đầu chó và chuột (FolR1-Fc) hoặc thụ thể folat 2 và 3 của người (FolR2-Fc, FolR3-Fc) được ghép cặp trực tiếp trên chíp SA bằng cách sử dụng hướng dẫn ghép cặp tiêu chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). Mức độ cố định là khoảng 300-400 RU. TCB được tiêm trong 60 giây ở nồng độ 500nM.

Bảng 46: Khả năng phản ứng chéo và độ đặc hiệu của 7 dạng đặc hiệu kép tế bào T của thụ thể folat 1. + có nghĩa là gắn kết, - có nghĩa là không có gắn kết, +/- có nghĩa là gắn kết yếu.

Tên dòng vô tính	Gắn kết với huFolR1	Gắn kết với cyFolR1	Gắn kết với muFolR1	Gắn kết với huFolR2	Gắn kết với huFolR3
16D5 TCB	+	+	-	-	-
16D5 G49S/S93A TCB	+	+	-	-	-
16D5 W96Y/D52E TCB	+	+	-	-	-
36F2 TCB	+	+	+	+/-	-
6E10 TCB	+	+	-	-	-
14B1 TCB	+	+	+	+/-	-
9C7 TCB	+	+	-	-	-

Ái tính với thụ thể folat 1

Ái tính của tương tác giữa các dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 và thụ thể folat tái tổ hợp được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 47).

Thể dung hợp Fc tái tổ hợp dạng monome được biotinyl hóa của người, thụ thể folat 1 ở khỉ đầu chó và chuột (FolR1-Fc) được ghép cặp trực tiếp trên chíp SA bằng cách sử dụng hướng dẫn ghép cặp tiêu chuẩn (Biacore, GE Healthcare). Mức độ cố định là khoảng 200-300 RU. Dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 được cho đi qua ở nồng độ nằm trong khoảng từ 11,1 đến 900nM (đối với biến thể ái lực giảm 16D5) hoặc 0,2 đến 500nM (đối với các chất gắn kết ái lực trung bình bổ sung và 36F2) với tốc độ dòng chảy là 30µl/phút qua tế bào dòng chảy trong 180 giây. Sự phân ly được theo dõi trong 240 hoặc 600 giây. Bề mặt chíp được tái tạo sau mỗi chu kỳ bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêm liều kép trong 30 giây Glyxin-HCl 10mM độ pH = 1,5. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu được cố định với thể dung hợp Fc IL2R chuột được biotinyl hóa tái tổ hợp (thụ thể được

dung hợp Fc không liên quan). Đường cong gắn kết thu được từ gắn kết hóa trị hai của dạng đặc hiệu kép tế bào T được làm tròn thành gắn kết Langmuir 1:1 (dù là nó gắn kết 1:2) và được điều chỉnh phù hợp với mô hình đó để thu được KD biểu kiến tượng trưng cho ái tính của gắn kết hóa trị hai. Hằng số ái tính biểu kiến cho các tương tác có nguồn gốc từ hằng số tốc độ khi điều chỉnh phù hợp bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare).

Bảng 47: Gắn kết hóa trị hai (ái tính với KD biểu kiến) của dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 (TCB) trên FolR1 ở người, khỉ đầu chó và chuột.

Chất phân tích	Phối tử	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD biểu kiến
16D5 TCB	huFolR1	1,68E+05	4,33E-04	3 nM
	cyFolR1	2,08E+05	6,95E-04	3 nM
16D5 G49S/S93A TCB	huFolR1	1,49E+05	2,09E-03	10nM
	cyFolR1	4,54E+05	7,84E-03	20 nM
16D5 G49S/K53A TCB	huFolR1	1,32E+05	5,86E-03	40 nM
	cyFolR1	3,73E+05	2,56E-02	70 nM
16D5 W96Y TCB	huFolR1	1,15E+05	1,44E-03	10nM
	cyFolR1	1,37E+05	1,68E-03	10nM
16D5 W96Y/D52E TCB	huFolR1	1,24E+05	1,40E-03	10nM
	cyFolR1	5,17E+05	1,41E-02	30 nM
36F2 TCB	huFolR1	1,12E+06	7,90E-03	7 nM
	cyFolR1	1,97E+06	1,10E-02	6 nM
	muFolR1	5,54E+05	1,47E-03	3 nM
6E10 TCB	huFolR1	7,93E+06	8,74E-03	1nM
	cyFolR1	5,56E+06	5,72E-03	1nM
14B1 TCB	huFolR1	1,12E+06	1,40E-03	1nM
	cyFolR1	1,02E+06	1,66E-03	2 nM
	muFolR1	8,03E+06	8,20E-04	0,1nM
9C7 TCB	huFolR1	1,18E+06	1,42E-03	1nM
	cyFolR1	4,98E+06	4,82E-03	1nM

Ái lực với thụ thể folat 1

Ái lực của tương tác giữa dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 và thụ thể folat tái tổ hợp được xác định như được mô tả dưới đây (Bảng 48).

Để đo ái lực, việc ghép cặp trực tiếp khoảng 12000 đơn vị cộng hưởng (RU) của kháng thể đặc hiệu kháng Fab người (bộ kit bắt Fab, GE Healthcare) được thực hiện trên chíp CM5 ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin tiêu chuẩn (GE Healthcare). Dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 được bắt ở 20nM với tốc độ chảy bằng 10µl/phút trong 40 giây, tế bào dòng chảy đối chiếu được để lại mà không bắt. Dãy pha loãng (12,3 đến 3000nM) của thể dung hợp Fc của thụ thể folat 1 ở người, khỉ đầu chó hoặc chuột được cho đi qua trên tất cả các tế bào dòng chảy ở 30µl/phút trong 240 giây để ghi lại pha kết hợp. Pha phân ly được theo dõi trong 300 giây và được khởi phát bằng cách chuyển đổi từ dung dịch mẫu sang HBS-EP. Bề mặt chíp được tái tạo sau mỗi chu kỳ bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêm liều kép trong 60 giây Glyxin-HCl 10mM độ pH = 2,1. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đáp ứng thu được trên tế bào dòng chảy đối chiếu 1. Hằng số ái lực cho các tương tác có nguồn gốc từ hằng số tốc độ bằng cách điều chỉnh phù hợp với gắn kết Langmuir 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare). Đối với động lực ái lực thấp có pha kết hợp và pha phân ly quá nhanh để được điều chỉnh phù hợp bằng mô hình gắn kết Langmuir 1:1, mô hình phân tích trạng thái ổn định được áp dụng bằng cách sử dụng phần mềm Bia Evaluation (GE Healthcare). Việc phân tích trạng thái ổn định tạo ra KD của phản ứng gắn kết ở trạng thái cân bằng.

Bảng 48: Gắn kết hóa trị một (ái lực) của dạng đặc hiệu kép tế bào T kháng FolR1 (TCB) trên FolR1 ở người, khỉ đầu chó và chuột.

Chất phân tích	Phối tử	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD
16D5 TCB	huFolR1	1,22E+04	7,02E-04	57 nM
	cyFolR1	1,29E+04	1,71E-03	130 nM
16D5 G49S/S93A TCB	huFolR1	1,01E+04	8,37E-03	830 nM
	cyFolR1	2,05E+04	8,60E-03	420 nM
16D5 G49S/K53A TCB	huFolR1	9,17E+03	1,59E-02	1700nM
	cyFolR1			1900nM (phân tích trạng thái ổn định)
16D5 W96Y TCB	huFolR1	1,11E+04	4,05E-03	370 nM
	cyFolR1	1,17E+04	5,16E-03	440 nM
16D5 W96Y/D52E TCB	huFolR1			1400nM (phân tích trạng thái ổn định)
	cyFolR1			5600nM (phân tích trạng

				thái ổn định)
36F2 TCB	huFolR1			1400nM (phân tích trạng thái ổn định)
	cyFolR1			1500nM (phân tích trạng thái ổn định)
	muFolR1	3,50E+04	1,73E-02	490 nM
6E10 TCB	huFolR1			1200nM (phân tích trạng thái ổn định)
	cyFolR1			1500nM (phân tích trạng thái ổn định)
14B1 TCB	huFolR1	6,16E+04	3,03E-02	490 nM
	cyFolR1			1200nM (phân tích trạng thái ổn định)
	muFolR1	7,03E+04	2,28E-03	30 nM
9C7 TCB	huFolR1			840 nM (phân tích trạng thái ổn định)
	cyFolR1			1400nM (phân tích trạng thái ổn định)

Các đột biến được chuyển vào chất gắn kết 16D5 làm giảm ái lực của nó với FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt. Thứ tự có ái lực giảm là 16D5 WT (57 nM)> W96Y (thấp hơn 6,5 lần)> G49S/S93A (thấp hơn 14,5 lần)> W96Y/D52E (thấp hơn 24,5 lần)> G49S/K53A (thấp hơn 30 lần). Thứ tự giống như vậy cũng quan sát được ở giá trị ái tính, tuy nhiên chênh lệch theo lần là nhỏ hơn 16D5 WT (3nM)> W96Y, G49S/S93A, W96Y/D52E (thấp hơn 3 lần)> G49S/K53A (thấp hơn 13 lần).

Các chất gắn kết ái lực trung bình có thứ tự ái lực sau 16D5 (57nM)>14B1 (thấp hơn 8,5 lần)> 9C7 (thấp hơn 15 lần) > 6E10 (thấp hơn 21 lần)>36F2 (thấp hơn 24,5 lần). Tuy nhiên các chênh lệch này biến mất trong phép đo ái tính 14B1, 9C7, 6E10 (1nM)> 16D5 (3nM) > 36F2 (7nM).

16D5 W96Y/D52E TCB giải quyết các vấn đề quan sát được ở các ứng viên nêu trên. 16D5 W96Y/D52E TCB là dựa trên chất gắn kết 16D5 của chuỗi nhẹ chung và có

hai đột biến điểm trên chuỗi nặng đối với chất gắn kết 16D5 gốc. Đột biến W96Y làm giảm ái lực của chất gắn kết với FolR1 so với chất gắn kết gốc và đột biến D52E loại bỏ vị trí khử amit hóa và cũng góp phần làm giảm ái lực. 16D5 W96Y/D52E TCB gắn kết với FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó, nhưng không gắn kết với FolR1 ở chuột. Nó đặc hiệu đối với FolR1 và không gắn kết với FolR2 ở người hoặc FolR3 ở người tái tổ hợp. Ái lực (gắn kết hóa trị một) của 16D5 W96Y/D52E là khoảng 1,4μM đối với FolR1 ở người (thấp hơn 24,5 lần so với chất gắn kết 16D5 gốc) và ái tính (gắn kết hóa trị hai) là khoảng 10nM (thấp hơn 3 lần so với chất gắn kết 16D5 gốc).

Ví dụ 52

Việc tiêu diệt tế bào T của tế bào Hela, SKov-3 và HT-29 được cảm ứng bằng FolR1 TCB trung gian

Việc tiêu diệt tế bào T được điều tiết bởi chất gắn kết FolR1 trung bình (6E10 TCB, 14B1 TCB và 9C7 TCB), được đánh giá trên tế bào Hela (FolR1 cao), SKov-3 (FolR1 trung bình) và HT-29 (FolR1 thấp). 16D5 TCB và 36F2 TCB được bao gồm làm điểm chuẩn. PBMC người được sử dụng làm tế bào tác động và việc tiêu diệt được phát hiện ở 24 giờ và 48 giờ ủ với kháng thể đặc hiệu kép. Nói một cách ngắn gọn, các tế bào đích được thu gom bằng Trypsin/EDTA, được rửa, và được dàn trên đĩa ở mật độ bằng 25 000 tế bào/giếng bằng cách sử dụng đĩa đáy phẳng 96 giếng. Các tế bào được để bám dính qua đêm. Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque của chế phẩm tế bào lympho đã được làm giàu (lớp hồng cầu) thu được từ người hiến khỏe mạnh. Máu sạch được pha loãng bằng PBS vô trùng và được đặt trên gradien Histopaque (Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (tốc độ 4500 m/s^2, 30 phút, nhiệt độ trong phòng), huyết tương bên trên kỳ nghỉ phân bào chứa PBMC được loại bỏ và các PBMC được chuyển vào trong ống falcon mới sau đó được làm đầy bằng 50ml PBS. Hỗn hợp được ly tâm (tốc độ 4000 m/s^2, 10 phút, nhiệt độ trong phòng), phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và viên PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô trùng (bước ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2, 10 phút). Tập hợp PBMC thu được được đếm tự động (ViCell) và được bảo quản trong môi trường RPMI1640 chứa FCS 10% và L-alanyl-L-glutamin 1% (Biochrom, K0302) ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% trong thiết bị ủ tế bào cho đến khi sử dụng tiếp (không quá 24 giờ). Đối với thử nghiệm tiêu diệt, kháng thể được bổ sung ở các nồng độ được chỉ định (khoảng từ 0,01pM đến 10nM trong ba lần). PBMC được bổ sung vào tế bào đích ở tỷ lệ E:T cuối cùng là 10:1. Việc tiêu diệt tế bào đích được đánh giá sau

24 giờ và 48 giờ ủ ở nhiệt độ 37°C, CO_2 5% bằng cách định lượng LDH được giải phóng vào phần dịch nổi trên bề mặt tế bào bằng tế bào chết theo chương trình/hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Mức làm tan tối đa các tế bào đích (= 100%) đạt được bằng cách ủ các tế bào đích với Triton X-100 1%. Mức làm tan tối thiểu (= 0%) dùng để chỉ các tế bào đích được cùng ủ với tế bào tác động mà không có cấu trúc đặc hiệu kép.

Các kết quả cho thấy rằng sự làm tan khối u được cảm ứng bằng chất gắn kết FolR1 trung bình (6E10 TCB, 14B1 TCB và 9C7 TCB) nằm trong khoảng từ kết quả thu được đối với 16D5 TCB ái lực cao và 36F2 TCB ái lực thấp (Fig.36A-F). Trong số các chất gắn kết FolR1 trung bình, 14B1 TCB thể hiện mức tiêu diệt mạnh nhất như có thể được thấy sau 48 giờ ủ (Fig.36D-F). Giá trị EC50 liên quan đến thử nghiệm tiêu diệt sau 24 giờ và 48 giờ ủ, được tính bằng cách sử dụng GraphPadPrism6, được nêu trong Bảng 49 và Bảng 50.

Bảng 49: Giá trị EC50 (pM) đối với việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào Hela, SKov-3 và tế bào HT-29 được cảm ứng bằng FolR1 TCB trung bình sau 24 giờ ủ.

	EC50 [pM]		
Kháng thể	Hela	SKov-3	HT-29
6E10 TCB	6,5	n.d.	*n.d.
14B1 TCB	8,5	30,1	*n.d.
9C7 TCB	2,8	741,4	*n.d.
16D5 TCB	2,2	1,5	*n.d.
36F2 TCB	31,1	*n.d.	*n.d.

** không được xác định*

Bảng 50: Giá trị EC50 (pM) đối với việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào Hela, SKov-3 và tế bào HT-29 được cảm ứng bằng FolR1 TCB trung bình sau 48 giờ ủ.

	EC50 [pM]		
Kháng thể	Hela	SKov-3	HT-29
6E10 TCB	2,1	2164,0	*n.d.
14B1 TCB	5,5	4,7	397,7
9C7 TCB	4,3	519,6	*n.d.
16D5 TCB	2,3	*n.d.	4,9
36F2 TCB	10,5	*n.d.	n.d.

** không được xác định*

Ví dụ 53

Việc tiêu diệt tế bào T của tế bào Hela, SKov-3 và tế bào HT-29 được cảm ứng bằng biến thể 16D5 được giảm ái lực

Việc tiêu diệt tế bào T được điều tiết bởi biến thể 16D5 được giảm ái lực (16D5-G49S/S93A TCB, 16D5-G49S/K53A TCB, 16D5 W96Y TCB, 16D5 W96Y/D52E TCB) được đánh giá trên tế bào Hela (FolR1 cao), SKov-3 (FolR1 trung bình) và HT-29 (FolR1 thấp). 16D5 TCB và 36F2 TCB được bao gồm làm điểm chuẩn. Thử nghiệm này được thực hiện như được mô tả trên đây (Ví dụ 52).

Các kết quả cho thấy rằng việc làm tan khối u được cảm ứng bằng biến thể 16D5 được giảm ái lực (16D5-G49S/S93A TCB, 16D5-G49S/K53A TCB, 16D5 W96Y TCB, 16D5 W96Y/D52E TCB), nằm trong khoảng kết quả thu được đối với 16D5 TCB ái lực cao và 36F2 TCB ái lực thấp. Các giá trị EC50 liên quan đến thử nghiệm tiêu diệt sau 24 giờ và 48 giờ ủ, được tính bằng cách sử dụng GraphPadPrism6, được nêu trong Bảng 51 và Bảng 52 (Fig.37A-F).

Bảng 51: Giá trị EC50 (pM) đối với việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào Hela, SKov-3 và tế bào HT-29 biểu hiện FolR1 được cảm ứng bằng 16D5 TCB và các biến thể giảm ái lực của nó sau 24 giờ ủ.

	EC50 [pM]		
Kháng thể	Hela	SKov-3	HT-29
16D5 TCB	2,2	1,5	*n.d.
16D5-G49S/S93A TCB	2,3	430,4	*n.d.
16D5-G49S/K53A TCB	4,4	1701,9	*n.d.
16D5 W96Y TCB	3,0	164,5	*n.d.
16D5 W96Y/D52E TCB	1,3	235,4	*n.d.
36F2 TCB	31,1	*n.d.	*n.d.

** không được xác định*

Bảng 52: Giá trị EC50 (pM) đối với việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào Hela, SKov-3 và tế bào HT-29 biểu hiện FolR1 được cảm ứng bằng 16D5 TCB và các biến thể giảm ái lực của nó sau 48 giờ ủ.

	EC50 [pM]		
Kháng thể	Hela	SKov-3	HT-29
16D5 TCB	2,3	0,1	4,9
16D5-G49S/S93A TCB	0,9	95,9	99,3
16D5-G49S/K53A TCB	0,5	950,4	1790,7
16D5 W96Y TCB	1,8	24,7	99,3
16D5 W96Y/D52E TCB	0,9	93,0	399,4

36F2 TCB	10,5	968,5	*n.d.

** không được xác định*

Do đó, như với 36F2 FolR1 TCB được mô tả trên đây, chênh lệch 16D5 W96Y/D52E TCB giữa tế bào biểu hiện cao và thấp mà đặc biệt quan trọng để làm giảm độ độc hại do tế bào của một số mô bình thường không khối u biểu hiện nồng độ FolR1 rất thấp (khoảng ít hơn 1000 bản sao trong mỗi tế bào). Phù hợp với quan sát này, các kết quả được nêu trong Ví dụ 54 dưới đây cho thấy rằng 16D5 W96Y/D52E TCB cảm ứng việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T ở mức độ thấp hơn nhiều của tế bào sơ cấp (Fig.38A-F) so với 16D5 TCB gốc. Như vậy, 16D5 W96Y/D52E TCB điều tiết việc tiêu diệt hiệu nghiệm của mô khối u có biểu hiện FolR1 cao hoặc trung bình, nhưng không điều tiết việc tiêu diệt của mô bình thường có biểu hiện thấp. 16D5 W96Y/D52E TCB trong mô hình 2+1 hóa trị hai bao gồm gốc gắn kết FolR1 có ái lực tương đối thấp nhưng nó có tác dụng ái tính cho phép biệt hóa giữa tế bào biểu hiện FolR1 cao và thấp. Do tế bào khối u biểu hiện FolR1 ở mức độ cao hoặc trung bình, TCB này gắn kết có chọn lọc với tế bào khối u và tế bào không ung thư không bình thường mà biểu hiện FolR1 ở mức độ thấp hoặc không biểu hiện. Như là ưu điểm nữa so với 36F2 FolR1 TCB được mô tả trên đây, 16D5 W96Y/D52E TCB gắn kết đặc hiệu với FolR1 và không gắn kết đặc hiệu với FolR2 hoặc FolR3, tăng cường thêm độ an toàn của nó để điều trị in vivo.

Ngoài các đặc tính thuận lợi nêu trên, 16D5 W96Y/D52E TCB trong mô hình nghịch chuyển 2+1 hóa trị hai cũng có ưu điểm là nó không đòi hỏi liên kết ngang hóa học hoặc phương pháp lai khác. Điều này tạo thuận lợi cho việc sản xuất dược phẩm một cách thích hợp để điều trị cho bệnh nhân, ví dụ bệnh nhân có khối u ung thư dương tính với FolR1. 16D5 W96Y/D52E TCB trong mô hình nghịch chuyển 2+1 hóa trị hai có thể được sản xuất bằng cách sử dụng quy trình CHO tiêu chuẩn có các chất kết tụ thấp. Hơn nữa, 16D5 W96Y/D52E TCB trong 2+1 hóa trị hai bao gồm trình tự người và trình tự được nhân hóa khiến cho nó tốt hơn với phân tử sử dụng polypeptit chuột cống và chuột nhắt mà là kháng nguyên ở mức độ cao khi được dùng cho người. Hơn nữa, 16D5 W96Y/D52E TCB trong mô hình 2+1 hóa trị hai được xử lý kỹ thuật để loại bỏ gắn kết FcgR và, như vậy, không gây ra phản ứng liên kết chéo FcgR và phản ứng truyền, làm tăng cường thêm độ an toàn của nó khi được dùng cho bệnh nhân.

Như được thể hiện ở các kết quả được mô tả trên đây, hình thái học từ đầu đến đuôi của nó tạo 16D5 W96Y/D52E TCB trong mô hình nghịch chuyển 2+1 hóa trị hai

một phân tử hoạt lực cao mà cảm ứng việc tiêu diệt hoàn toàn tế bào đích. Hóa trị hai của nó làm tăng cường ái tính và hoạt lực, nhưng cũng cho phép biệt hóa giữa tế bào biểu hiện cao và thấp. Ưu tiên đối với tế bào biểu hiện đích cao hoặc trung bình do tác dụng ái tính của nó làm giảm độ độc hại thu được từ việc tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào bình thường biểu hiện FolR1 ở mức độ thấp.

Một ưu điểm khác của 16D5 W96Y/D52E TCB trong mô hình 2+1 hóa trị hai và các phương án khác được nêu trong bản mô tả là việc phát triển lâm sàng của chúng không đòi hỏi việc sử dụng phân tử thay thế do chúng gắn kết với FolR1 ở người và ở khỉ đầu chó. Như vậy, các phân tử được nêu trong bản mô tả nhận diện epitop khác với kháng thể đối với FolR1 được mô tả trên đây mà không nhận diện FolR1 từ cả hai loài (xem cả ở Fig.41).

Ví dụ 54

Việc tiêu diệt tế bào T của các tế bào sơ cấp được cảm ứng bằng biến thể 16D5 được giảm ái lực và FolR1 TCB trung bình

Việc tiêu diệt tế bào T được điều tiết bởi biến thể 16D5 được giảm ái lực (16D5-G49S/S93A TCB, 16D5 W96Y/D52E TCB) và chất gắn kết FolR1 trung bình 14B1 TCB được đánh giá trên tế bào sơ cấp (tế bào biểu mô vỏ thận người (HRCEpiC) (ScienCell Research Laboratories; Cat No 4110) và tế bào biểu mô sắc tố võng mạc người (HRPEpiC) (ScienCell Research Laboratories; Cat No 6540)). Tế bào HT-29 (FolR1 thấp) được bao gồm làm dòng tế bào đối chứng. 16D5 TCB và 36F2 TCB được bao gồm làm điểm chuẩn và DP47 TCB được dùng làm đối chứng không gắn kết.

Thử nghiệm được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 52, với các kháng thể với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,1pM đến 100nM (ba lần).

Khi tế bào sơ cấp người được sử dụng làm đích, tổng mức làm tan là thấp hơn nhiều do tốc độ biểu hiện thấp hơn của FolR1 trên các tế bào này (Fig.38A-F). Đối với chất gắn kết FolR1 ái lực cao 16D5 TCB, việc làm tan qua trung gian tế bào T có thể được quan sát ở cả hai loại tế bào sơ cấp được sử dụng. Như quan sát được trước đó khi dòng tế bào khối u được sử dụng làm đích, việc làm tan được cảm ứng bằng chất gắn kết FolR1 trung bình 14B1 TCB và các biến thể 16D5 ái lực giảm (16D5-G49S/S93A TCB, 16D5 W96Y/D52E TCB), nằm trong khoảng kết quả thu được đối với 16D5 TCB ái lực cao và 36F2 TCB ái lực thấp. Mức làm tan giảm đáng kể của các tế bào biểu hiện FolR1

ở mức độ thấp phù hợp với hoạt tính ngoài đích thấp và các biến thể 16D5 ái lực giảm 16D5-G49S/S93A TCB và 16D5 W96Y/D52E TCB, do đó, được mong đợi là dung nạp tốt in vivo.

Ví dụ 55

Liều đơn PK của cấu trúc FolR1 TCB ở chuột nhắt cái NOG

Chuột nhắt cái NOD/Shi-scid/IL-2Rγnull (NOG) ở độ tuổi trung bình từ 8 đến 10 tuần tuổi khi bắt đầu thử nghiệm (được mua của Taconic, SOPF facility) được nuôi giữ trong điều kiện không có mầm bệnh cụ thể với chu trình hàng ngày 12 giờ sáng/12 giờ tối theo các hướng dẫn đã cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Quy trình thử nghiệm đã được xem xét và phê duyệt bởi chính quyền địa phương (ZH193/2014). Sau khi đến nơi, các con chuột được giữ ở cơ sở kiểm địch động vật trong một tuần cho quen với môi trường mới và để theo dõi. Tiến hành theo dõi sức khoẻ liên tục trên cơ sở thường xuyên.

Nghiên cứu dược động học liều đơn (SDPK) được thực hiện để đánh giá sự tiếp xúc của cấu trúc FolR1 TCB (36F2, 16D5, 16D5 G49S/S93A và 16D5 W96Y/D52E). Liều dùng lớn trong tĩnh mạch 0,5mg/kg được dùng cho chuột nhắt NOG và các mẫu máu được lấy ở các thời điểm được chọn lọc để đánh giá dược động học. Các mẫu huyết thanh chuột nhắt được phân tích bằng ELISA. a-huCD3-CDR được biotinyl hóa (mAb<ID-mAb<CD3>>M-4.25.93-IgG-Bi), mẫu thử nghiệm, kháng thể a-huFc được đánh dấu digoxygenin (mAb<H-FC pan>M-R10Z8E9-IgG-Dig) và kháng thể phát hiện kháng digoxygenin (POD) được bổ sung từng bước vào đĩa vi chuẩn được phủ streptavidin có 96 giếng và được ủ sau mọi bước trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Đĩa được rửa ba lần sau mỗi bước để loại bỏ các chất không gắn kết. Cuối cùng, phức hợp gắn kết peroxidaza được quan sát bằng mắt thường bằng cách bổ sung dung dịch nền ABTS để tạo ra sản phẩm phản ứng có màu. Mật độ sản phẩm phản ứng, được xác định theo phương pháp quang trắc ở 405nm (với bước sóng đối chiếu ở 490nm), tỷ lệ với nồng độ chất phân tích trong mẫu huyết thanh. Khoảng định cỡ của đường cong tiêu chuẩn đối với các cấu trúc là khoảng 0,078 đến 5 ng/ml, trong đó 1,5ng/ml là giới hạn định lượng dưới (LLOQ).

Nghiên cứu SDPK bộc lộ profin PK giống IgG đối với cấu trúc 16D5, 16D5 W96Y/D52E và 16D5 G49S/S93A (Fig.39A-B). Do đó, chu kỳ một lần mỗi tuần được chọn để nghiên cứu độ hiệu nghiệm (Fig.40B). Thời gian bán rã đối với 36F2 thấp hơn so

với các dòng vô tính khác. 36F2 là phân tử duy nhất ngoài bốn phân tử được thử nghiệm phản ứng chéo với FolR1 ở chuột nhắt, có thể giải thích thời gian bán rã thấp hơn đối với phân tử này và chỉ ra TMDD (bố trí dược chất qua trung gian đích-Target Mediated Drug Disposition).

Ví dụ 56

Độ hiệu nghiệm in vivo của cấu trúc FolR1 TCB (16D5, 16D5 G49S/S93A và 16D5 W96Y/D52E) sau khi truyền PBMC người vào chuột nhắt NOG mang Hela

Cấu trúc FolR1 TCB được thử nghiệm trong dòng tế bào ung thư cổ người biểu hiện FOLR1 Hela, được tiêm dưới da vào chuột nhắt NOG được ghép PBMC.

Tế bào HeLa ban đầu thu được từ ATCC (CCL2) và sau khi mở rộng được kết lắng trong ngân hàng tế bào nội bộ Roche-Glycart. Dòng tế bào khối u thường được nuôi cấy trong RPMI chứa FCS 10% (Gibco) ở nhiệt độ 37°C trong môi trường bão hòa nước ở CO_2 5%. Đường cấy chuyển 13 được sử dụng để cấy chuyển, ở khả năng sống > 95%. $1x10^6$ tế bào trong mỗi động vật được tiêm dưới da vào sườn phải của các con vật này với tổng cộng 100µl môi trường nuôi cấy tế bào RPMI (Gibco).

60 con chuột nhắt cái NOG, 8-10 tuần tuổi khi bắt đầu thử nghiệm (được nuôi ở Taconic, Đan mạch) được duy trì trong điều kiện không có thể sinh bệnh đặc hiệu với chu kỳ hằng ngày là 12 giờ sáng/12 giờ tối theo hướng dẫn được cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được nhận xét và được phê chuẩn bởi chính quyền địa phương (ZH193/2014). Sau khi đến, động vật được duy trì trong một tuần để quen với môi trường mới và để quan sát. Việc theo dõi sức khỏe liên tục được thực hiện trên cơ sở thường xuyên.

Theo phác đồ nghiên cứu (Fig.40B), chuột nhắt được tiêm dưới da $1x10^6$ tế bào HeLa vào ngày nghiên cứu 0. Ở ngày nghiên cứu 30, khi khối u đạt kích thước khoảng $150mm^3$, PBMC người của đối tượng cho khỏe mạnh được phân lập thông qua phương pháp Ficoll và $10x10^6$ tế bào được tiêm trong tĩnh mạch vào chuột nhắt mang khối u. Hai ngày sau đó (ngày 32), các con chuột được chọn ngẫu nhiên và được chia đều trong sáu nhóm điều trị (n=10) sau đó tiêm trong tĩnh mạch 16D5 (0,5mg/kg), 16D5 G49S/S93A (2,5 hoặc 0,5mg/kg) và 16D5 W96Y/D52E (2,5 hoặc 0,5mg/kg). Tất cả các nhóm điều trị được tiêm một lần hằng tuần trong tổng cộng ba tuần. Chuột nhắt được tiêm trong tĩnh mạch 200µl dung dịch thích hợp. Chuột nhắt trong nhóm chất dẫn được tiêm PBS. Để thu

được lượng thích hợp của TCB trong mỗi 200µl, dung dịch gốc được pha loãng bằng PBS khi cần. Mức độ sinh trưởng khối u được đo một lần hằng tuần bằng cách sử dụng thước đo (Fig.40C-E) và thể tích khối u được tính như sau:

Tv: (W2/2) x L (W: chiều rộng, L: chiều dài)

Việc tiêm một lần hằng tuần của cấu trúc FolR1 TCB dẫn đến sự thoái hóa khối u đáng kể (Fig.40C-E). Độ hiệu nghiệm của 16D5 (0,5mg/kg) và 16D5 W96Y/D52E16D5 (0,5mg/kg) là tương đương, trong khi đó 16D5 G49S/S93A (0,5mg/kg) cho thấy hoạt lực ít hơn một chút. Liều lượng cao hơn là 2,5mg/kg 16D5 W96Y/D52E16D5 và 16D5 G49S/S93A không thể hiện độ hiệu nghiệm tăng so với liều lượng 0,5mg/kg. Đối với các kết quả PD, chuột nhắt được giết ở ngày nghiên cứu 52, các khối u được cắt bỏ, được cân và các huyền phù tế bào đơn lẻ được điều chế thông qua việc tiêu hóa enzym với Colagenaza V, Dispaza II và DNAza để phân tích FACS sau đó. Các khối u được cấy mô sang ở tất cả các nhóm điều trị cho thấy trọng lượng khối u thấp hơn đáng kể khi kết thúc nghiên cứu so với khối u đối chứng dẫn thuốc (Fig.40F). Các huyền phù tế bào đơn lẻ từ khối u nơi mà được nhuộm đối với huCD45 và huCD3 và DAPI để loại trừ tế bào chết và được phân tích ở BD Fortessa. Phân tích FACS cho thấy số lượng lớn hơn về mặt thống kê của tế bào T người dương tính với CD3 không được lọc trong mô khối u khi điều trị bằng 16D5 cũng như 16D5 W96Y/D52E16D5 so với khối u đối chứng dẫn thuốc (Fig.40C).

Ví dụ 57

Nghiên cứu độ độc hại ở khỉ đầu chó

Nghiên cứu dược động học (PK), dược lực học (PD) và độ dung nạp được thực hiện để nghiên cứu độ dung nạp, tác dụng PK và PD của liều đơn trong tĩnh mạch của biến thể 16D5 được giảm ái lực TCB (ví dụ, 16D5-G49S/S93A TCB, 16D5 W96Y/D52E TCB) ở khỉ đầu chó. Trong nghiên cứu này, khỉ đầu chó chưa quen thí nghiệm, (1 khỉ đực và 1 khỉ cái/nhóm), nhận liều đơn trong tĩnh mạch của biến thể 16D5 được giảm ái lực TCB, bao gồm 16D5 W96Y/D52E TCB, tuân theo phương pháp gia tăng liều lượng. Mức liều lượng minh họa bao gồm 0,003, 0,03, và 0,09mg/kg. Thông số độ độc hại tiêu chuẩn (các dấu hiệu lâm sàng, trọng lượng cơ thể, huyết học & hóa học lâm sàng) và động học của số lượng tế bào T và tình trạng hoạt hóa trong máu và động học của việc giải phóng xytokin được đánh giá. Các mẫu máu cũng được lấy đối với PK trong khoảng

thời gian 28 ngày để đo biến thể 16D5 được giảm ái lực TCB, bao gồm 16D5 W96Y/D52E TCB, và của các kháng thể kháng thuốc.

Trình tự axit amin theo các phương án minh họa

1) Chất gắn kết FolR hữu ích trong mô hình chuỗi nhẹ chung, chuỗi nặng biến đổi

Mô tả	Trình tự	Seq ID No
16A3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARNYYAGVTPFDYWGQGTLVTVSS	1
18D3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARNYYTGGSSAFDYWGQGTLVTVS	2
15H7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARNYYLFSTSFDYWGQGTLVTVSS	3
15B6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARNYYIGIVPFDYWGQGTLVTVSS	4
21D1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARNYYVGVSPFDYWGQGTLVTVSS	5
16F12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARNFTVLRVPFDYWGQGTLVTVSS	6
15A1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARNYYIGVVTFDYWGQGTLVTVSS	7
15A1_CD R1	SYYMH	8
15A1_CD R2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
15A1_CD R3	NYYIGVVTFDY	10
19E5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARGEWRRYTSFDYWGQGTLVTVSS	11
19E5_CD R1	SYYMH	8
19E5_CD R2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
19E5_CD R3	GEWRRYTSFDY	12
19A4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARGGWIRWEHFDYWGQGTLVTVSS	13
19A4_CD	SYYMH	8

R1		
19A4_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
19A4_CDR3	GGWIRWEHFDY	14
16D5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS	15
16D5_CDR1	NAWMS	16
16D5_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
16D5_CDR3	PWEWSWYDY	18
15E12	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSYFDYWGQGTLVTVSS	19
15E12_CDR1	NAWMS	16
15E12_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
15E12_CDR3	PWEWSYFDY	20
21A5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWAWFDYWGQGTLVTVSS	21
21A5_CDR1	NAWMS	16
21A5_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
21A5_CDR3	PWEWAWFDY	22
21G8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWAYFDYWGQGTLVTVSS	23
21G8_CDR1	NAWMS	16
21G8_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
21G8_CDR3	PWEWAYFDY	24
19H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARTGWSRWGYMDYWGQGTLVTVSS	25
19H3_CDR1	SYYMH	8
19H3_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9

19H3_CDR3	TGWSRWGYMDY	26
20G6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARGEWIRYYHFDYWGQGTLVTVSS	27
20G6_CDR1	SYYMH	8
20G6_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
20G6_CDR3	GEWIRYYHFDY	28
20H7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQA PGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARVGWYRWGYMDYWGQGTLVTVSS	29
20H7_CDR1	SYYMH	8
20H7_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
20H7_CDR3	VGWYRWGYMDY	30

2) Chuỗi nhẹ chung của chất gắn kết CD3 (CLC)

Mô tả	Trình tự	Seq ID No
chuỗi nhẹ CD3 chung (VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQE KPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQ PEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	31
chuỗi nhẹ CD3 chung_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
chuỗi nhẹ CD3 chung_CDR2	GTNKRAP	33
chuỗi nhẹ CD3 chung_CDR3	ALWYSNLWV	34
chuỗi nhẹ CD3 chung (VLCL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQE KPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQ PEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS	35

3) Chuỗi nặng chất gắn kết CD3

Mô tả	Trình tự	Seq ID No
Chuỗi nặng biến đổi CD3 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQG TLVTVSS	36
Chuỗi nặng CD3 (VH)_CDR 1	TYAMN	37
Chuỗi nặng CD3 (VH)_CDR 2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	38
Chuỗi nặng CD3 (VH)_CDR 3	HGNFGNSYVSWFAY	39
Chuỗi nặng đầy đủ CD3 (VHCH1)_	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	40
Chuỗi nặng hằng định CD3 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	84

4) Chất gắn kết FolR hữu ích cho mô hình crossfab

Mô tả	Trình tự	Seq ID No
11F8_VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYRAWYSFDYWGQG TTVTVSS	41
11F8_VH_CD R1	SYAIS	42
11F8_VH_CD R2	GIIPIFGTANYAQKFQG	43
11F8_VH_CD R3	AVFYRAWYSFDY	44
11F8_VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQK PGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP DDFATYYCQQYTSPPPTFGQGTKVEIK	45
11F8_VL_CD R1	RASQSISSWLA	46

11F8_VL_CDR2	DASSLES	47
11F8_VL_CDR3	QQYTSPPPT	48
36F2_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTHDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSFFTGFHLDYWGQGTLVTVSS	49
36F2_VH_CDR1	SYYMH	8
36F2_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
36F2_VH_CDR3	SFFTGFHLDY	50
36F2_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYTNEHYYTFGQGTKVEIK	51
36F2_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
36F2_VL_CDR2	GASSRAT	53
36F2_VL_CDR3	QQYTNEHYYT	54
9D11_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGPTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFAWLDYWGQGTLVTVSS	55
9D11_VH_CDR1	SYYMH	8
9D11_VH_CDR2	IINPSGGPTSYAQKFQG	56
9D11_VH_CDR3	GDFAWLDY	57
9D11_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASIMNRTFGQGTKVEIK	58
9D11_VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
9D11_VL_CDR2	LGSNRAS	60
9D11_VL_CDR3	MQASIMNRT	61
9D11_VL N95S	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASIMSRTFGQGTKVEIK	62
9D11_VL N95S_CDR3	MQASIMSRT	63
9D11_VL N95Q	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI	64

	SRVEAEDVGVYYCMQASIMQRTFGQGTKVEIK	
9D11_VL N95Q_CDR3	MQASIMQRT	65
9D11_VL T97A	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDW YLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQASIMNRAFGQGTKVEIK	66
9D11_VL T97A	MQASIMNRA	67
9D11_VL T97N	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDW YLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQASIMNRNFGQGTKVEIK	68
9D11_VL T97N_CDR3	MQASIMNRN	69
5D9_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWV RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTS TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSYIDMDYWGQGTLVT VSS	70
5D9_VH_CD R1	SYYMH	8
5D9_VH_CD R2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
5D9_VH_CD R3	SYIDMDY	71
5D9_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQDNWSPTFGQGTKVEIK	72
5D9_VL_CD R1	RASQSVSSSYLA	52
5D9_VL_CD R2	GASSRAT	53
5D9_VL_CD R3	QQDNWSPT	73
6B6_VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWV RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTS TSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSYVDMDYWGQGTLV TVSS	74
6B6_VH_CD R1	SYYMH	8
6B6_VH_CD R2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
6B6_VH_CD R3	SYVDMDY	75
6B6_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQDIWSPTFGQGTKVEIK	76
6B6_VL_CD R1	RASQSVSSSYLA	52
6B6_VL_CD R2	GASSRAT	53

6B6_VL_CDR3	QQDIWSPT	77
14E4_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSSYVEWYAFDYWGQGTLVTVSS	78
14E4_VH_CDR1	SYAMS	79
14E4_VH_CDR2	AISGSGGSTYYADSVKG	80
14E4_VH_CDR3	DSSYVEWYAFDY	81
14E4_VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDSTLTISRLEPEDFAVYYCQQPTSSPITFG QGTKVEIK	82
14E4_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
14E4_VL_CDR2	GASSRAT	53
14E4_VL_CDR3	QQPTSSPIT	83

5) Chất gắn kết CD3 hữu ích trong mô hình crossfab

Mô tả	Trình tự	Seq ID No
Chuỗi nặng CD3 (VH)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	36
Chuỗi nặng CD3 (VH)_CDR1	TYAMN	37
Chuỗi nặng CD3 (VH)_CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG	38
Chuỗi nặng CD3 (VH)_CDR3	HGNFGNSYVSWFAY	39
Chuỗi nhẹ CD3 (VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	31
Chuỗi nhẹ CD3_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
Chuỗi nhẹ CD3_CDR2	GTNKRAP	33
Chuỗi nhẹ CD3_CDR3	ALWYSNLWV	34
pETR12940:	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWV	86

chuỗi nhẹ CD3 chung được liên kết (VLCH1)	QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	
Chuỗi nặng CD3 được liên kết (VHCκ); ví dụ trong pCON1057	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR QAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	87
CD3- CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	85
CD3-ckappa	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	88

6) Trình tự axit amin minh họa của kháng thể đặc hiệu kép CD3-FolR trong mô hình crossmab nghịch chuyển 2+1

Mô tả	Trình tự	Seq ID No
VHCH1[9D11]_VHCL[CD3]_Fcknob_PGLALA pCON1057	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGPTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARGDFAWLDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWV SRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	94
9D11_Fchole_PGLALA_HYRF	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGPTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARGDFAWLDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN	95

	VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	
9D11_LC pCON1063	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCMQASIMNRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	96
VLCH1[CD3] pETR12940	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQE KPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQ PEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSC	86
CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD	307
VHCH1[36F2]_VHCL[CD3]_Fc phần phình_PGLALA pCON1056	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTHDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSFFTGFHLDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEW VSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSA SVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	308
36F2-Phần lõm Fc PGLALA pCON1050	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTHDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARSFFTGFHLDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS	309

	DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	
36F2 LC pCON1062	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYTNEHYYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHXGLSSP VTKSFNRGEC	310
CD3 VLCH1 pETR12940	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQE KPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQ PEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSC	86

7) Trình tự axit amin minh họa của kháng thể đặc hiệu kép CD3-FolR có chuỗi nhẹ chung

VHCH1[16D5]_VHCH1[CD3]_Phần phình Fc pCON999	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVR QAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	89
VHCH1[16D5]_Phần lõm Fc pCON983	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVR QAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNRFTQKSLSLSPGK	90

CD3_chuỗi nhẹ chung pETR13197	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS	35
VHCH1[CD3]_VHCH1[16D5]_Phần phình Fc_PGLALA pETR13932	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMS WVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISR DDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	91
CD3_Phần phình Fc_PGLALA pETR13917	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	92
Fc_phần lõm_PGLALA_HYRF pETR10755	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	93
VHCL[CD3]_Phần phình Fc_PGLALA pETR13378	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR	98

	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
16D5 nghịch chuyển 2+1 có N100A trong CDR H3 pETR14096	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVR QAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	99
16D5 nghịch chuyển 2+1 có S100aA trong CDR H3 pETR14097	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVR QAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQA PGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNAYVSWFAYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	100
Chuỗi nhẹ CD3 được dung hợp với CH1; Fc_PGLALA; pETR13862	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG	101

	SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK	
16D5 VH được dung hợp với chuỗi kappa hằng định; pETR13859	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVR QAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGT LVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	102
CD3 VH được dung hợp với chuỗi lambda hằng định; pETR13860	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLVTVSSASPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	103
IGHV1-46*01 (X92343), cộng thành phần JH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVR QAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARGGSGGSFDYWGQGTLVTVS S	104
IGHV1-69*06 (L22583), cộng thành phần JH6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARGGSGGSMDAWGQGTTVTVS S	105
IGHV3-15*01 (X92216), cộng thành phần JH4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVR QAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDS KNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTGGSGGSFDYWGQGTL VTVSS	106
IGHV3-23*01 (M99660), cộng thành phần JH4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGSGGSFDYWGQGTLVTVS S	107
IGHV4-59*01 (AB019438), cộng thành phần JH4	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPP GKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARGGSGGSFDYWGQGTLVTVSS	108
IGHV5-51*01 (M99686), cộng thành phần JH4	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAY LQWSSLKASDTAMYYCARGGSGGSFDYWGQGTLVTVSS	109
Kháng thể đặc hiệu CD3 dựa trên chuỗi nhẹ CH2527 được nhân hóa	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	110
hVK1-39 (thành phần JK4 J)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK	111
VL7_46-13 (chuỗi nhẹ	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG	112

kháng thể kháng CD3 được nhân hóa)	AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	

8) biến thể 16D5 minh họa có ái lực giảm

a. Biến thể chuỗi nhẹ minh họa có ái lực giảm

Tên	Trình tự	Seq ID No
K53A aa	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSNYAN**WVQQK PGQAPRGLIG**GTNARAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYC**ALWYSNLWV**FGGGTKLTVL	113
K53A_VL_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
K53A_VL_CDR2	GTNARAP	311
K53A_VL_CDR3	ALWYSNLWV	34
S93A aa	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTTSNYAN**WVQQK PGQAPRGLIG**GTNKRAP**GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYC**ALWYANLWV**FGGGTKLTVL	114
S93A_VL_CDR1	GSSTGAVTTSNYAN	32
S93A_VL_CDR2	GTNKRAP	33
S93A_VL_CDR3	ALWYANLWV	312

b. Biến thể chuỗi nặng minh họa có ái lực giảm

Tên	Trình tự	Seq ID No
S35H aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMH**WVRQAP GKGLEWVG**RIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEWSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	115
S35H_VH_CDR1	NAWMH	313
S35H_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
S35H_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
G49S aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WVRQAP GKGLEWVS**RIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEWSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	116
G49S_VH_CDR1	NAWMS	16
G49S_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17

G49S_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
R50S aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WVRQAP GKGLEWVG**SIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEWSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	117
R50S_VH_CDR1	NAWMS	16
R50S_VH_CDR2	SIKSKTDGGTTDYAAPVKG	314
R50S_VH_CDR3	PWEWSWYDY	18
W96Y aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WVRQAP GKGLEWVG**RIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCTT**PYEWSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	118
W96Y_VH_CDR1	NAWMS	16
W96Y_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
W96Y_VH_CDR3	PYEWSWYDY	315
W98Y aa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS**NAWMS**WVRQAP GKGLEWVG**RIKSKTDGGTTDYAAPVKG**RFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCTT**PWEYSWYDY**WGQGTLVTVSSAS	119
W98Y_VH_CDR1	NAWMS	16
W98Y_VH_CDR2	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	17
W98Y_VH_CDR3	PWEYSWYDY	232

9) Phương án minh họa bổ sung được tạo ra từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn (CDR được gạch chân)

Tên	Trình tự	Seq ID No
90D7 aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQA PGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCAR**NYTIVVSPFDY**WGQGTLVTVSSAS	120
90D7_VH_CDR1	SYYMH	8
90D7_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
90D7_VH_CDR3	NYTIVVSPFDY	233
90C1 aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQA PGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCAR**NYFIGSVAMDY**WGQGTLVTVSSAS	121

90C1_VH_CDR1	SYYMH	8
90C1_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
90C1_VH_CDR3	NYFIGSVAMDY	234
5E8 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQA PGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCAR**GLTYSMDY**WGQGTLVTVSSAS	122
5E8_VH_CDR1	SYYMH	8
5E8_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
5E8_VH_CDR3	GLTYSMDY	235
5E8 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD**WYLQ KPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYC**MQALQIPNT**FGQGTKVEIKRT	123
5E8_VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
5E8_VL_CDR2	LGSNRAS	60
5E8_VL_CDR3	MQALQIPNT	236
12A4 VH aa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WVRQAPG KGLEWVS**AISGSGGSTYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAK**YAYALDY**WGQGTLVTVSSAS	124
12A4_VH_CDR1	SYAMS	79
12A4_VH_CDR2	AISGSGGSTYYADSVKG	80
12A4_VH_CDR3	YAYALDY	237
12A4 VL aa	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**RASQSVSSSYLA**WYQQKPGQ APRLLIY**GASSRAT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YC**QQHGSSST**FGQGTKVEIKRT	125
12A4_VL_CDR1	RASQSVSSSYLA	52
12A4_VL_CDR2	GASSRAT	53
12A4_VL_CDR3	QQHGSSST	238
7A3 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQA PGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCAR**GDFSAGRLMDY**WGQGTLVTVSSAS	126
7A3_VH_CDR1	SYYMH	8
7A3_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9

7A3_VH_CDR3	GDFSAGRLMDY	239
7A3 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD**WYLQ KPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYC**MQALQTPPIT**FGQGTKVEIKRT	127
7A3_VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
7A3_VL_CDR2	LGSNRAS	60
7A3_VL_CDR3	MQALQTPPIT	240
6E10 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQA PGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCAR**GDYNAFDY**WGHGTLVTVSSAS	128
6E10_VH_CDR1	SYYMH	8
6E10_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
6E10_VH_CDR3	GDYNAFDY	241
6E10 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD**WYLQ KPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYC**MQAWHSPT**FGQGTKVEIKRT	129
6E10_VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
6E10_VL_CDR2	LGSNRAS	60
6E10_VL_CDR3	MQAWHSPT	242
12F9 VH aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**WVRQA PGQGLEWMG**IINPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCAR**GATYTMDY**WGQGTLVTVSSAS	130
12F9_VH_CDR1	SYYMH	8
12F9_VH_CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	9
12F9_VH_CDR3	GATYTMDY	243
12F9 VL aa	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD**WYLQ KPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYC**MQALQTPIT**FGQGTKVEIKRT	131
12F9_VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
12F9_VL_CDR2	LGSNRAS	60
12F9_VL_CDR3	MQALQTPIT	244

10) Biến thể glycosit 9D11: Chuỗi nhẹ biến đổi theo các phương án minh họa (CDR được gạch chân)

Biến thể	Trình tự	Seq ID No
N95S	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQ KPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCMQASIMSRTFGQGTKVEIK	132
12F9_VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
12F9_VL_CDR2	LGSNRAS	60
12F9_VL_CDR3	MQASIMSRT	63
N95Q	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQ KPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCMQASIMQRTFGQGTKVEIK	133
N95Q_VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
N95Q_VL_CDR2	LGSNRAS	60
N95Q_VL_CDR3	MQASIMQRT	65
T97A	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQ KPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCMQASIMNRAFGQGTKVEIK	134
T97A_VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
T97A_VL_CDR2	LGSNRAS	60
T97A_VL_CDR3	MQASIMNRA	67
T97N	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQ KPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCMQASIMNRNFGQGTKVEIK	135
T97N_VL_CDR1	RSSQSLLHSNGYNYLD	59
T97N_VL_CDR2	LGSNRAS	60
T97N_VL_CDR3	MQASIMNRN	69

11) Biến thể khử amin hóa

Biến thể	Trình tự	Seq ID No
16D5 VH_D52dE	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQA PGKGLEWVGRIKSKTEGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS	248

16D5 VH_D52dQ	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQA PGKGLEWVGRIKSKTQGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS	249
CD3_VH N100A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAP GKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTLV TVSS	250
CD3_VH S100aA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAP GKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNAYVSWFAYWGQGTLV TVSS	251
16D5 [VHCH1] - CD3[VH CH1-N100A]-Phần phình Fc_PGLALA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQA PGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIR SKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	252
16D5-Phần lõm Fc-PGLALA	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQA PGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	253
CD3-CLC	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPS SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS	254
16D5 [VHCH1] - CD3[VH CH1-	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQA PGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLKTEDTAVYYCTTPWEWSWYDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV	255

S100aA]-Phần phình Fc_PGLALA	NHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR QAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNAYVSWFAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	
9D11 [VHCH1]-CD3[VHCL-N100A]-Phần phình Fc_PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGPTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARGDFAWLDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCVRHGNFGASYVSWFAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	256
9D11-Phần lõm Fc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGPTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARGDFAWLDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	257
9D11_LC [N95Q]	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCMQASIMQRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	258
CD3_VLCH1	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEK PGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAP	259

	SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC	
9D11 [VHCH1] - CD3[VH CH1-S100aA]-Phần phình Fc_PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQ APGQGLEWMGIINPSGGPTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARGDFAWLDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCVRHGNFGNAYVSWFAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	260

12) TCB dựa trên Mov19 theo các phương án minh họa (CDR được gạch chân)

Tên	Trình tự	Seq ID No
pETR11646 Mov19 VH-CH1-Phần lõm Fc PG/LALA	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSFT**GYFMN**WVKQS HGKSLEWIG**RIHPYDGDTFYNQNFKD**KATLTVDKSSNTAH MELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	136
pETR11647 Mov19 VH-CH1-CD3 VH-CL-Phần phình Fc PG/LALA	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSFT**GYFMN**WVKQS HGKSLEWIG**RIHPYDGDTFYNQNFKD**KATLTVDKSSNTAH MELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WGQGTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPKGSLKLSCAAS**GFTFNTYAMN**WVRQAPGKGLEWVA**RI RSKYNNYATYYADSVKD**RFTISRDDSQSILYLQMNNLKTED TAMYYCVR**HGNFGNSYVSWFAY**WGQGTLVTVSAASVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS	137

	NKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
pETR11644 Mov19 LC	DIELTQSPASLAVSLGQRAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQ KPGQQPKLLIY**RASNLEA**GVPTRFSGSGSKTDFTLNIHPVEEE DAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	138

Tên	Trình tự	Seq ID No
Hu IgG1 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	245

13) FolR1 TCB bổ sung có chất gắn kết ái lực trung bình (CDR theo Kabat, được gạch chân):

Tên	Trình tự	Seq ID No
biến thể 16D5 W96Y/D52E VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWV RQAPGKGLEWVGRIKSKTEGGTTDYAAPVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPYEWSWYDYWG QGTLVTVSS	274
W96Y/D52E_ VH CDR1	NAWMS	16
W96Y/D52E_ VH CDR2	RIKSKTEGGTTDYAAPVKG	275
W96Y/D52E_ VH CDR3	PYEWSWYDY	315
biến thể 16D5 W96Y/D52E VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANW VQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAAL TLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	31
W96Y/D52E_ CD3-VHCH1_Fc-phần phình_PGLALA pETR14945	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWV RQAPGKGLEWVGRIKSKTEGGTTDYAAPVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPYEWSWYDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGG GGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS TYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK	276

	DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	
W96Y/D52E_Fc-phần lõm_PGLALA_HYRF pETR14946	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWV RQAPGKGLEWVGRIKSKTEGGTTDYAAPVKGRFTISRD DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTPYEWSWYDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	277
14B1 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYAMS**WVR QAPGKGLEWVS**AISGSGGSTYYADSVKG**RFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**GDYRYRYFDY**WG QGTLVTVSS	278
14B1 VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC**QGDSLRSYYAS**WYQQ KPGQAPVLVIY**GKNNRPS**GIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAEDEADYYC**NSRESPPTGLVV**FGGGTKLTVL	279
14B1[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-phần phình_PGLALA pETR14976	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYRYRYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGG SGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTS NYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	280
14B1[EE]_Fc-phần lõm_PGLALA pETR14977	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYRYRYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV	281

	DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
14B1 LC [KK] Lambda cố định pETR14979	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQK PGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGA QAEDEADYYCNSRESPPTGLVVFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSKKLQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	282
9C7 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYYMH**W VRQAPGQGLEWMGI**INPSGGSTSYAQKFQG**RVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**GDWSYYMDY**W GQGTLVTVSS	283
9C7 VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSNGYNYLD** WYLQKPGQSPQLLIY**LGSNRAS**GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYC**MQARQTPT**FGQGTKVEIK	284
9C7[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-phần phình_PGLALA pETR14974	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHW VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGDWSYYMDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGG GGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVT TSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGT KLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	285
9C7[EE]_Fc-phần lõm_PGLALA pETR14975	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHW VRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGDWSYYMDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	286
9C7 LC [RK] pETR14980	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLD WYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFT	316

	LKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	

14) Trình tự kháng nguyên

Kháng nguyên	Trình tự	Seq ID No
hu FolR1	MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQT**RIAWARTELLNVCMNA KHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEAHKDVS YLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQ VDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHK GWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYK VSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMS**GAGP WAAWPFLLSLALMLLWLLS	139
huFolR1 ECD-AcTev-Phần phình Fc-Thẻ Avi	**RIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKN ACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQD TCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQW WEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHFY FPTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPN EEVARFYAAAMVD<u>EQLYFQG</u>**GSPKSADKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG **GLNDIFEAQKIEWHE**	140
Phần lõm Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNR FTQKSLSLSPGK	141
mu FolR1	MAHLMTVQLLLLVMWMAECAQSRA**TRARTELLNVCMDAK HHKEKPGPEDNLHDQCSPWKTNSCCSTNTSQEAHKDISYLY RFNWNHCGTMTSECKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQ SWRKERILDVPLCKEDCQQWWEDCQSSFTCKSNWHKGWN WSSGHNECPVGASCHPFTFYFPTSAALCEEIWSHSYKLSNYS RGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAEAMS**GAGLHGTWP LLCSLSLVLLWVIS	142
mu FolR1 ECD-AcTev-Phần phình Fc-thẻ Avi	**TRARTELLNVCMDAKHHKEKPGPEDNLHDQCSPWKTNSC CSTNTSQEAHKDISYLYRFNWNHCGTMTSECKRHFIQDTCL YECSPNLGPWIQQVDQSWRKERILDVPLCKEDCQQWWED CQSSFTCKSNWHKGWNWSSGHNECPVGASCHPFTFYFPTS AALCEEIWSHSYKLSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVA RFYAEAMVD<u>EQLYFQG</u>**GSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL	143

	VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG**GLNDI FEAQKIEWHE**	
cy FolR1	MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRTARARTELLNVCMNAK HHKEKPGPEDKLHEQCRPWKKNACCSTNTSQEAHKDVSYLYR FNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWR KERVLNVPLCKEDCERWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGF NKCPVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTYSYKVSNYSRGSGRCI QMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPLLLSLALT LLWLLS	144
cy FolR1 ECD-AcTev-Phần phình Fc-Thẻ Avi	**RTARARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWKKN ACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQD TCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLCKEDCEQW WEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCPVGAACQPFHFY FPTPTVLCNEIWTYSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPN EEVARFYAAAMVD<u>EQLYFQG</u>**GSPKSADKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG **GLNDIFEAQKIEWHE**	145
hu FolR2	MVWKWMPLLLLLVCVATMCSAQDRTDLLNVCMDAKHHKTK PGPEDKLHDQCSPWKKNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDH CGKMEPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVNQSWRKERFLD VPLCKEDCQRWWEDCHTSHTCKSNWHRGWDWTSGVNKCPA GALCRTFESYFPTPAALCEGLWSHSYKVSNYSRGSGRCIQMWF DSAQGNPNEEVARFYAAAMHVNAGEMLHGTGGLLLSLALML QLWLLG	146
hu FolR2 ECD-AcTev-Phần phình Fc-Thẻ Avi	**TMCSAQDRTDLLNVCMDAKHHKTKPGPEDKLHDQCSPWK KNACCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPACKRHFI QDTCLYECSPNLGPWIQQVNQSWRKERFLDVPLCKEDCQR WWEDCHTSHTCKSNWHRGWDWTSGVNKCPAGALCRTFE SYFPTPAALCEGLWSHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDSAQG NPNEEVARFYAAAMHVVD<u>EQLYFQG</u>**GSPKSADKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKSG**GLNDIFEAQKIEWHE**	147
hu FolR3	MAWQMMQLLLLALVTAAGSAQPR**SARARTDLLNVCMNAKH HKTQPSPEDELYGQCSPWKKNACCTASTSQELHKDTSRLY NFNWDHCGKMEPTCKRHFIQDSCLYECSPNLGPWIRQVNQ SWRKERILNVPLCKEDCERWWEDCRTSYTCKSNWHKGWN WTSGINECPAGALCSTFESYFPTPAALCEGLWSHSFKVSNYS RGSGRCIQMWFDSAQGNPNEEVAKFYAAAMNAGAPSRGII DS**	148
hu FolR3	**SARARTDLLNVCMNAKHHKTQPSPEDELYGQCSPWKKNA CCTASTSQELHKDTSRLYNFNWDHCGKMEPTCKRHFIQDS**	149

ECD-AcTev-Phần phình Fc-Thẻ Avi	**CLYECSPNLGPWIRQVNQSWRKERILNVPLCKEDCERWWE DCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGINECPAGALCSTFESYFPTP AALCEGLWSHSFKVSNYSRGSGRCIQMWFDSAQGNPNEEV AKFYAAAMNAGAPSRGIIDSVDEQLYFQG**GSPKSADKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKSG**GLNDIFEAQKIEWHE**	
hu CD3ε	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWG**QDGNEEMGGITQTPYKVSIS GTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHL SLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCM EMD**VMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGA GAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI	150

15) Trình tự nucleotit theo các phương án minh họa

Mô tả	Trình tự	Seq ID No
16A3	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCAACTACTACGCTGGTGTTACTCCGTTCGACT ATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	151
15A1	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCAACTACTACATCGGTGTTGTTACTTTCGACT ATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	152
18D3	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCAACTACTACACTGGTGGTTCTTCTGCTTTCG ACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	153
19E5	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGNTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC	154

	CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCGGTGAATGGCGTCGTTACACTTCTTTCGACT ATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	
19A4	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCGGTGGTTGGATCCGTTGGGAACATTTCGACT ATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	155
15H7	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCAACTACTACCTGTTCTCTACTTCTTTCGACTA TTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	156
15B6	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAGGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCAACTACTACATCGGTATCGTTCCGTTCGACT ATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	157
16D5	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACC GGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCA CCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCG GGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAA CTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGG TCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGT ATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGT CTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATT ATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	158
15E12	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACC GGGCGGTTCCCNGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCA CCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCG GGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAA CTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGG TCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGT ATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACCGAAGACACCGCAGT CTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTACTTCGATT	159

	ATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	
21D1	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCAACTACTACGTTGGTGTTTCTCCGTTCGACT ATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	160
16F12	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGNTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCNTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCAACTTCACTGTTCTGCGTGTTCCGTTCGACT ATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	161
21A5	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACC GGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCA CCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCG GGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAA CTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGG TCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGT ATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGT CTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGGCTTGGTTCGATT ATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	162
21G8	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACC GGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCA CCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCG GGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAA CTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGG TCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGT ATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACCGAAGACACCGCAGT CTACTACTGTACTACCCCTTGGGAATGGGCTTACTTCGATT ATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCC	163
19H3	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCACTGGTTGGTCTCGTTGGGGTTACATGGACT ATTGGGGCCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	164
20G6	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG	165

	CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCGGTGAATGGATCCGTTACTACCATTTCGACT ATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	
20H7	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCGTTGGTTGGTACCGTTGGGGTTACATGGACT ATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	166
11F8_VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC CTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGC ACATTCAGCAGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCC CTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTAT CTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGG GTAACCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAGCCTACA TGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTA TTACTGTGCGAGAGCTGTTTTCTACCGTGCTTGGTACTCTTT CGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	167
11F8_VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACCGTGTCACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGA GTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGG AAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGGCAGTGGATCCGG GACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGCCTGATG ATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATACCAGCCCACCA CCAACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAG	168
36F2_VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCATGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCTCTTTCTTCACTGGTTTCCATCTGGACTATTG GGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	169
36F2_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAG AGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAC CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGC AGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGAT CCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATACCAACGA ACATTATTATACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATC AAA	170
9D11_VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC	171

	CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCCCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCGGTGACTTCGCTTGGCTGGACTATTGGGGTC AAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	
9D11_VL	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGAC TCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAGT CTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGTAC CTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCT GGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCG GCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGT GTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGG CAAGCATTATGAACCGGACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGT CGAAATTAAA	172
9D11_VL N95S	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGAC TCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAGT CTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGTAC CTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCT GGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCG GCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGT GTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGG CAAGCATTATGAGCCGGACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGT CGAAATTAAA	173
9D11_VL N95Q	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGAC TCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAGT CTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGTAC CTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCT GGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCG GCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGT GTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGG CAAGCATTATGCAGCGGACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGT CGAAATTAAA	174
9D11_VL T97A	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGAC TCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAGT CTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGTAC CTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCT GGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCG GCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGT GTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGG CAAGCATTATGAACCGGGCTTTTGGTCAAGGCACCAAGGT CGAAATTAAA	175
9D11_VL T97N	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGAC TCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAGT CTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGTAC CTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCT GGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCG GCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGT	176

	GTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGG CAAGCATTATGAACCGGAATTTTGGTCAAGGCACCAAGGT CGAAATTAAA	
5D9_VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCTCTTACATCGACATGGACTATTGGGGTCAAG GCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	177
5D9_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAG AGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAC CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGC AGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGAT CCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGATAACTGGAG CCCAACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA	178
6B6_VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCTCTTACGTTGACATGGACTATTGGGGTCAAG GCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT	179
6B6_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAG AGTGTTAGCAGCAGCTACCTAGCCTGGTACCAGCAGAAAC CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGC AGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGAT CCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGGATATTTGGAG CCCAACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA	180
14E4_VH	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTC ACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGT GGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG CAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATT ACTGTGCGAAAGACTCTTCTTACGTTGAATGGTACGCTTTC GACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	181
14E4_VL	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAG AGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAC CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGC	182

	AGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGAT CCGGGACAGACTCCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCC TGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGCCAACCAGCA GCCCAATTACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAA A	
Chuỗi nặng CD3 (VHCH1)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTC ACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCC TGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAG TACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCT GTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTA TGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGA CCGTGTCAAGCGCTAGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCC CTGGCACCCAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCG CTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCC TGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCCTCTAGCTCCCTGGGAACA CAGACATATATCTGTAATGTCAATCACAAGCCTTCCAACAC CAAAGTCGATAAGAAAGTCGAGCCCAAGAGCTGC	183
Chuỗi nặng CD3 được liên kết (VHCκ)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTC ACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCC TGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAG TACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCT GTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTA TGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGA CCGTGTCAAGCGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATC TTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTC CGTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTA AAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGTCCGGCAA CTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCAAGGACAGC ACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCTGA TTATGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT	184
Đoạn mồi đột biến GAB7734 N95Q	GCAGGCAAGCATTATGCAGCGGACTTTTGGTCAAGG	185
Đoạn mồi đột biến GAB7735 N95S	CAGGCAAGCATTATGAGCCGGACTTTTGGTCAAGG	186
Đoạn mồi đột biến	CATTATGAACCGGGCTTTTGGTCAAGGCACCAAGGTC	187

GAB7736 T97A		
Đoạn mồi đột biến GAB7737 T97N	CATTATGAACCGGAATTTTGGTCAAGGCACCAAGGTC	188
VHCH1[16D5]_VHCH1[CD3]_Phần phình Fc_PGLALA pCON999 (Nghịch chuyển TCB với 16D5 2+1: pCON999 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACC GGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCA CCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCG GGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAA CTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGG TCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGT ATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGT CTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATT ATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGC ACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCAGCAGCA AGAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGT GAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC AGCGGAGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACTTTCCCTGCCGT GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTC ACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCC GGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCG GCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTG TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACT GGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTC CCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTAC GCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACG ACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCG GGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGGC AACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGG CCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTACCAAG GGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAGAGCA CATCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAG AGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCC CTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATGTCA ATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCGATAAGAAAGTCGA GCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC	189

	CTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA	
VHCH1[16D5]_Phần lõm Fc_PGLALA_HYRF pCON983	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACC GGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCA CCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCG GGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAA CTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGG TCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGT ATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGT CTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATT ATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGC ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAA GAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACA GCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTG CTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCAC CGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCGCTTCACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAA	190
CD3_chuỗi nhẹ chung pETR13197	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTGTCTC CTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAAA AGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAA CAAGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCT CTGCTGGGAGGAAAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCC AGCCAGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTA	191

	CAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTCCTAGGTCAACCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTT CCCCCCCAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGGCCACC CTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGAC CGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGC GTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGT ACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTG GAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAG GGCAGCACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCA GC	
VHCH1[CD3]_VHCH1[16D5]_Phần phình Fc_PGLALA pETR13932 (TCB cổ điển có 16D5; 2+1: pETR13932+ pCON983+ pETR13197)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTC ACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCC TGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAG TACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCT GTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTA TGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGA CCGTGTCATCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCT CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGAACAGCCG CCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGGCGTGC ACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCC CTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGAT GGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAA TTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACCGGGCGGTTC CCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCACCTTCTCCA ACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCGGGCAAAGG CCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAACTGACGGTG GCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGGTCGTTTTACC ATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGTATCTGCAGAT GAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGTCTACTACTGTA CTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATTATTGGGGCCAG GGCACGCTGGTTACGGTGTCTAGCGCTAGTACCAAGGGCC CCAGCGTGTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAGAGCACATCT GGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGACTACT TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCA GCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCCCTCT AGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATGTCAATCA CAAGCCTTCCAACACCAAAGTCGATAAGAAAGTCGAGCCC AAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG CACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA	192

	GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA	
VHCH1[CD3]_Phần phình Fc_PGLALA pETR13719 (16D5 mô hình IgG, 1+1: pETR13719 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTC ACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCC TGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAG TACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCT GTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTA TGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGA CCGTGTCATCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGC AGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	193
Fc_phần lõm_PGLALA_HYRF	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG	194

pETR10755 (16D5 đầu đến đuôi, 1+1: pCON999 + pETR10755 + pETR13197)	TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCG CAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CGCTTCACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
VHCH1[9D11]_VHCL[CD3]_Phần phình Fc_PGLALA pCON1057 (mô hình nghịch chuyển 9D11, 2+1: pCON1057 + pCON1051 + pCON1063 + pETR12940)	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCCCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCGGTGACTTCGCTTGGCTGGACTATTGGGGTC AAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGCACAAAGGGC CCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCACATC TGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTAC TTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCCCT GACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGC AGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAG CCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAG GATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGT GCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGC GGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCA GGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGA AGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCG TGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAA CACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAA CAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCC TCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTG TTTATCTTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCAC CGCCTCCGTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGG AAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGTC CGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCAAG GACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACACTGTCTAA GGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA ACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTG TCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCTGTT CCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC	195

	CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGG ACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA AGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAA	
9D11_Phần lõm Fc_PGLALA_HYRF pCON1051	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCCCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCGGTGACTTCGCTTGGCTGGACTATTGGGGTC AAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGCACCAAGGGC CCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAG CGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCT GACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTT CTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCT AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGC CCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCT GCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC CTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA	196
9D11_LC	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGAC	197

pCON1063	TCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAGT CTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGTAC CTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACCT GGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTCAGCG GCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCAGCCGT GTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTATGCAGG CAAGCATTATGAACCGGACTTTTGGTCAAGGCACCAAGGT CGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA CCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGA CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT	
VLCH1[CD3] pETR12940	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTGTCTC CTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAAA AGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAA CAAGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCT CTGCTGGGAGGAAAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCC AGCCAGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTA CAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTGCTGAGCAGCGCTTCCACCAAAGGCCCTTCCGTGTTTCC TCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAGGCACCGCTG CTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATTTTCCTGAGCCTGTG ACAGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACCTCTGGAGTGC ATACTTTCCCCGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGACTGTACAGC CTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT	198
VHCL[CD3]_Phần phình Fc_PGLALA pETR13378 (**mô hình 9D11 CrossMab, 1+1:** pETR13378 + pCON1051 + pCON1063 + pETR129	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTC ACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCC TGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAG TACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCT GTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTA TGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGA CCGTGTCATCTGCTAGCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCT TTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCC GTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAA AGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGTCCGGCAAC TCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCAAGGACAGCA CCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCTGAT TATGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGTGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCC	199

40)	CTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCA AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGA AGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAC AACGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG TGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAA	
16D5 nghịch chuyển 2+1 với N100A trong CDR H3 pETR14096 (pETR14096 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACC GGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCA CCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCG GGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAA CTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGG TCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGT ATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGT CTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATT ATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGC ACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCAGCAGCA AGAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGT GAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC AGCGGAGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACTTTCCCTGCCGT GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTC ACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCC GGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCG GCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTG TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACT GGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTC CCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTAC GCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACG ACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCG GGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGGC AACTTCGGCGCCAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGG CCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTACCAAG GGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAGAGCA CATCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAG AGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCC CTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATGTCA	200

	ATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCGATAAGAAAGTCGA GCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA	
16D5 nghịch chuyển 2+1 với S100aA trong CDR H3 pETR14097 (pETR14097 + pCON983 + pETR13197)	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACC GGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCA CCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCG GGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAA CTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGG TCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGT ATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGT CTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATT ATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGC ACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCAGCAGCA AGAGCACAAGCGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGT GAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAAC AGCGGAGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACTTTCCCTGCCGT GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTC ACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCC GGAGGCGGAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCG GCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTG TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACT GGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTC CCGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTAC GCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACG ACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCG GGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGGC AACTTCGGCAACGCCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGG CCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTACCAAG GGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAGAGCA CATCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAAGA CTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAG	201

	AGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTCACCGTGCC CTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATGTCA ATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTCGATAAGAAAGTCGA GCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGC CCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA	
Chuỗi nhẹ CD3 được dung hợp với CH1; Fc_PGLALA; pETR13862 (kháng thể Kappa-lambda có chuỗi nhẹ CD3 chung được dung hợp với CH1 + Fc_PGLALA. VH được dung hợp với chuỗi hằng định kappa hoặc lambda pETR138	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTGTCTC CTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAAA AGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAA CAAGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCT CTGCTGGGAGGAAAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCC AGCCAGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTA CAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTGCTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGG CGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC	202

59 + pETR13860 + pETR13862)	CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
16D5 VH được dung hợp với chuỗi kappa hằng định; pETR13859	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAACC GGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGATTCA CCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAGGCCCCG GGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAGTCTAAAA CTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCAGTTAAAGG TCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAAAACACTCTGT ATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAAGACACCGCAGT CTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGGTCTTGGTACGATT ATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACGGTGTCTTCCGCTAGC GTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGA GCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGA ACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT GGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAATCCGTG ACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTC CACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAG GTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCC CGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGC	203
CD3 VH được dung hợp với chuỗi lambda hằng định; pETR13860	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTC ACCTTCTCCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGACAGGCTCC TGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGATCCAAG TACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACTCCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCTCTCGGGACGACTCCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCG TGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACTCCTAT GTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGAC CGTGTCATCTGCTAGCCCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCC TGTTTCCCCCCAGCAGCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGGC CACCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCG TGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGC CGGCGTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAAC AAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGC AGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCA CGAGGGCAGCACC GTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGC	204
VHCH1[36F2]_VHCL[CD3]_Fc phần phình_PGLALA pCON1056	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCATGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCTCTTTCTTCACTGGTTTCCATCTGGACTATTG GGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGCACAA AGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAG	246

	CACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAG GACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGG CGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGC AGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGGTCACCGT GCCTAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAG GTGGAGCCCAAG AGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAGGATCCG AGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCC TGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCA CCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCT GGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAGT ACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGG CCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCG TGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTAT GTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGAC CGTGTCAAGCGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCT TTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCC GTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAA AGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGTCCGGCAAC TCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCAAGGACAGCA CCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCTGAT TATGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAA GACCCACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTG GCGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGAC ACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGG TGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAA TTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGTAAA	
36F2-Phần lõm Fc PGLALA pCON1050	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAAG CGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCGCG TCACGATGACCCATGACACTAGCACCTCTACCGTTTATATG	247

	GAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGTACTA CTGTGCACGCTCTTTCTTCACTGGTTTCCATCTGGACTATTG GGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGCACCA AGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGC ACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGA GCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCA GAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGC CTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTG GAGCCCAAG AGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCAC CTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTC TCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
36F2 LC pCON1062	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAG AGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAC CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGC AGGGCCACTGGCATCCCnAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGA TCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCC TGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATACCAACG AACATTATTATACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAAT CAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGA GAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCANGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GT	97
CD3 VLCH1 pETR12940	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTGTCTC CTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGGAAA AGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAA	198

	CAAGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCT CTGCTGGGAGGAAAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGCCC AGCCAGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTA CAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTGCTGAGCAGCGCTTCCACCAAAGGCCCTTCCGTGTTTCC TCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAGGCACCGCTG CTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATTTTCCTGAGCCTGTG ACAGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACCTCTGGAGTGC ATACTTTCCCCGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGACTGTACAGC CTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT	

Tên	Trình tự	Seq ID No
K53A nt	CAGACCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTGTCTC CTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGCAGA AGCCAGGCCAGGCTCCCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAA CGCCAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCTC TGCTGGGAGGAAAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGTGCA GCCTGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTAC AGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAG TCCTA	205
S93A nt	CAGACCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTGTCTC CTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGCAGA AGCCAGGCCAGGCTCCCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAA CAAGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCAGCGGATCT CTGCTGGGAGGAAAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGTGC AGCCTGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGTA CGCCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACA GTCCTA	206

Tên	Trình tự	Seq ID No
S35H nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGTGAAG CCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCT TCACCTTCAGCAACGCCTGGATGCACTGGGTGCGCCAGGC CCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGGTGGGACGGATCAAGAG CAAGACCGATGGCGGCACCACCGACTATGCCGCCCCTGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTGGTCTT GGTACGACTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTC CTCTGCTAGC	207
G49S nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGTGAAG CCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCT TCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTGGGTGCGCCAGGC	208

	CCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCCGGATCAAGAG CAAGACCGATGGCGGCACCACCGACTATGCCGCCCCTGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTGGTCTT GGTACGACTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTC CTCTGCTAGC	
R50S nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGTGAAG CCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCT TCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTGGGTGCGCCAGGC CCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGGTGGGATCTATCAAGAG CAAGACCGACGGCGGCACCACCGACTATGCCGCCCCTGT GAAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAA CACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTGGTCT TGGTACGACTATTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGT CCTCT GCTAGC	209
W96Y nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGTGAAG CCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCT TCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTGGGTGCGCCAGGC CCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGGTGGGACGGATCAAGAG CAAGACCGATGGCGGCACCACCGACTATGCCGCCCCTGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCACCACCCCCTACGAGTGGTCTT GGTACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTC ATCT GCTAGC	210
W98Y nt	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGTGAAG CCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCT TCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTGGGTGCGCCAGGC CCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGGTGGGACGGATCAAGAG CAAGACCGATGGCGGCACCACCGACTATGCCGCCCCTGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGGGACGACAGCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCACCACCCCCTGGGAGTACTCTT GGTACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTC ATCT GCTAGC	211

Tên	Trình tự	Seq ID No
90D7 nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAA GCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCG CGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTAT ATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGT	212

	ACTACTGTGCACGCAACTACACTATCGTTGTTTCTCCGTTC GACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTG CTAGC	
90C1 nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAA GCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCG CGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTAT ATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGT ACTACTGTGCACGCAACTACTTCATCGGTTCTGTTGCTATG GACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTG CTAGC	213
5E8 VH nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAA GCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCG CGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTAT ATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGT ACTACTGTGCACGCGGTCTGACTTACTCTATGGACTATTG GGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC	214
5E8 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGAC TCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAG TCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGT ACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTA CCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTC AGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCA GCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTAT GCAGGCACTGCAGATTCCAAACACTTTTGGTCAAGGCACC AAGGTCGAAATTAAACGTACG	215
12A4 VH nt	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGAT TCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGT AGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC CGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGAAATACGCTTACGCTCTGGACTACTG GGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGC	216
12A4 VL nt	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAA ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCC AGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGT GGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGG AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGCATGG CAGCAGCAGCACGTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAAT CAAACGTACG	217
7A3 VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC	218

nt	CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAA GCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCG CGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTAT ATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGT ACTACTGTGCACGCGGTGACTTCTCTGCTGGTCGTCTGAT GGACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCT GCTAGC	
7A3 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGAC TCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAG TCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGT ACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTA CCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTC AGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCA GCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTAT GCAGGCACTGCAGACCCCACCAATTACCTTTGGTCAAGGC ACCAAGGTCGAAATTAAACGTACG	219
6E10 VH nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAA GCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCG CGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTAT ATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGT ACTACTGTGCACGCGGTGACTACAACGCTTTCGACTATTG GGGTCACGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC	220
6E10 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGAC TCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAG TCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGT ACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTA CCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTC AGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCA GCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTAT GCAGGCATGGCATAGCCCAACTTTTGGTCAAGGCACCAA GGTCGAAATTAAACGTACG	221
12F9 VH nt	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGATA CACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACCCAA GCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGGGTCG CGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCGTTTAT ATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTGCAGTGT ACTACTGTGCACGCGGTGCTACTTACACTATGGACTATTG GGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTGCTAGC	222
12F9 VL nt	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGAC TCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCCAG TCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATTGGT ACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTA CCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACCGTTTC	223

	AGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGAAAATCA GCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATTACTGTAT GCAGGCACTGCAGACCCCAATTACTTTTGGTCAAGGCACC AAGGTCGAAATTAAACGTACG	

Tên	Trình tự	Seq ID No
pETR11646 Mov19 VH-CH1-Phần lõm Fc PG/LALA	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGTGAAA CCTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCT ACAGCTTCACCGGCTACTTCATGAACTGGGTCAAGCAGAG CCACGGCAAGAGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCCACCC CTACGACGGCGACACCTTCTACAACCAGAACTTCAAGGAC AAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAACACCGCC CACATGGAACTGCTGAGCCTGACCAGCGAGGACTTCGCC GTGTACTACTGCACCAGATACGACGGCAGCCGGGCCATG GATTATTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCCAGC GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCA GCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTC CTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTC CCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCA GCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCG CAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	224
pETR11647 Mov19 VH-CH1-CD3 VH-CL-Phần phình Fc PG/LALA	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAGCTCGTGAAA CCTGGCGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCT ACAGCTTCACCGGCTACTTCATGAACTGGGTCAAGCAGAG CCACGGCAAGAGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCCACCC CTACGACGGCGACACCTTCTACAACCAGAACTTCAAGGAC AAGGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCAGCAACACCGCC CACATGGAACTGCTGAGCCTGACCAGCGAGGACTTCGCC GTGTACTACTGCACCAGATACGACGGCAGCCGGGCCATG GATTATTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTGTCCAGC	225

	GCTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTA GCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCT GCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGTC CTGGAACTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTT CCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCA GCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCA AAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATGGCG GAGGAGGGTCCGGAGGCGGAGGATCCGAAGTGCAGCTGG TGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTAAGGGCTCTC TGAAGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAACAC CTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGG CCTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAA TTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACCGGTTC ACCATCAGCCGGGACGACAGCCAGAGCATCCTGTACCTG CAGATGAACAACCTGAAAACCGAGGACACCGCCATGTAC TACTGCGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGT CTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACAGT GTCTGCTGCTAGCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTC CCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGT CGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAA GTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACTGCAGTCCGGCAAC TCCCAGGAATCTGTGACAGAACAGGACTCCAAGGACAGC ACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCTG ATTATGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGGAGAGTGTGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCC TGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCC CCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCC CCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGG ACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGG AAGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
pETR11644 Mov19 LC	GACATCGAGCTGACCCAGAGCCCTGCCTCTCTGGCCGTGT CTCTGGGACAGAGAGCCATCATCAGCTGCAAGGCCAGCC AGAGCGTGTCCTTTGCCGGCACCTCTCTGATGCACTGGTA TCACCAGAAGCCCGGCCAGCAGCCCAAGCTGCTGATCTAC AGAGCCAGCAACCTGGAAGCCGGCGTGCCCACAAGATTT TCCGGCAGCGGCAGCAAGACCGACTTCACCCTGAACATCC	226

	ACCCCGTGGAAGAAGAGGACGCCGCCACCTACTACTGCC AGCAGAGCAGAGAGTACCCCTACACCTTCGGCGGAGGCA CCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	

Biến thể	Trình tự	Seq ID No
16D5 VH_D52dE	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAA CCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGA TTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAG GCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAG TCTAAAACTGAGGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCA GTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAA AACACTCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAA GACACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGG TCTTGGTACGATTATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACG GTGTCTTCC	261
16D5 VH_D52dQ	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAA CCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGA TTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAG GCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAG TCTAAAACTCAGGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCA GTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAA AACACTCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAA GACACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGG TCTTGGTACGATTATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACG GTGTCTTCC	262
CD3_VH N100A	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCA GCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGG CTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCA GGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAG AAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACA GCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGC AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAAC TTCGGCGCCAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCC AGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGC	263
CD3_VH S100aA	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCA GCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGG CTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCA GGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAG AAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACA GCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGC	264

	AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAAC TTCGGCAACGCCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCC AGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGC	
16D5 [VHCH1] - CD3[VH CH1-N100A]-Phần phình Fc_PGLALA	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAA CCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGA TTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAG GCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAG TCTAAAACTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCA GTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAA AACACTCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAA GACACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGG TCTTGGTACGATTATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACG GTGTCTTCCGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCT CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGAACAGC CGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCC CGTGACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCG GCGTGCACACTTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC TGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCA GCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACA AGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCC AAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAGG ATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGT GCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAG CGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCG CCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGAT CAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCG ACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGAC AGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCG GGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGG CAACTTCGGCGCCAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGG GGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTACC AAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAG AGCACATCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTG AAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAC TCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCC GTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTG GTCACCGTGCCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATAT ATCTGTAATGTCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTC GATAAGAAAGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC	265

	CCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCGGGTAAA	
16D5-Phần lõm Fc-PGLALA	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAA CCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGA TTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAG GCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAG TCTAAAACTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCA GTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAA AACACTCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAA GACACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGG TCTTGGTACGATTATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACG GTGTCTTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCC TGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCC GCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTG TATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGC CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAA GAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGCTTCAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	266
CD3-CLC	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTGTCT CCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGTTCTACA GGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCA GGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCG GCACCAACAAGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCA GCGGATCTCTGCTGGGAGGAAAGGCCGCCCTGACACTGT CTGGCGCCCAGCCAGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGC	267

	GCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGC ACCAAGCTGACAGTCCTAGGTCAACCCAAGGCTGCCCCC AGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAACTGCAG GCCAACAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTC TACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAG CAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCCA GCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTAC CTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTC CTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGG AGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGC	
16D5 [VHCH1] - CD3[VH CH1-S100aA]-Phần phình Fc_PGLA LA	GAGGTGCAATTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTAAAA CCGGGCGGTTCCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTTCCGGA TTCACCTTCTCCAACGCGTGGATGAGCTGGGTTCGCCAG GCCCCGGGCAAAGGCCTCGAGTGGGTTGGTCGTATCAAG TCTAAAACTGACGGTGGCACCACGGATTACGCGGCTCCA GTTAAAGGTCGTTTTACCATTTCCCGCGACGATAGCAAA AACACTCTGTATCTGCAGATGAACTCTCTGAAAACTGAA GACACCGCAGTCTACTACTGTACTACCCCGTGGGAATGG TCTTGGTACGATTATTGGGGCCAGGGCACGCTGGTTACG GTGTCTTCCGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCT CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGAACAGC CGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCC CGTGACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCG GCGTGCACACTTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC TGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCA GCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACA AGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCC AAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAGG ATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGT GCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAG CGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCG CCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGAT CAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTACGCCG ACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGAC AGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCG GGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGG CAACTTCGGCAACGCCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGG GGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTACC AAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCACCCAGCAGCAAG AGCACATCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTG AAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAC TCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCC GTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTG GTCACCGTGCCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAGACATAT ATCTGTAATGTCAATCACAAGCCTTCCAACACCAAAGTC GATAAGAAAGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCA CACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA	268

	ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCGGGTAAA	
9D11 [VHCH1] - CD3[VH CL-N100A]-Phần phình Fc_PGLALA	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAA CCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGA TACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAG CCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACC CAAGCGGTGGCCCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGG GTCGCGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCG TTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTG CAGTGTACTACTGTGCACGCGGTGACTTCGCTTGGCTGG ACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTG CTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTA GCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGC TGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTG TCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACC TTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTG AGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGA TGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGC AGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCG GATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAG TACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACAC CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACAC CGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCGC CAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCAC CCTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTGTGGCCGCTCCCTC CGTGTTTATCTTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAG CGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTAC CCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGC ACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACA GGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCT GACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCC	269

	ACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCG GCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGG TGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCGGGTAAA	
9D11-Phần lõm Fc	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAA CCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGA TACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAG CCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACC CAAGCGGTGGCCCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGG GTCGCGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCG TTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTG CAGTGTACTACTGTGCACGCGGTGACTTCGCTTGGCTGG ACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTG CTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCA GCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTG AGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGA CAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGC TGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCA CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAG	270

	AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
9D11_LC [N95Q]	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGA CTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCC AGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATT GGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGA TCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACC GTTTCAGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGA AAATCAGCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATT ACTGTATGCAGGCAAGCATTATGCAGCGGACTTTTGGTC AAGGCACCAAGGTCGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCA CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAG AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	271
CD3_VL CH1	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCCTGACAGTGTCT CCTGGCGGCACCGTGACCCTGACATGTGGCAGTTCTACA GGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCA GGAAAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCG GCACCAACAAGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCA GCGGATCTCTGCTGGGAGGAAAGGCCGCCCTGACACTGT CTGGCGCCCAGCCAGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGC GCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGC ACCAAGCTGACAGTGCTGAGCAGCGCTTCCACCAAAGGC CCTTCCGTGTTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCT CTGGAGGCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATT ATTTTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAATAGCGGAG CACTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCCGCTGTGCTGCA GTCCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGT GCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAACCCAAGTCTTGT	272
9D11 [VHCH1] - CD3[VH CH1- S100aA]- Phần phình Fc_PGLA LA	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAA CCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGA TACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAG CCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACC CAAGCGGTGGCCCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGG GTCGCGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCG TTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTG CAGTGTACTACTGTGCACGCGGTGACTTCGCTTGGCTGG ACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTTCTG CTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTA GCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGC TGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTG TCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACC	273

	TTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTG AGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGA TGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCGGAGGATCCGAGGTGC AGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCG GATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTG GCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCCGGATCAGAAGCAAG TACAACAACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACAC CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACAC CGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAA CGCCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCAC CCTCGTGACCGTGTCAAGCGCTAGTGTGGCCGCTCCCTC CGTGTTTATCTTTCCCCCATCCGATGAACAGCTGAAAAG CGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTAC CCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGC ACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAGAACA GGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCT GACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCC ACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCG GCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGG TGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGTCTCCGGGTAAA	

Tên	Trình tự	Seq ID No
biến thể 16D5 W96Y/D5 2E VH	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGTGAA GCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGG CTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTGGGTGCGCCA GGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGGTGGGACGGATCA AGAGCAAGACCGAGGGCGGCACCACCGACTATGCCGCC CCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGGGACGACAG	287

	CAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAA CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCACCCCCTACG AGTGGTCTTGGTACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCG TGACCGTGTCATCT	
W96Y/D52E_CD3-VHCH1_Fc-phần phình_PG LALA pETR14945	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGTGAA GCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGG CTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTGGGTGCGCCA GGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGGTGGGACGGATCA AGAGCAAGACCGAGGGCGGCACCACCGACTATGCCGCC CCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGGGACGACAG CAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAA CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCACCCCCTACG AGTGGTCTTGGTACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCG TGACCGTGTCATCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTGT TCCCTCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACAAGCGGCGGA ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACA AGCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGC GGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTAGC AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGA GCCCAAGAGCTGTGATGGCGGAGGAGGGTCCGGAGGCG GAGGATCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGA CTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCC GCCAGCGGCTTCACCTTCAGCACCTACGCCATGAACTGG GTGCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCC CGGATCAGAAGCAAGTACAACAACTACGCCACCTACTAC GCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGA CGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCT GCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGTGTGCGGCA CGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTA CTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGACCGTGTCAAGCGCT AGTACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCACCCAGC AGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGT CTGGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCT TGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTT CCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGTCC TCCGTGGTCACCGTGCCCTCTAGCTCCCTGGGAACACAG ACATATATCTGTAATGTCAATCACAAGCCTTCCAACACC AAAGTCGATAAGAAAGTCGAGCCCAAGAGCTGCGACAA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGC AGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA	288

	CCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
W96Y/D52E_Fc-phần lõm_PGLALA_HYRF pETR14946	GAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGCGGCCTCGTGAA GCCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGG CTTCACCTTCAGCAACGCCTGGATGAGCTGGGTGCGCCA GGCCCCTGGAAAAGGACTCGAGTGGGTGGGACGGATCA AGAGCAAGACCGAGGGCGGCACCACCGACTATGCCGCC CCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCAGGGACGACAG CAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAA CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCACCCCCTACG AGTGGTCTTGGTACGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCG TGACCGTGTCATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGT TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGC ACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACC TCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCT GGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCT AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTG CCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC GCTTCACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	289
14B1 VH	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGA TTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGT GGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC	290

	GGCCGTATATTACTGTGCGCGTGGTGACTACCGTTACCG TTACTTCGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGT CTCGAGT	
14B1 VL	TCTTCTGAACTGACTCAAGATCCAGCTGTTAGCGTGGCT CTGGGTCAGACTGTACGTATCACCTGCCAAGGCGATTCT CTGCGCTCCTACTACGCAAGCTGGTACCAGCAGAAACCG GGTCAGGCCCCAGTTCTGGTGATTTACGGCAAAAACAAC CGTCCGTCTGGGATCCCGGACCGTTTCTCCGGCAGCTCTT CCGGTAACACGGCGAGCCTCACCATCACTGGCGCTCAAG CAGAAGACGAGGCCGACTATTACTGTAACTCTCGGGAAA GCCCACCAACCGGCCTGGTTGTCTTCGGTGGCGGTACCA AGCTGACCGTCCTA	291
14B1[EE] _CD3[VL CH1]_Fc- phần phình_PG LALA pETR149 76	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGA TTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGT GGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGCGTGGTGACTACCGTTACCG TTACTTCGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGT CTCGAGTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCT GGCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGAACTGCCGC TCTGGGCTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGT GACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTAC TCCCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCT CCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAACCCAAGTCC TGCGACGGTGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCCCA GGCTGTCGTGACCCAGGAACCCTCCCTGACAGTGTCTCC TGGCGGCACCGTGACCCTGACCTGTGGATCTTCTACCGG CGCTGTGACCACCTCCAACTACGCCAATTGGGTGCAGGA AAAGCCCGGCCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCGGCA CCAACAAGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCTCCG GTTCTCTGCTGGGCGGCAAGGCTGCCCTGACTCTGTCTG GTGCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTACTGCGCCC TGTGGTACTCCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCA AGCTGACCGTGCTGTCCAGCGCTTCCACCAAGGGACCCA GTGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCTCCAAGTCTACATCCG GTGGCACAGCTGCCCTGGGATGTCTCGTGAAGGACTACT TTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCC TGACCAGCGGAGTGCACACATTCCCTGCAGTGCTGCAGA GCAGCGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGC CTTCCTCTAGCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATG TGAATCATAAGCCCAGTAATACCAAAGTGGATAAGAAA GTGGAACCTAAGAGCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCC CCCTGCCCTGCTCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCTAGCGTG TTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC TCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTG	292

	TCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTG GACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAG AGAGGAACAGTACAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGT GCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAG AGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGGCGCTC CCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCC CGGGAACCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A	
14B1[EE] _Fc-phần lõm_PGL ALA pETR149 77	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGA TTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGT GGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTATATTACTGTGCGCGTGGTGACTACCGTTACCG TTACTTCGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGT CTCGAGTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCG CTCTGGGCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCCGAGCCCG TGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCG TGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGT ATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCC TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA CCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	293

14B1 LC [KK] Lambda hằng định pETR14979	TCTTCTGAACTGACTCAAGATCCAGCTGTTAGCGTGGCT CTGGGTCAGACTGTACGTATCACCTGCCAAGGCGATTCT CTGCGCTCCTACTACGCAAGCTGGTACCAGCAGAAACCG GGTCAGGCCCCAGTTCTGGTGATTTACGGCAAAAACAAC CGTCCGTCTGGGATCCCGGACCGTTTCTCCGGCAGCTCTT CCGGTAACACGGCGAGCCTCACCATCACTGGCGCTCAAG CAGAAGACGAGGCCGACTATTACTGTAACTCTCGGGAAA GCCCACCAACCGGCCTGGTTGTCTTCGGTGGCGGTACCA AGCTGACCGTCCTAGGTCAACCCAAGGCTGCCCCCAGCG TGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCAAGAAACTGCAGGCCA ACAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTACC CAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGC CCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCCAGCAA GCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGA GCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTAC AGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGAA AACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAGC	294
9C7 VH	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAA CCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGA TACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAG CCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACC CAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGG GTCGCGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCG TTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTG CAGTGTACTACTGTGCACGCGGTGACTGGTCTTACTACA TGGACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTT CT	295
9C7 VL	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGA CTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCC AGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATT GGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGA TCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACC GTTTCAGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGA AAATCAGCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATT ACTGTATGCAGGCACGGCAGACCCCAACTTTTGGTCAAG GCACCAAGGTCGAAATTAAA	296
9C7[EE]_CD3[VLCH1]_Fc-phần phình_PG LALA pETR14974	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAA CCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGA TACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAG CCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACC CAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGG GTCGCGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCG TTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTG CAGTGTACTACTGTGCACGCGGTGACTGGTCTTACTACA TGGACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTT CTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCCCC TTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGAACTGCCGCTCTGGG CTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAATTCTGGCGCTCTGACCTCCGGCGTGCACAC CTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTG	297

	TCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACA CCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGAC GGTGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCCCAGGCTGT CGTGACCCAGGAACCCTCCCTGACAGTGTCTCCTGGCGG CACCGTGACCCTGACCTGTGGATCTTCTACCGGCGCTGT GACCACCTCCAACTACGCCAATTGGGTGCAGGAAAAGCC CGGCCAGGCCTTCAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACA AGAGAGCCCCTGGCACCCCTGCCAGATTCTCCGGTTCTC TGCTGGGCGGCAAGGCTGCCCTGACTCTGTCTGGTGCTC AGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGGT ACTCCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGA CCGTGCTGTCCAGCGCTTCCACCAAGGGACCCAGTGTGT TCCCCCTGGCCCCCAGCTCCAAGTCTACATCCGGTGGCA CAGCTGCCCTGGGATGTCTCGTGAAGGACTACTTTCCTG AGCCTGTGACAGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACCA GCGGAGTGCACACATTCCCTGCAGTGCTGCAGAGCAGCG GCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCTTCCT CTAGCCTGGGAACACAGACATATATCTGTAATGTGAATC ATAAGCCCAGTAATACCAAAGTGGATAAGAAAGTGGAA CCTAAGAGCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCCCCCTGC CCTGCTCCTGAAGCTGCTGGTGGCCCTAGCGTGTTCCTGT TCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGA CCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCG TGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAA CAGTACAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACA GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAA GTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGGCGCTCCCATCGA AAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAAC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
9C7[EE]_ Fc-phần lõm_PGL ALA pETR14975	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAA CCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCCGGA TACACCTTCACTTCCTATTACATGCACTGGGTTCGTCAAG CCCCGGGCCAGGGTCTGGAATGGATGGGCATCATTAACC CAAGCGGTGGCTCTACCTCCTACGCGCAGAAATTCCAGG GTCGCGTCACGATGACCCGTGACACTAGCACCTCTACCG TTTATATGGAGCTGTCCAGCCTGCGTTCTGAAGATACTG CAGTGTACTACTGTGCACGCGGTGACTGGTCTTACTACA TGGACTATTGGGGTCAAGGCACCCTCGTAACGGTTTCTT CTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACC	298

	GTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGC CTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTG CGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT GCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
9C7 LC [RK] pETR14980	GATATTGTTATGACTCAATCTCCACTGTCTCTGCCGGTGA CTCCAGGCGAACCGGCGAGCATTTCTTGCCGTTCCAGCC AGTCTCTGCTGCACTCCAACGGCTACAACTATCTCGATT GGTACCTGCAAAAACCGGGTCAGAGCCCTCAGCTGCTGA TCTACCTGGGCTCTAACCGCGCTTCCGGTGTACCGGACC GTTTCAGCGGCTCTGGATCCGGCACCGATTTCACGTTGA AAATCAGCCGTGTTGAAGCAGAAGACGTGGGCGTTTATT ACTGTATGCAGGCACGGCAGACCCCAACTTTTGGTCAAG GCACCAAGGTCGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCAT CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATCGGAAGTTGAAATC TGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCA GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	299

Mặc dù sáng chế nêu trên được mô tả khá chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ, nhằm mục đích hiểu rõ hơn, tuy nhiên phần mô tả và các ví dụ này không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Toàn bộ các patent và tài liệu khoa học được trích dẫn ở đây được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

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

(i) gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3, và bao gồm ít nhất một trình tự axit amin của vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 và SEQ ID NO: 39 và ít nhất một CDR của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34;

(ii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể folat 1 (FolR1);

trong đó gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm:

a) CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 16, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 17, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:18, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34;

b) CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 56, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:57, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 59, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 60, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:65; hoặc

c) CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 16, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 275, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO:315, CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 32, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 33, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:34.

2. Phân tử gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T theo điểm 1, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

3. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 1 hoặc 2, còn bao gồm (iii) gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1.

4. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 3, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ ba giống hệt với gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai.

5. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 3 hoặc 4, trong đó ít nhất một trong gốc gắn kết kháng nguyên thứ hai và thứ ba là phân tử Fab.

6. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, còn bao gồm (iv) miền Fc gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng kết hợp ổn định.

7. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

8. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 64.

9. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với FolR1 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 274 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

10. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 8, trong đó gốc gắn kết kháng nguyên thứ nhất là phân tử Fab lai chéo trong đó vùng biến đổi hoặc vùng hằng định của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được hoán vị.

11. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10, trong đó miền Fc là globulin miễn dịch lớp IgG, đặc biệt là miền Fc IgGl hoặc IgG4.

12. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 11, trong đó miền Fc là miền Fc người.

13. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 12, trong đó miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc.

14. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 13, trong đó trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra phần lồi bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất mà được bố trí trong hốc bên trong miền

CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra hốc bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai mà phần lồi bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất được bố trí trong đó.

15. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 14, trong đó miền Fc bao gồm ít nhất một biến thể thay thế axit amin làm giảm mức độ gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động, so với miền Fc IgG_1 tự nhiên.

16. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 15, trong đó mỗi cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bao gồm ba biến thể thay thế axit amin làm giảm mức độ gắn kết với thụ thể Fc hoạt hóa và/hoặc chức năng tác động trong đó biến thể thay thế axit amin nêu trên là L234A, L235A và P329G (đánh số theo Kabat).

17. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:276 và còn bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:277 và của SEQ ID NO:35.

18. Polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17.

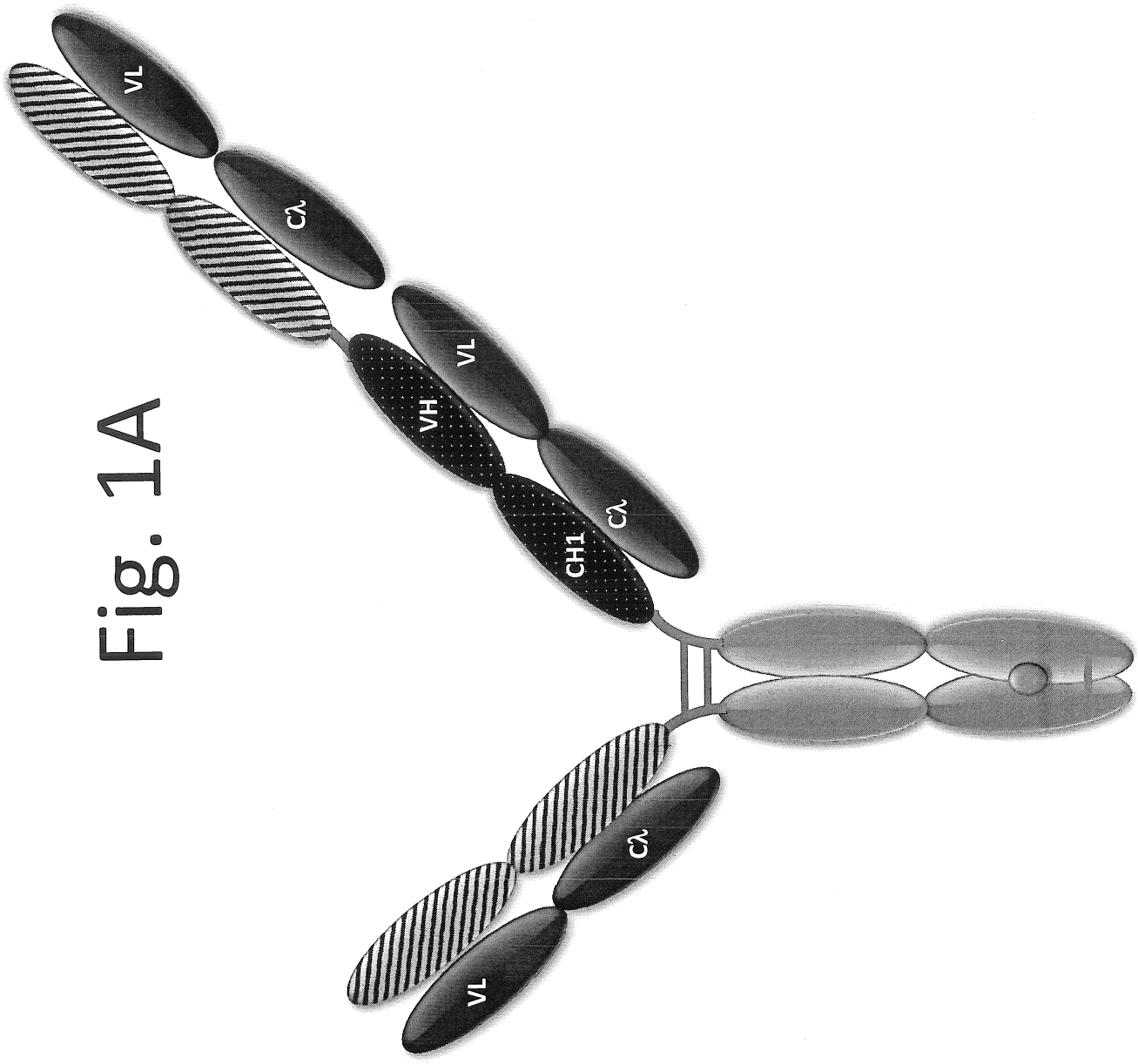
19. Vectơ, cụ thể là vectơ biểu hiện, bao gồm polynucleotit theo điểm 18.

20. Tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit theo điểm 18 hoặc vectơ theo điểm 19.

21. Phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD3 và kháng nguyên tế bào đích, bao gồm các bước a) nuôi cấy tế bào vật chủ theo điểm 20 trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và b) thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T.

22. Dược phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17 và chất mang dược dụng.

Fig. 1A



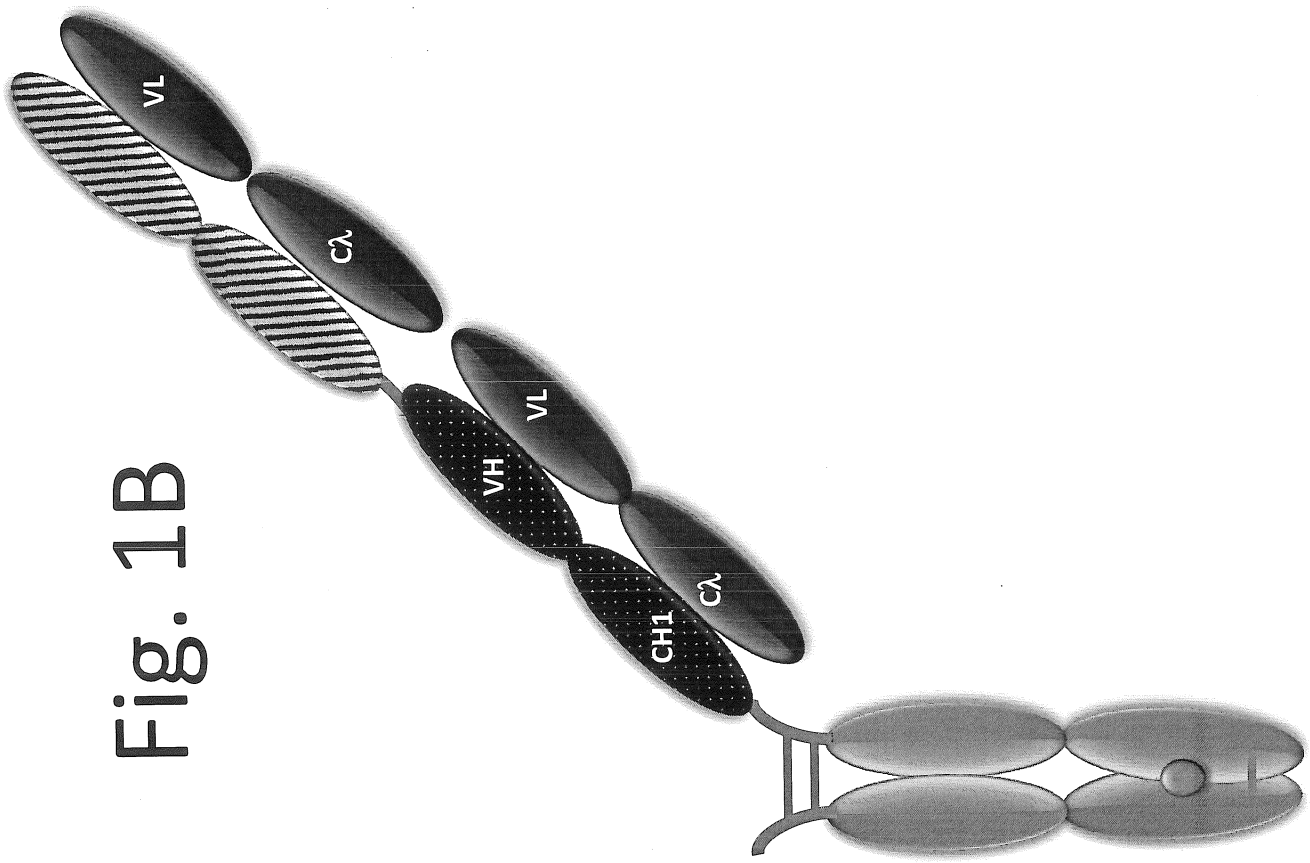
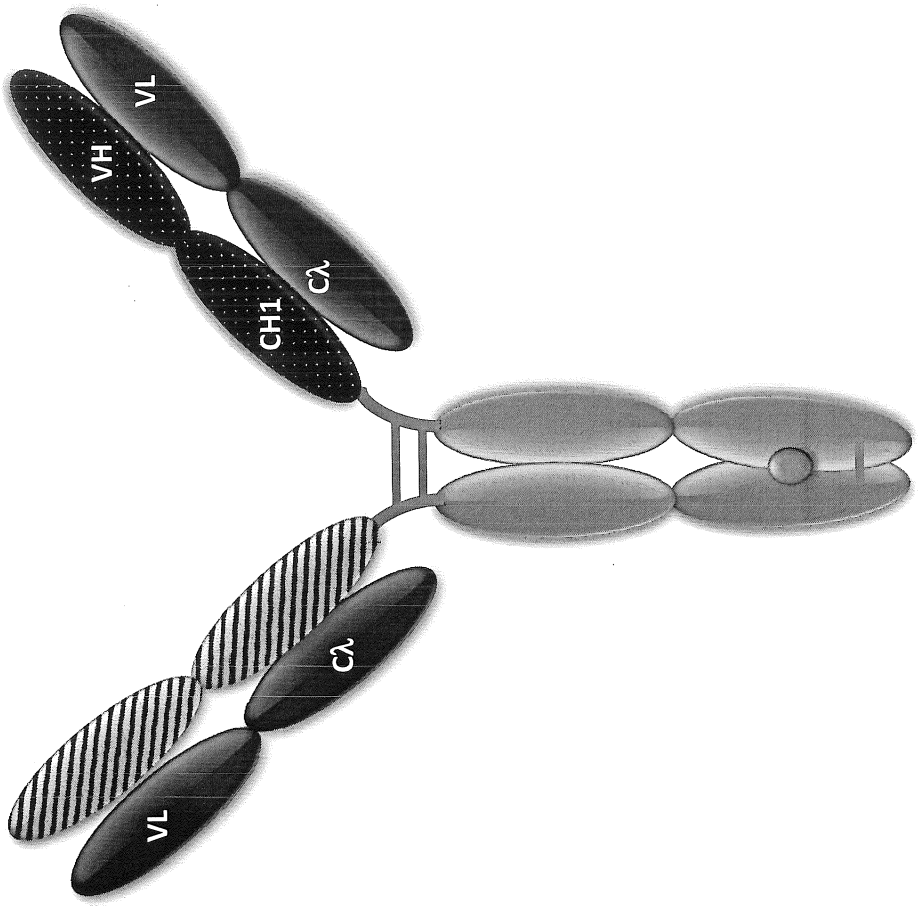


Fig. 1B

Fig. 1C



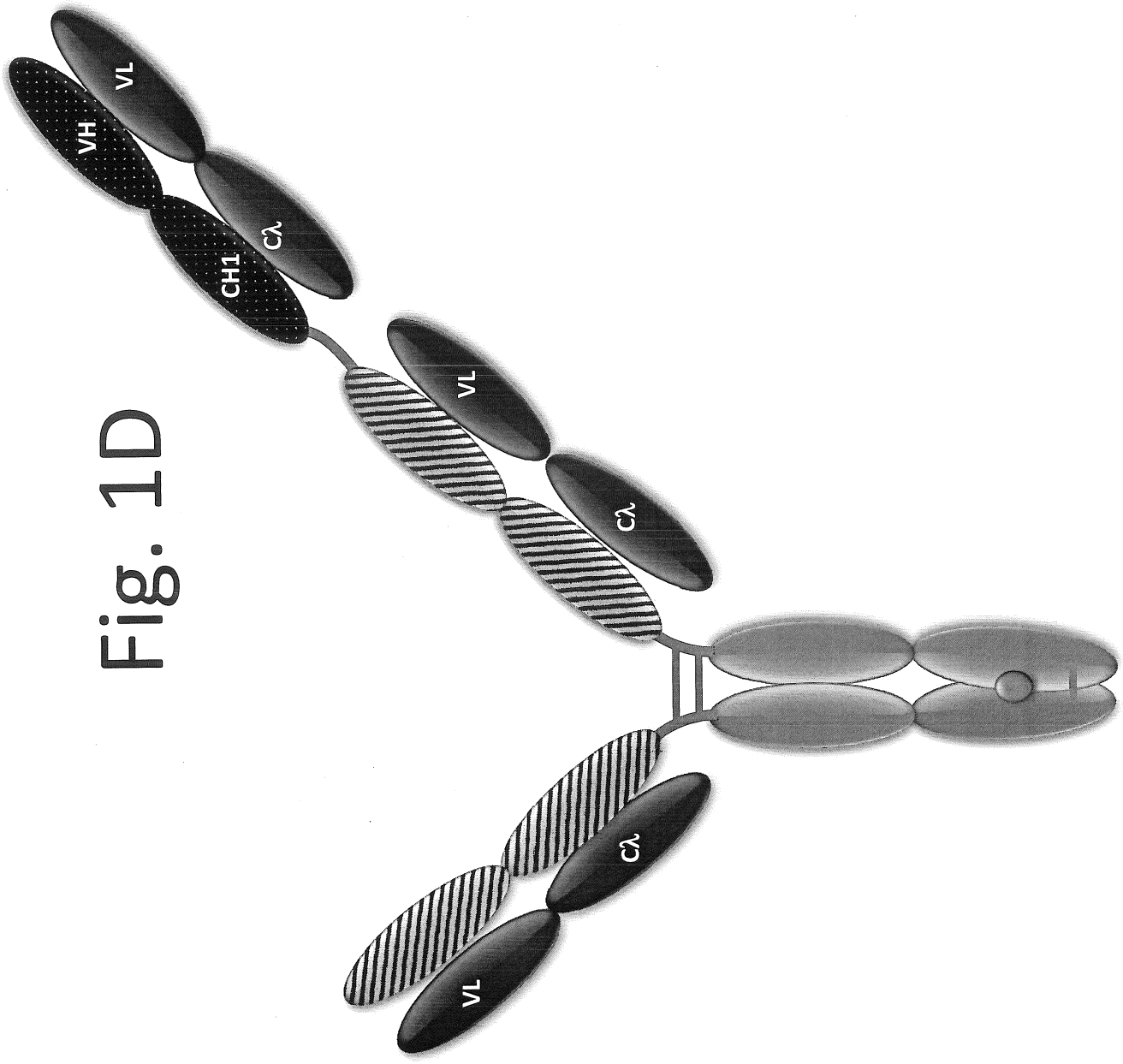


Fig. 1D

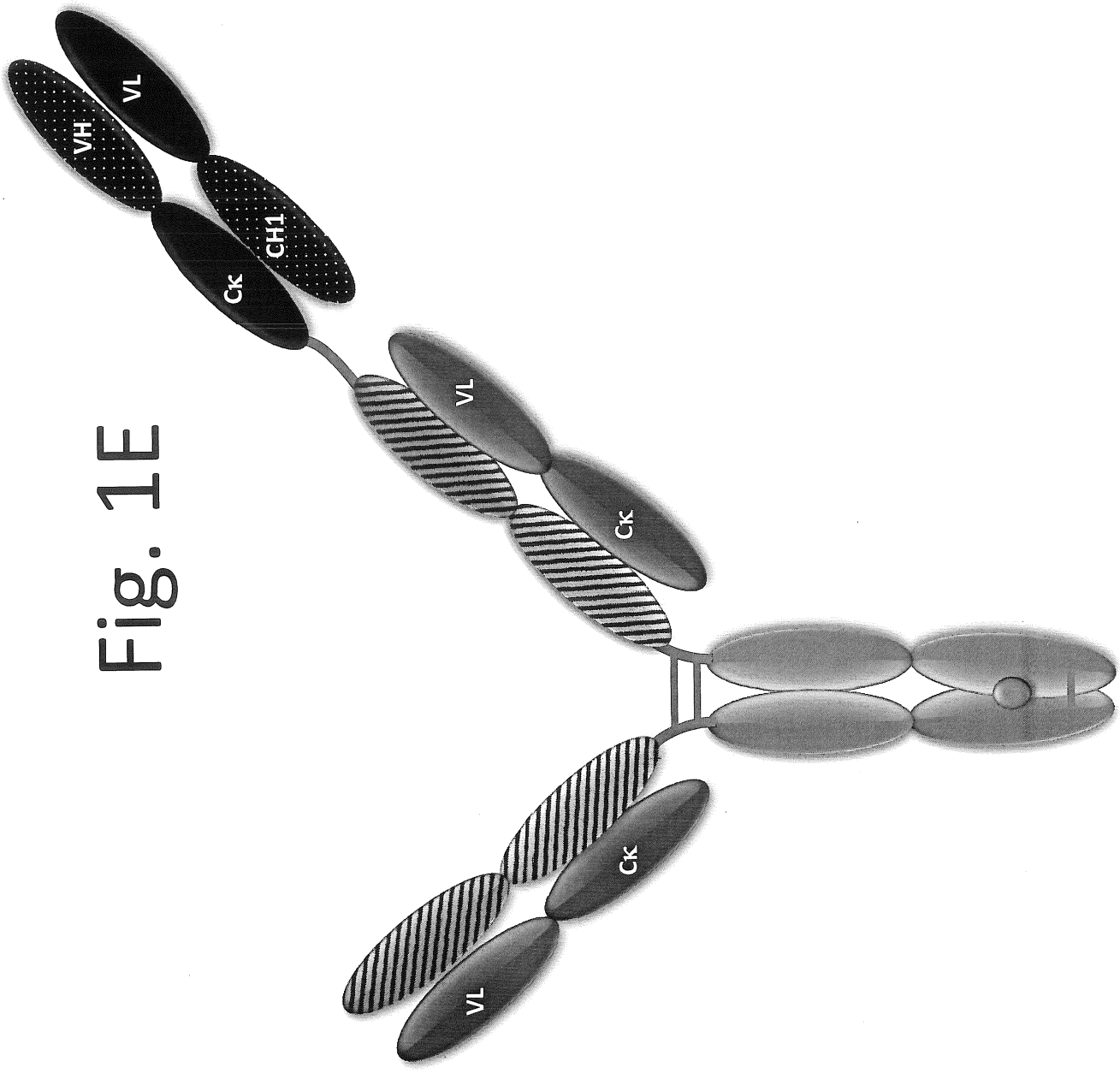


Fig. 1E

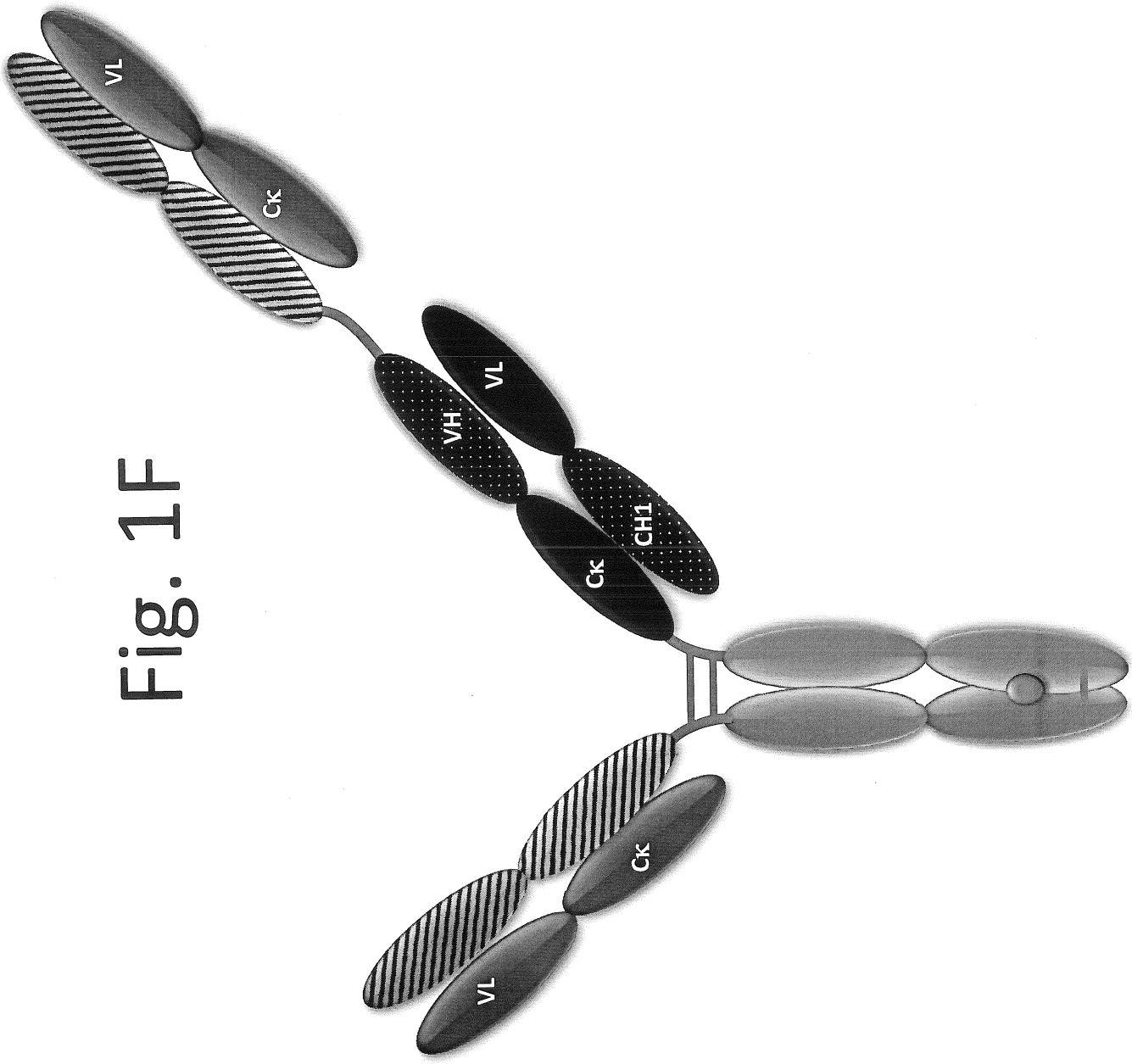


Fig. 1F

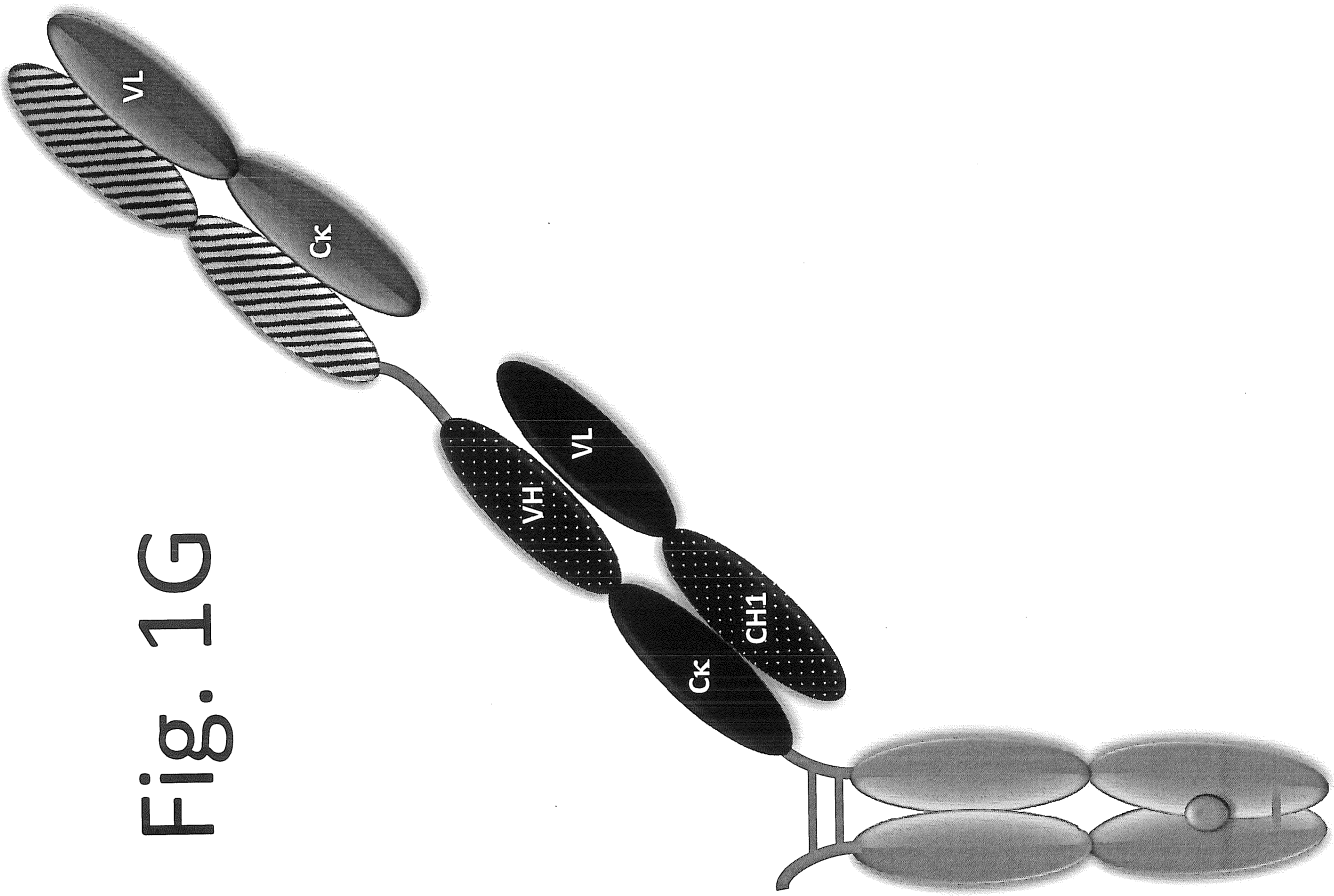


Fig. 1G

Fig. 1H

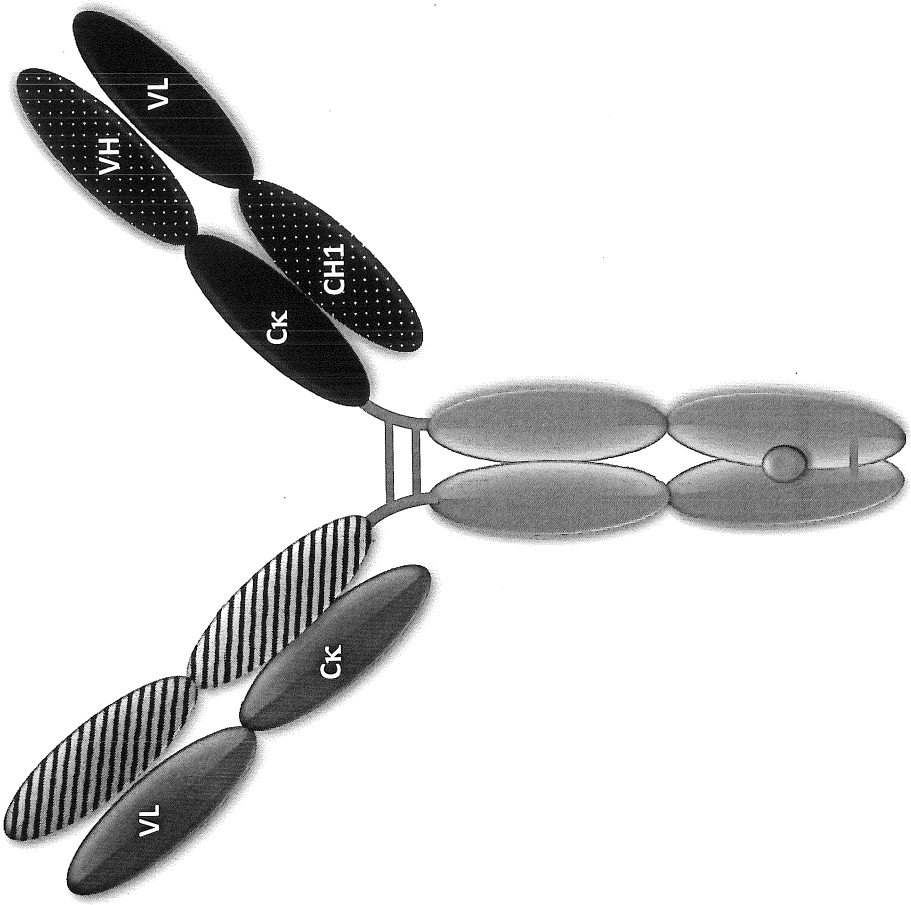


Fig. 1l

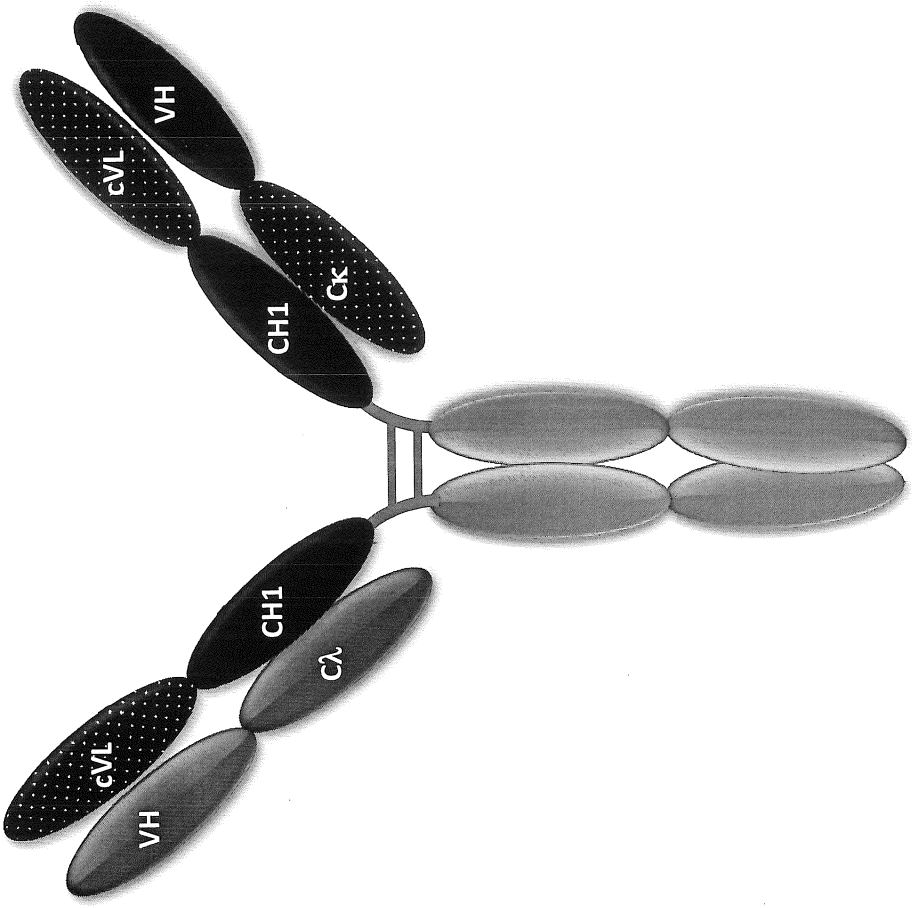


Fig. 2A

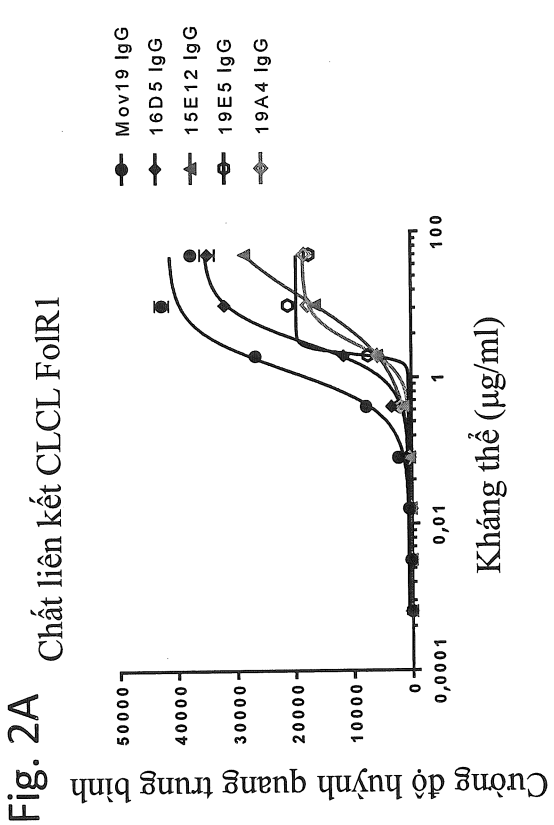


Fig. 2B

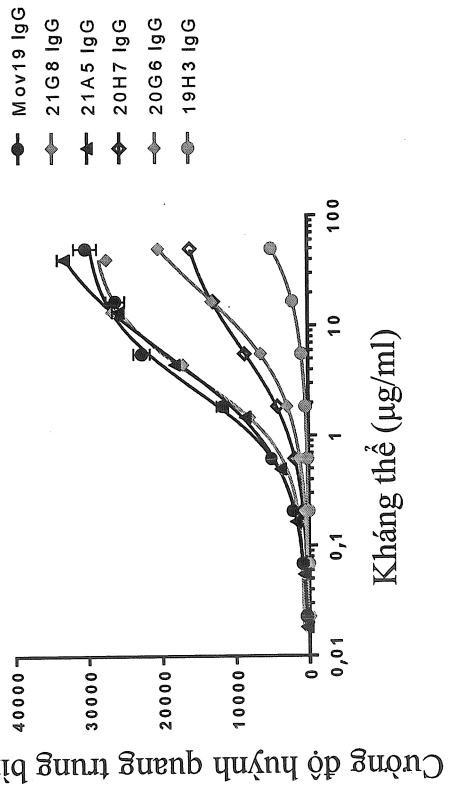
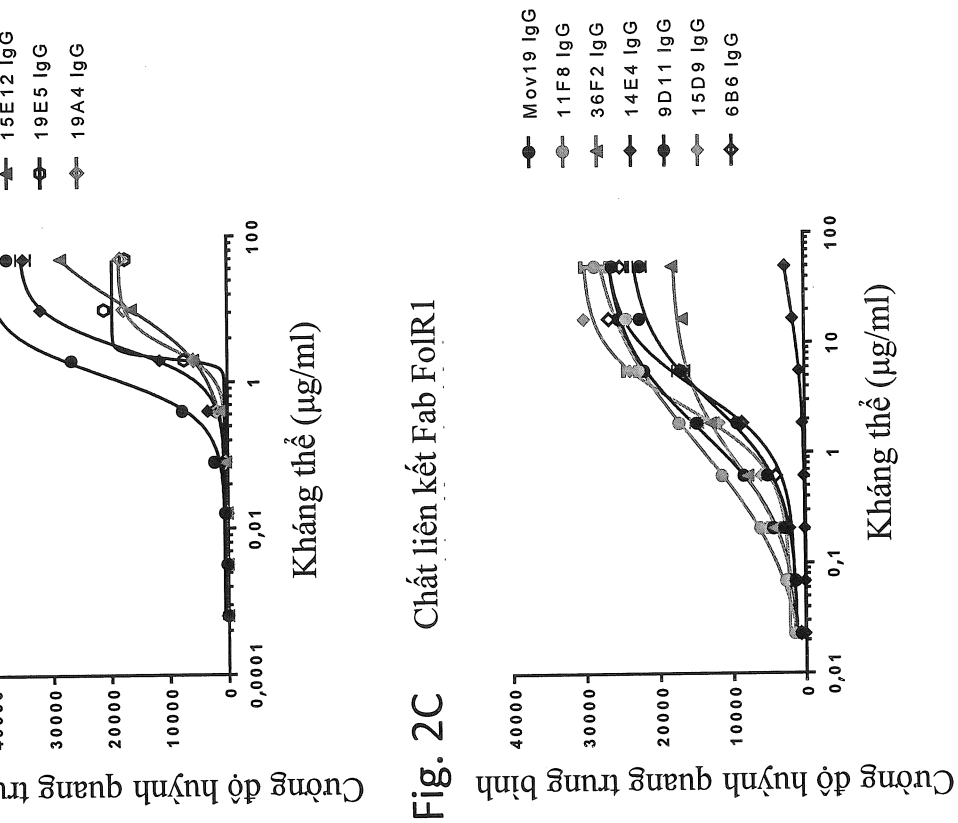


Fig. 2C



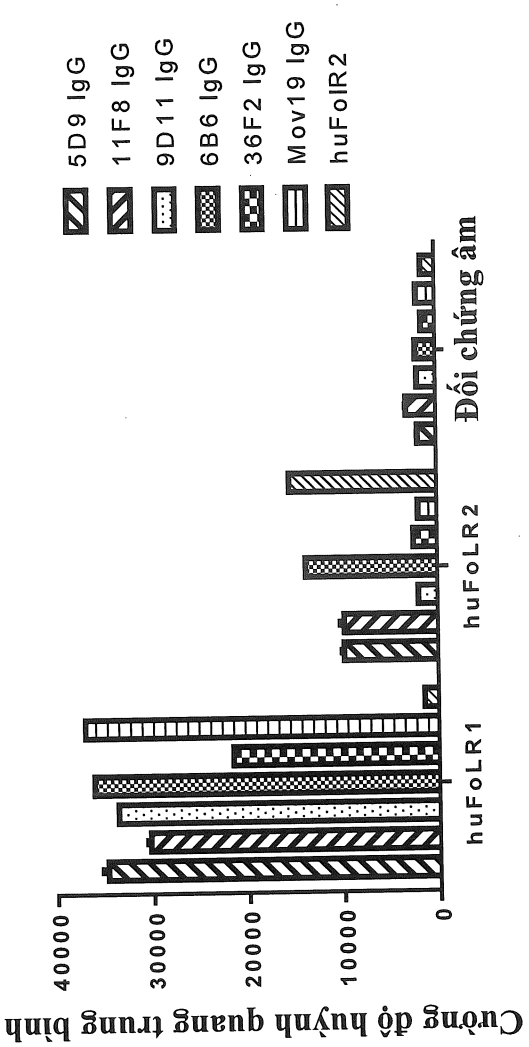

5D9 IgG
11F8 IgG
9D11 IgG
6B6 IgG
36F2 IgG
Mov19 IgG
huFolR2
40000
30000
20000
10000
0
huFoLR1
huFoLR2
Đối chứng âm
Cường độ huỳnh quang trung bình

Fig. 3A

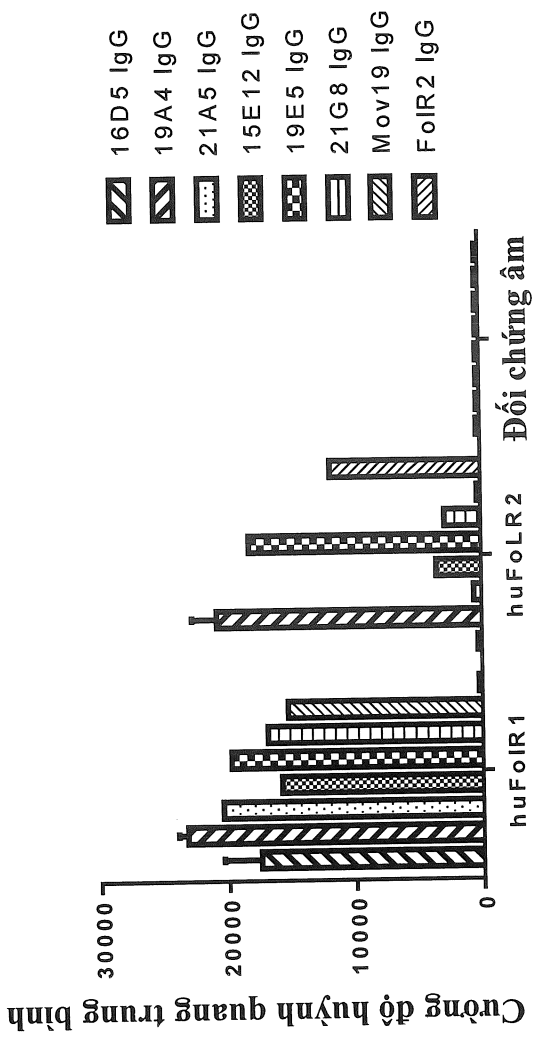

16D5 IgG
19A4 IgG
21A5 IgG
15E12 IgG
19E5 IgG
21G8 IgG
Mov19 IgG
FolR2 IgG
30000
20000
10000
0
huFolR1
huFoLR2
Đối chứng âm
Cường độ huỳnh quang trung bình

Fig. 3B

Fig. 4A

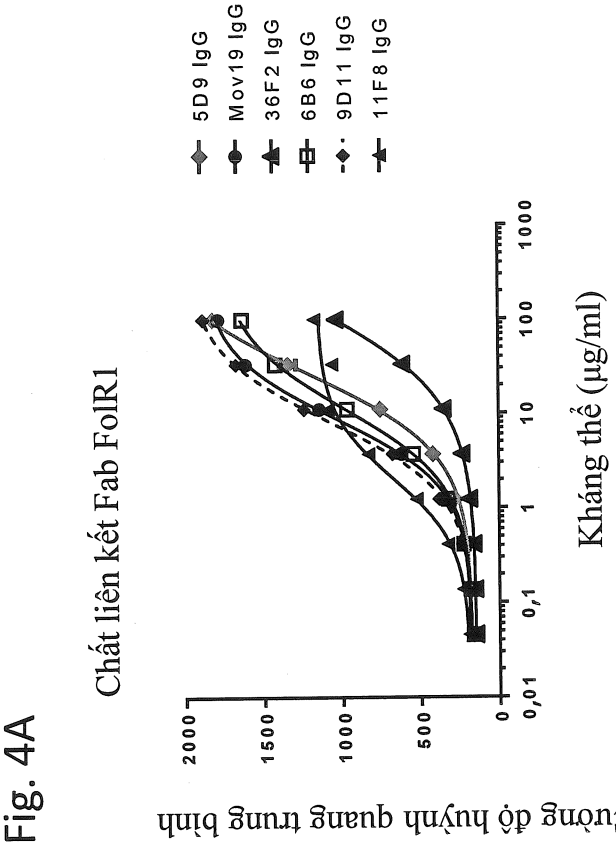

Chất liên kết Fab FolR1
Cường độ huỳnh quang trung bình
Kháng thể (µg/ml)
5D9 IgG
Mov19 IgG
36F2 IgG
6B6 IgG
9D11 IgG
11F8 IgG
2000
1500
1000
500
0
0,01
0,1
1
10
100
1000

Fig. 4B

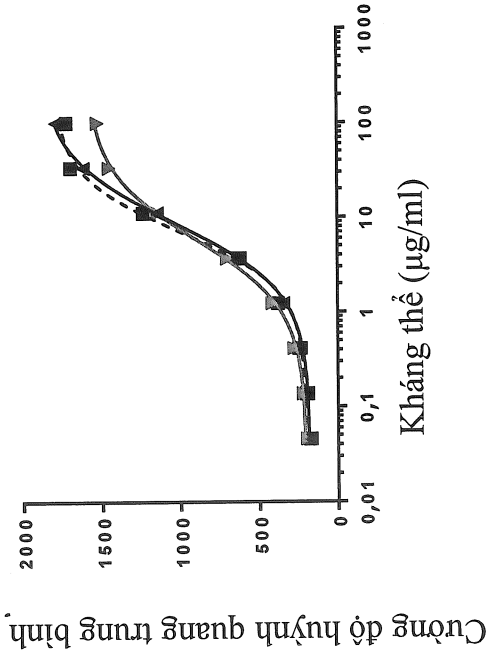

Chất liên kết CLCL FolR1
Cường độ huỳnh quang trung bình
Kháng thể (µg/ml)
16D5 IgG
21A5 IgG
Mov19 IgG
2000
1500
1000
500
0
0,01
0,1
1
10
100
1000

Fig. 5

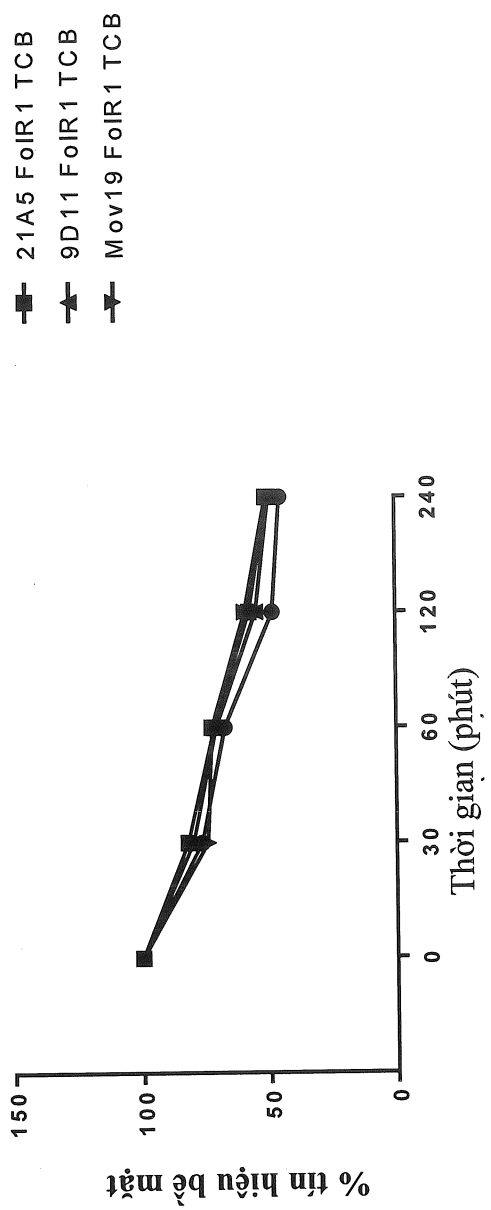

16D5 FolR1 TCB
21A5 FolR1 TCB
9D11 FolR1 TCB
Mov19 FolR1 TCB
% tín hiệu bề mặt
150
100
50
0
0
30
60
120
240
Thời gian (phút)

Fig. 6A

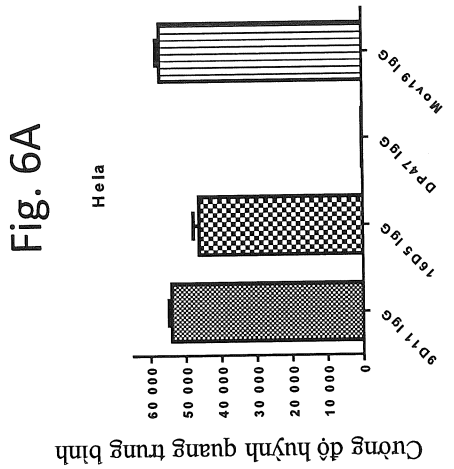


Fig. 6B

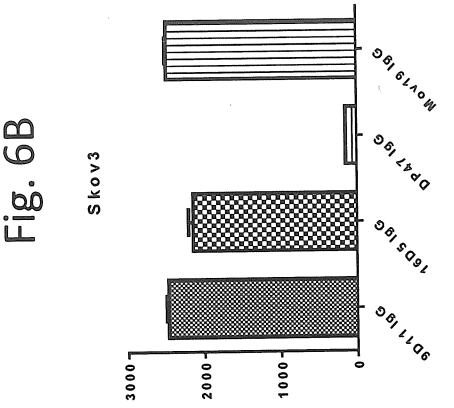


Fig. 6C

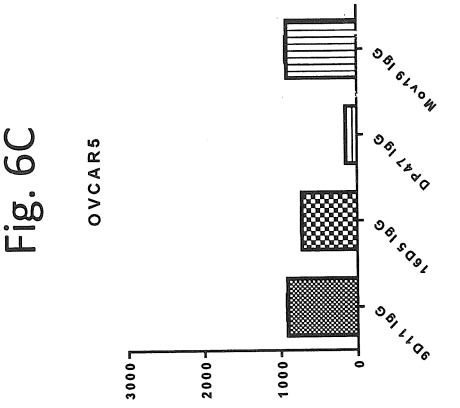


Fig. 6D

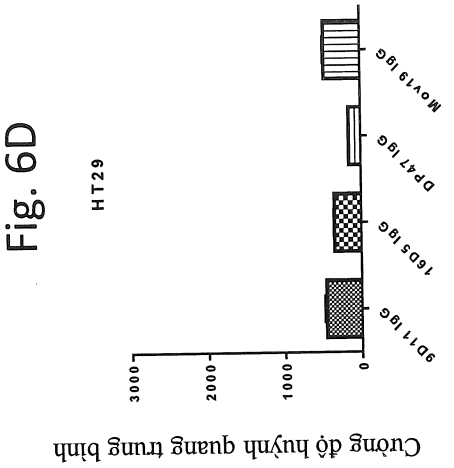
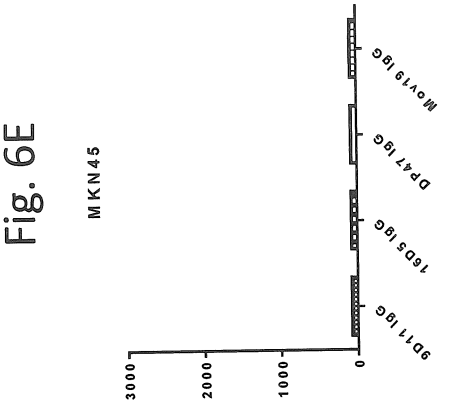


Fig. 6E



HT29

Fig. 7A

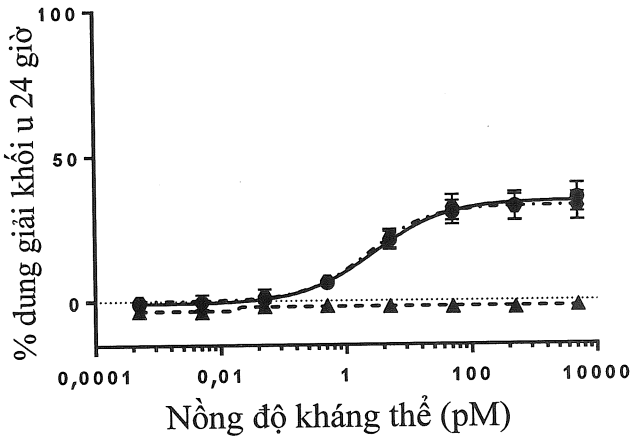
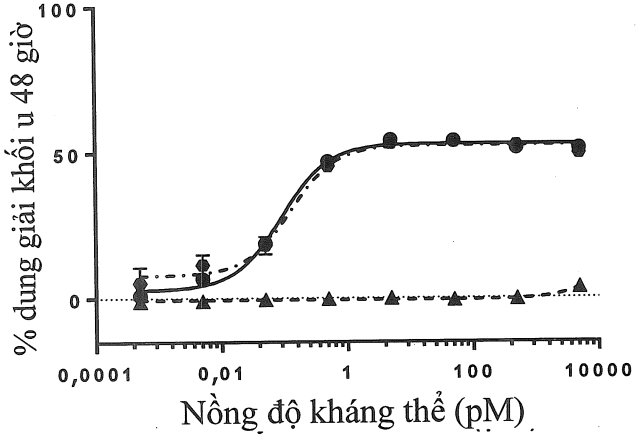


Fig. 7B



SKOV3

Fig. 7C

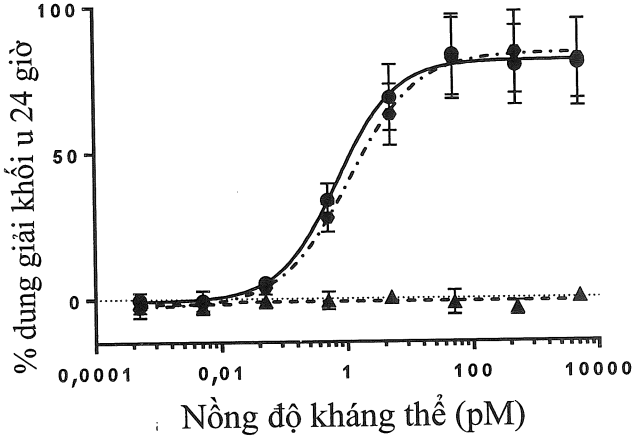
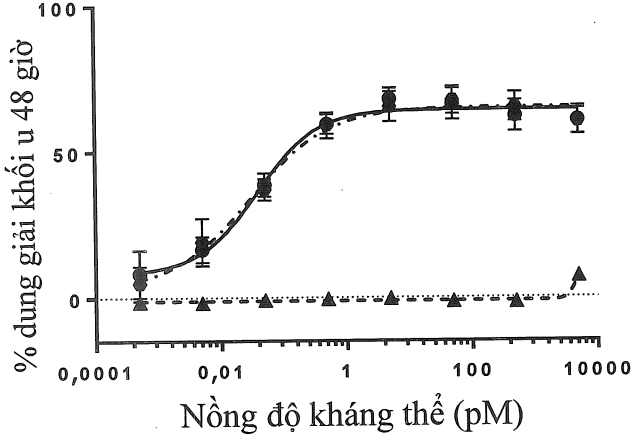
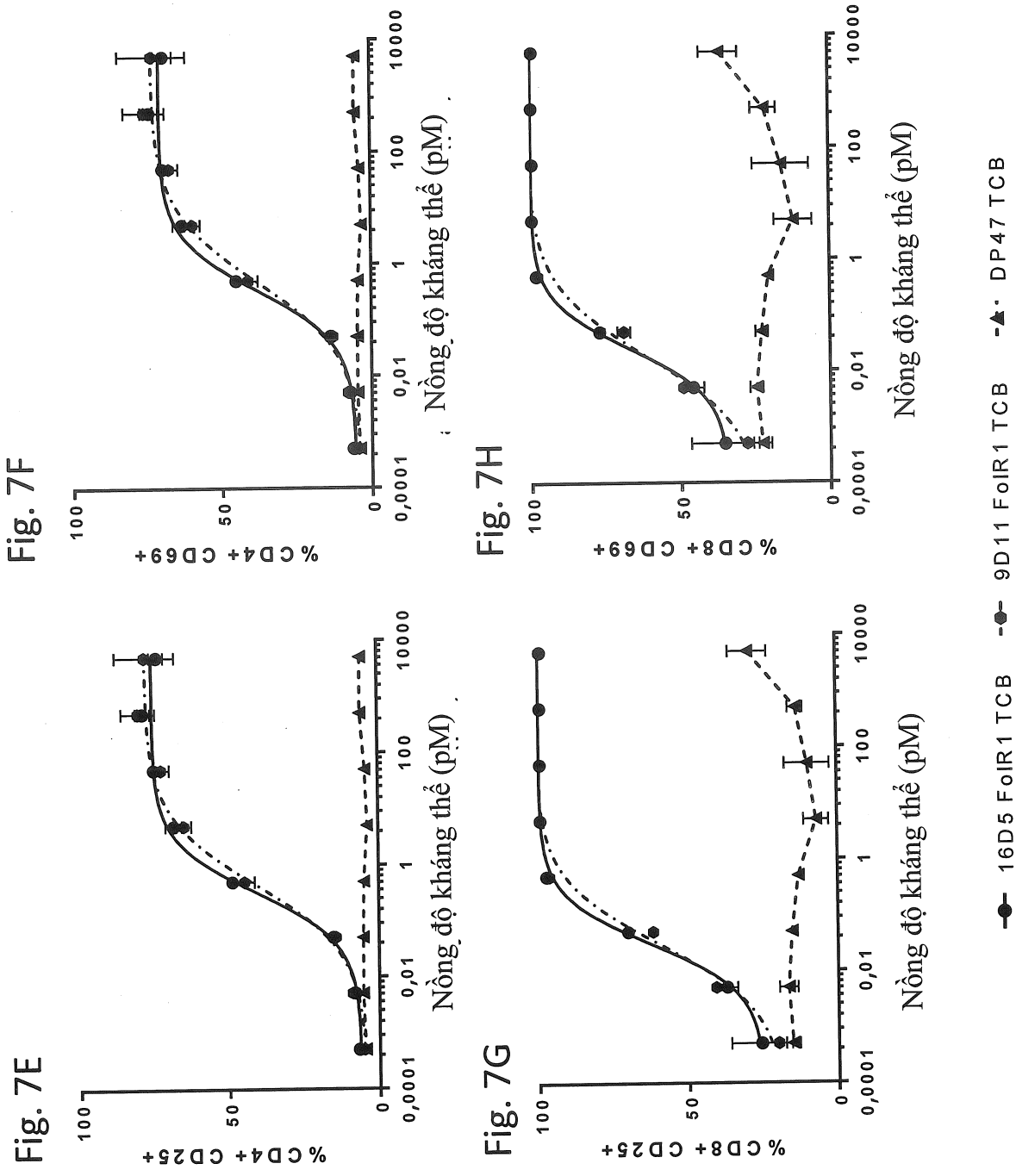


Fig. 7D



16D5 FolR1 TCB 9D11 FolR1 TCB DP47 TCB


Fig. 7E
% CD4+ CD25+
100
50
0
0,0001
0,01
1
100
10000
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 7F
% CD4+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 7G
% CD8+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 7H
% CD8+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
16D5 FolR1 TCB
9D11 FolR1 TCB
DP47 TCB

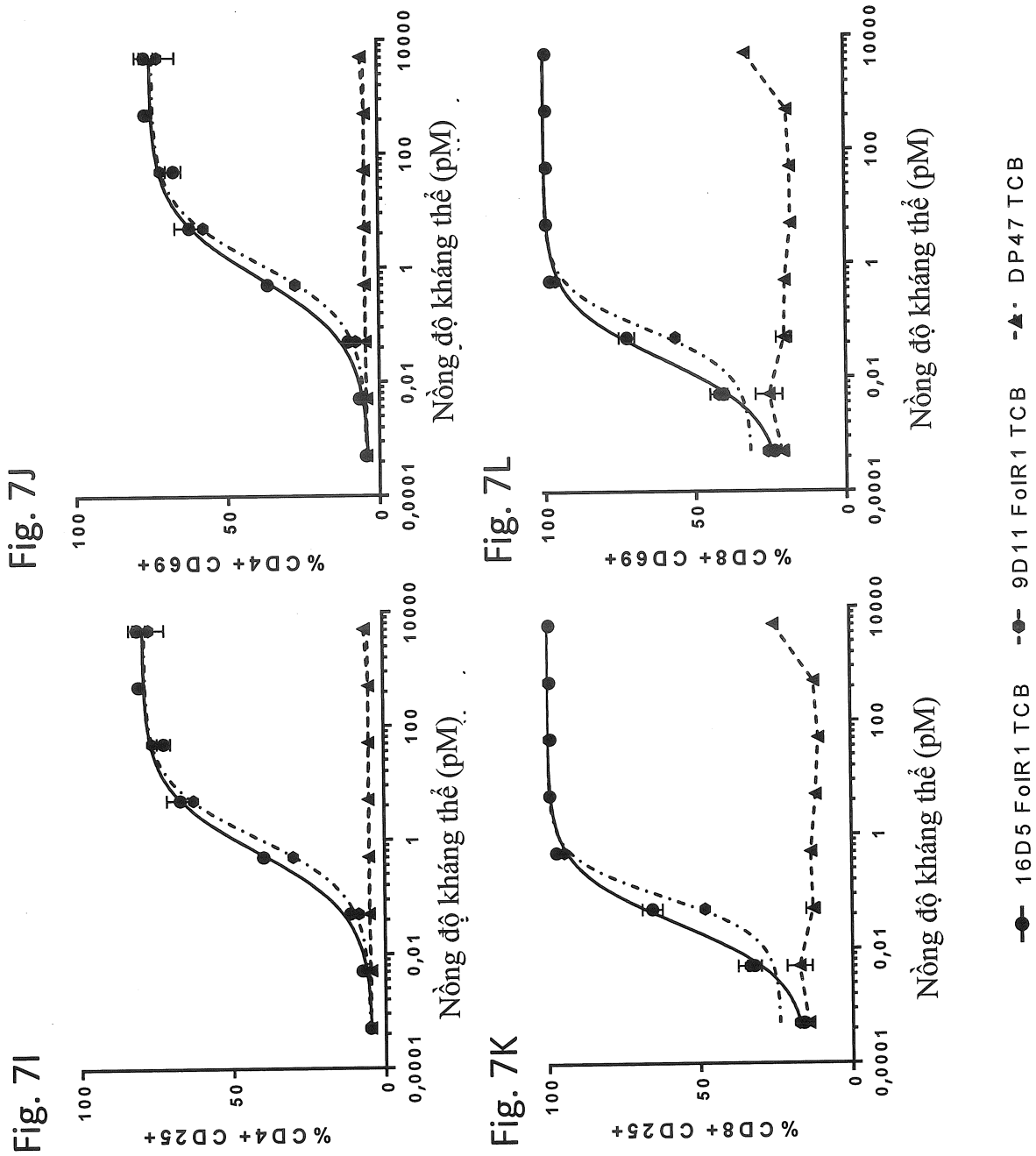
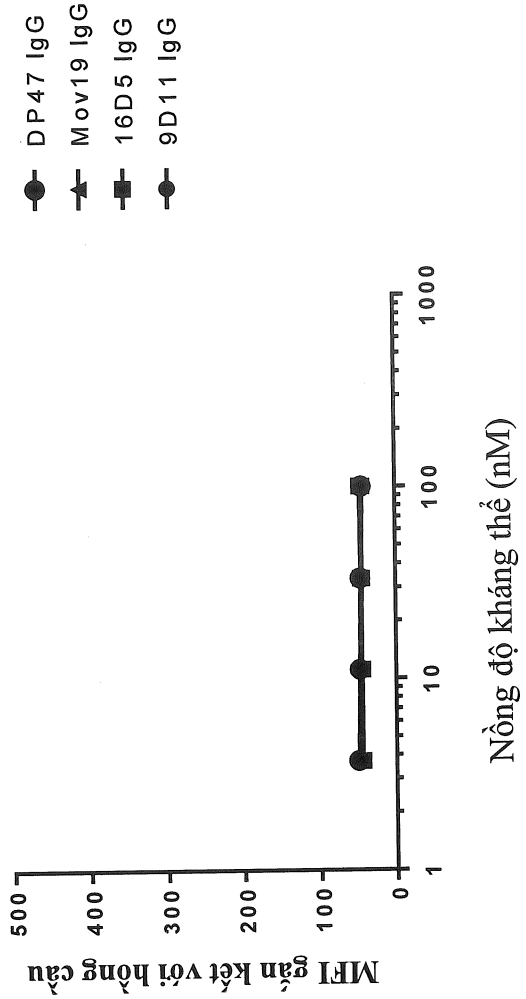

Fig. 7I
% CD4+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 7J
% CD4+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 7K
% CD8+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 7L
% CD8+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
16D5 FolR1 TCB
9D11 FolR1 TCB
DP47 TCB

Fig. 8


DP47 IgG
Mov19 IgG
16D5 IgG
9D11 IgG
MFI gắn kết với hỗng cầu
500
400
300
200
100
0
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể (nM)

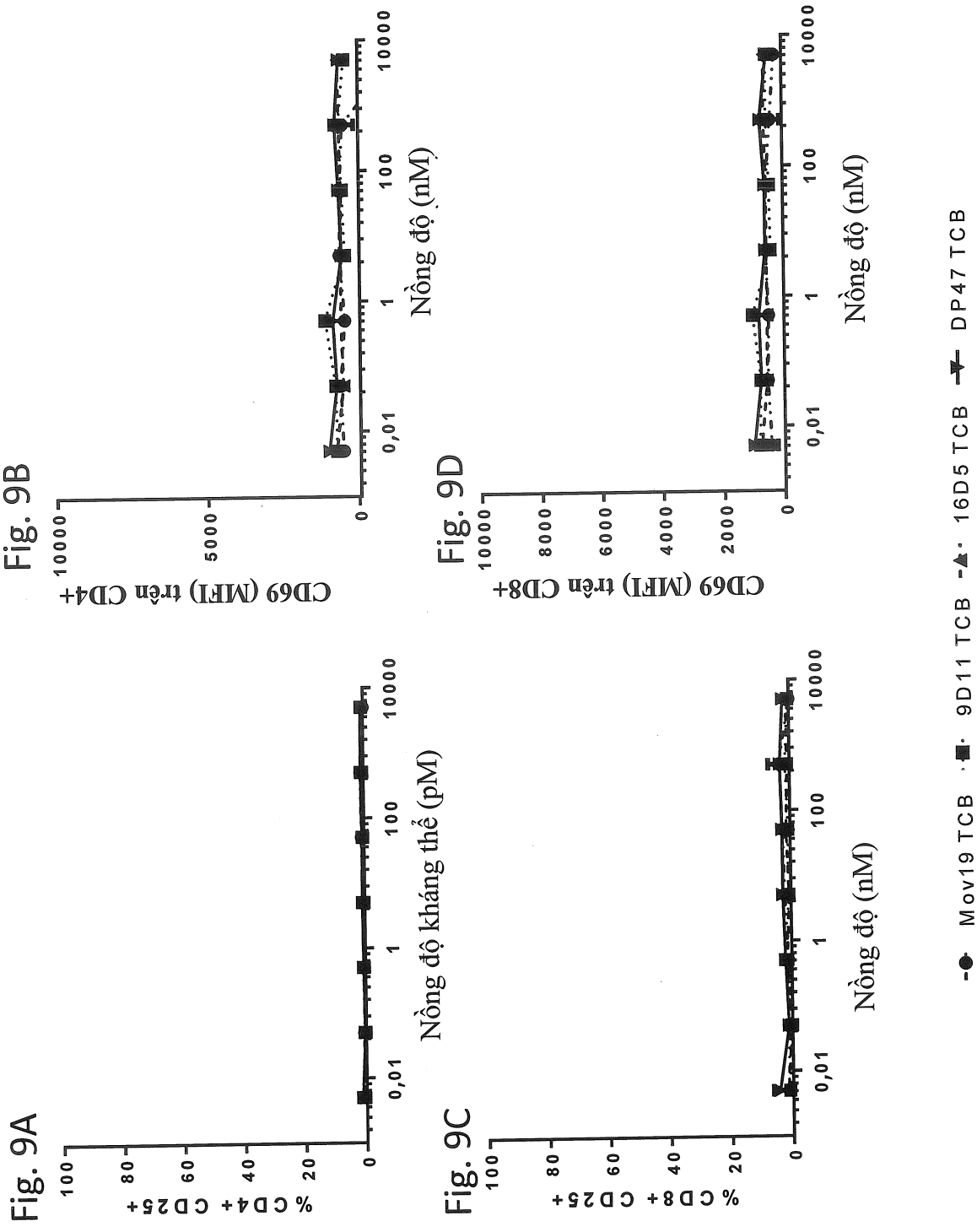
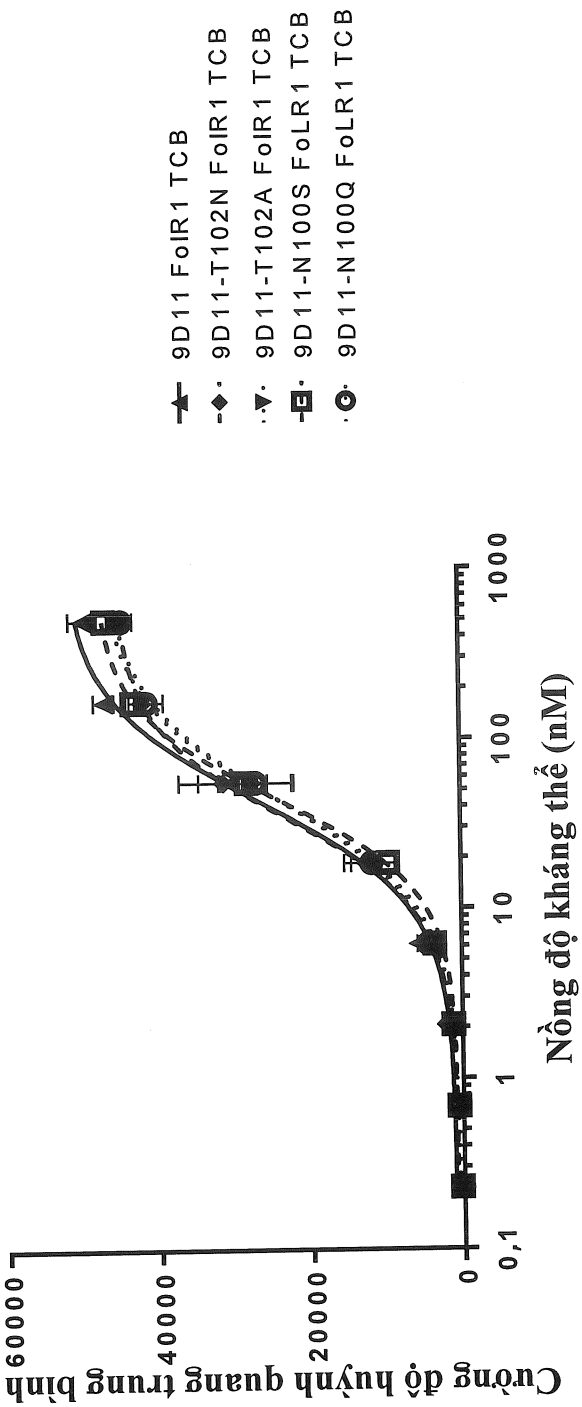
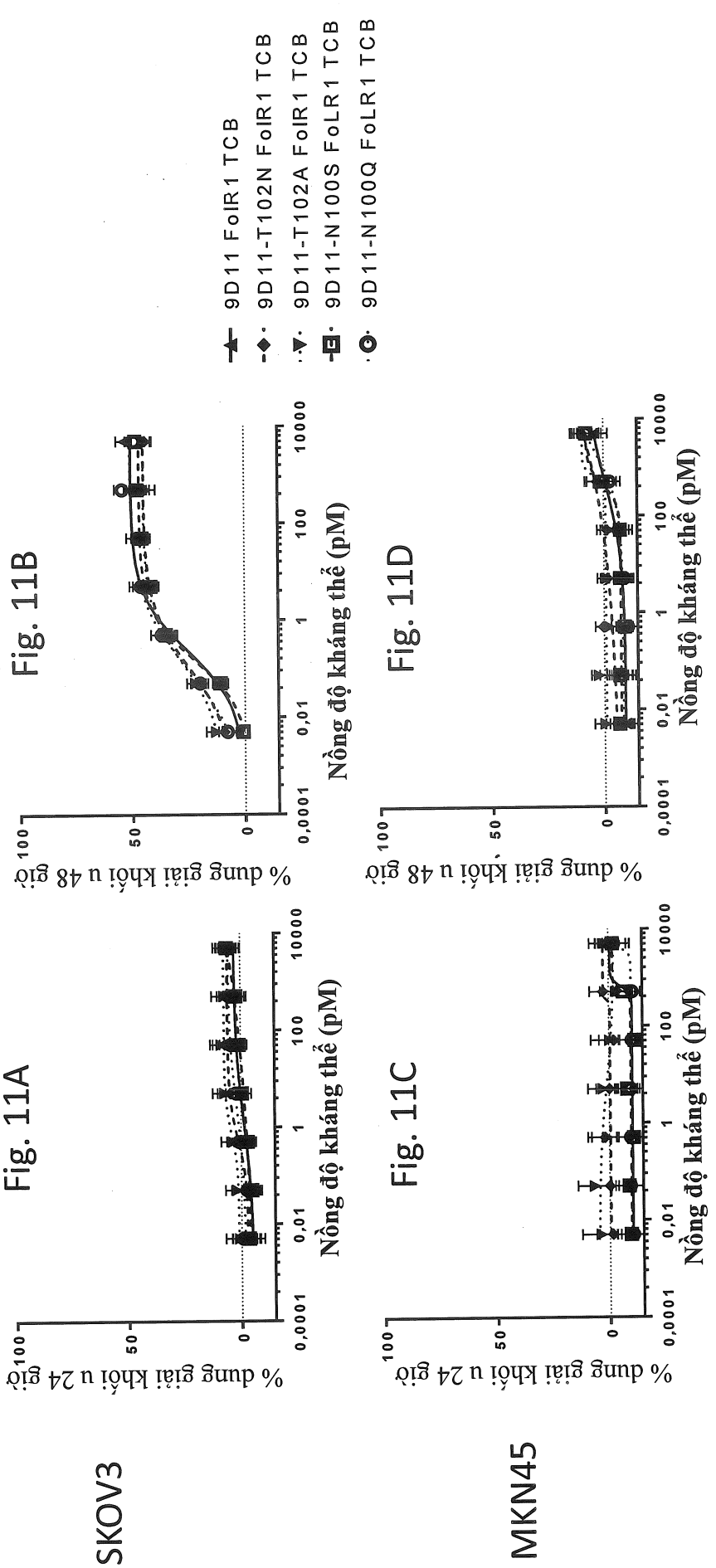

Fig. 9A
% CD4+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 9B
CD69 (MFI) trên CD4+
Nồng độ (nM)
Fig. 9C
% CD8+ CD25+
Nồng độ (nM)
Fig. 9D
CD69 (MFI) trên CD8+
Nồng độ (nM)
Mov19 TCB
9D11 TCB
16D5 TCB
DP47 TCB

Fig. 10


9D11 FolR1 TCB
9D11-T102N FolR1 TCB
9D11-T102A FolR1 TCB
9D11-N100S FoLR1 TCB
9D11-N100Q FoLR1 TCB
Cường độ huỳnh quang trung bình
60000
40000
20000
0
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể (nM)


SKOV3
MKN45
Fig. 11A
Fig. 11B
Fig. 11C
Fig. 11D
% dung giải khối u 24 giờ
% dung giải khối u 48 giờ
Nồng độ kháng thể (pM)
0,0001
0,01
1
100
10000
0
50
100
9D11 FolR1 TCB
9D11-T102N FolR1 TCB
9D11-T102A FolR1 TCB
9D11-N100S FoLR1 TCB
9D11-N100Q FoLR1 TCB

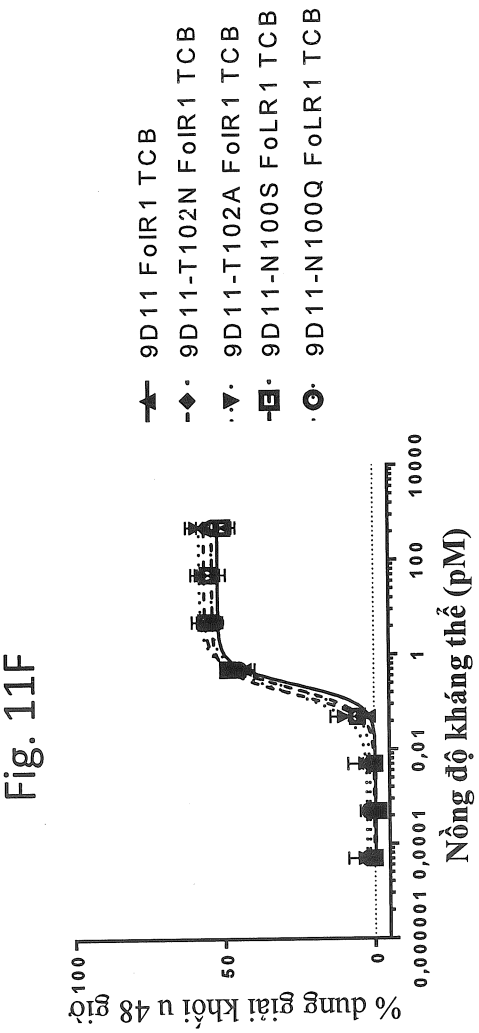


Fig. 11F

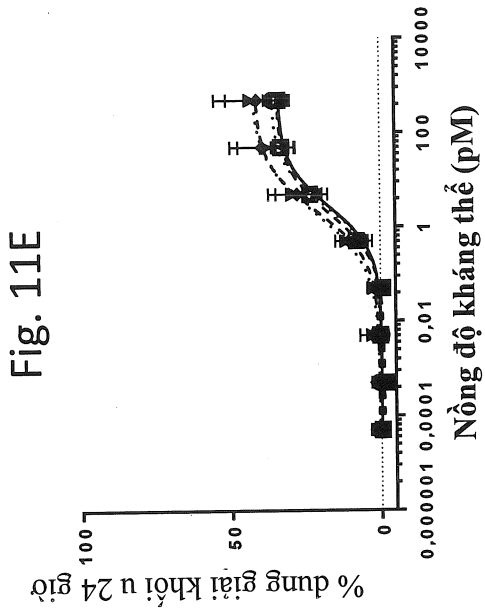
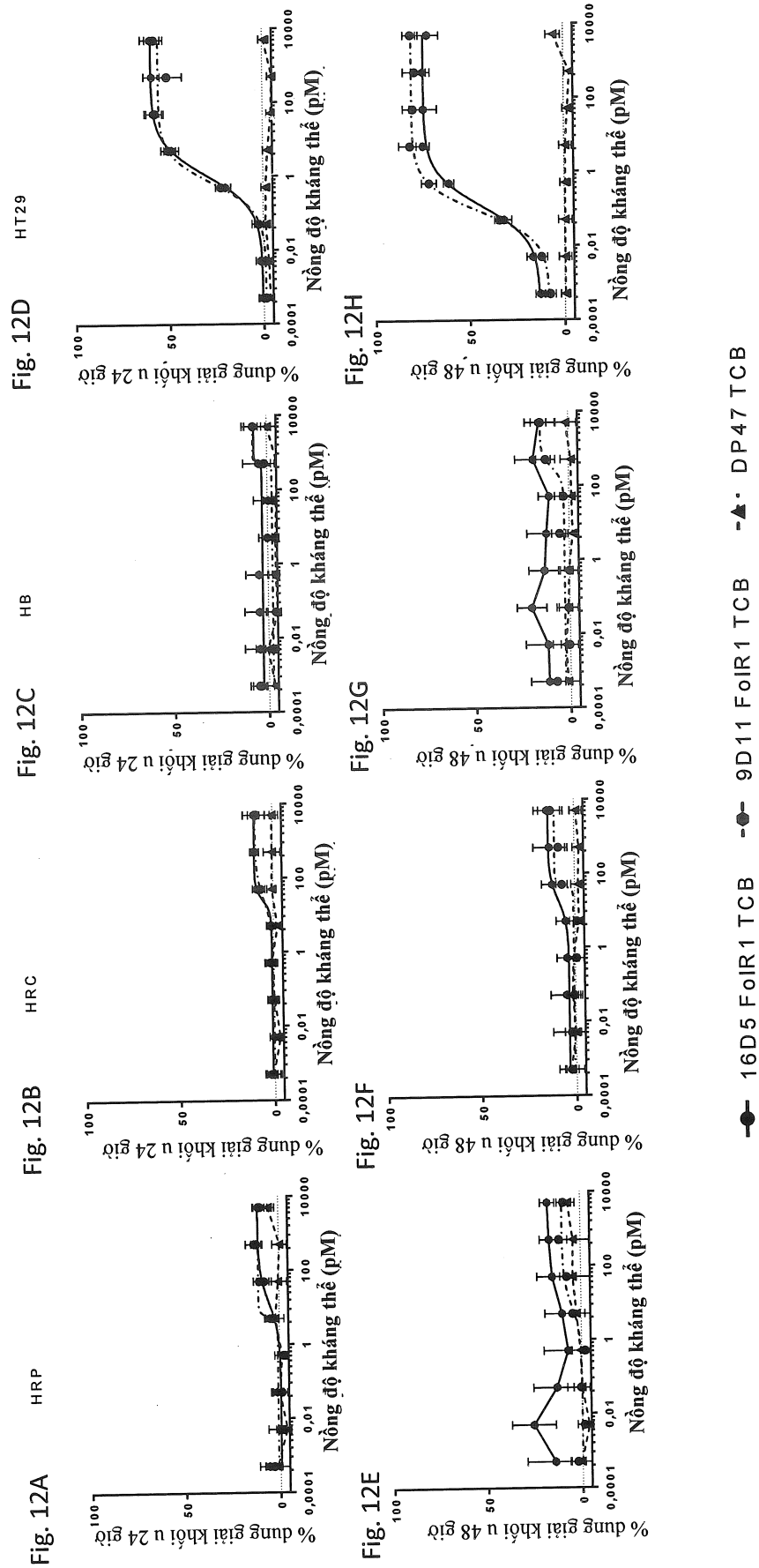
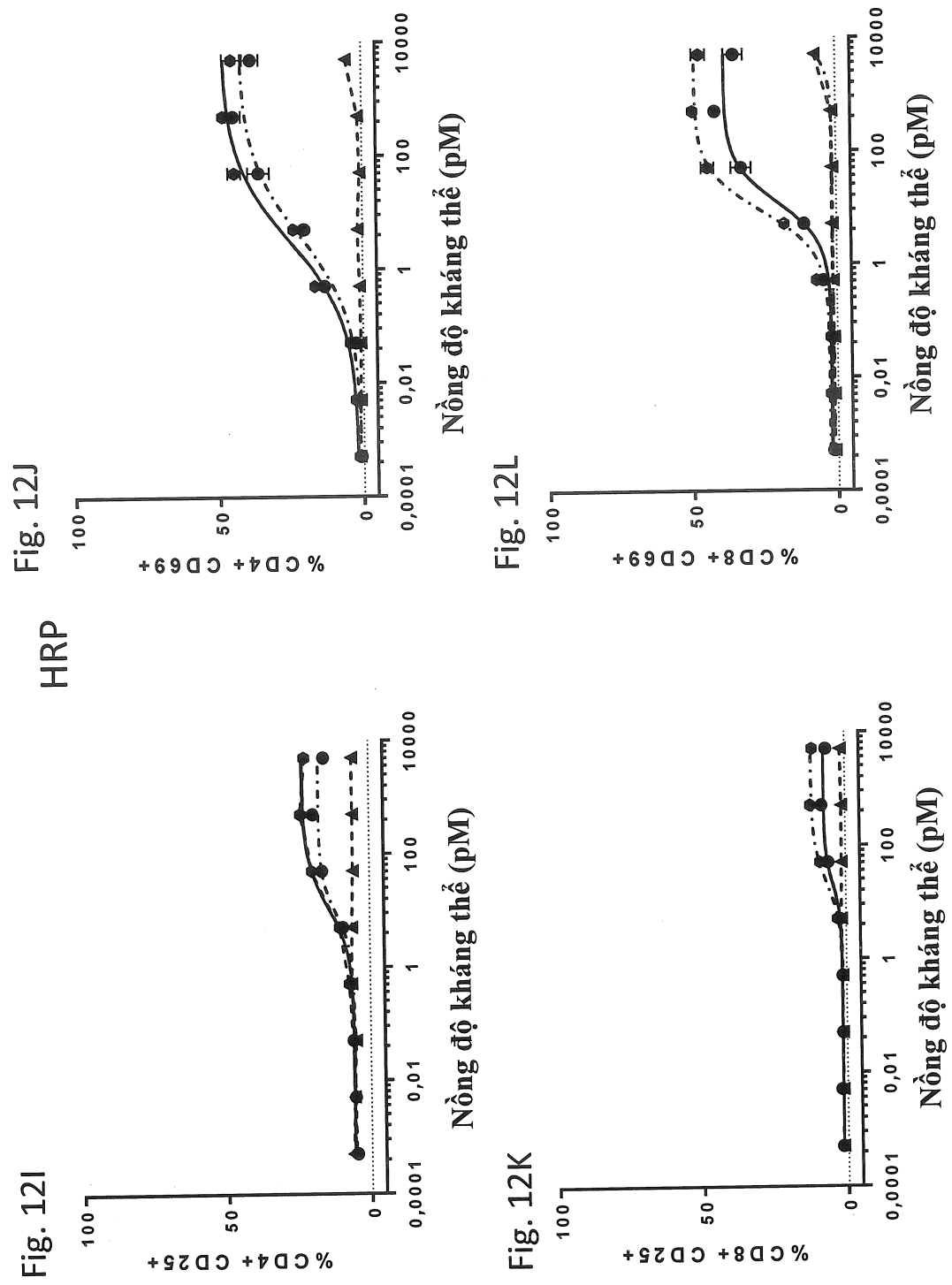


Fig. 11E

HT29


Fig. 12A
HRP
Fig. 12B
HRC
Fig. 12C
HB
Fig. 12D
HT29
Fig. 12E
Fig. 12F
Fig. 12G
Fig. 12H
% dung giải khối u 24 giờ
% dung giải khối u 48 giờ
Nồng độ kháng thể (pM)
16D5 FolR1 TCB
9D11 FolR1 TCB
DP47 TCB


HRP
Fig. 12J
% CD4+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 12L
% CD8+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 12I
% CD4+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 12K
% CD8+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
16D5 FolR1 TCB
9D11 FolR1 TCB
DP47 TCB

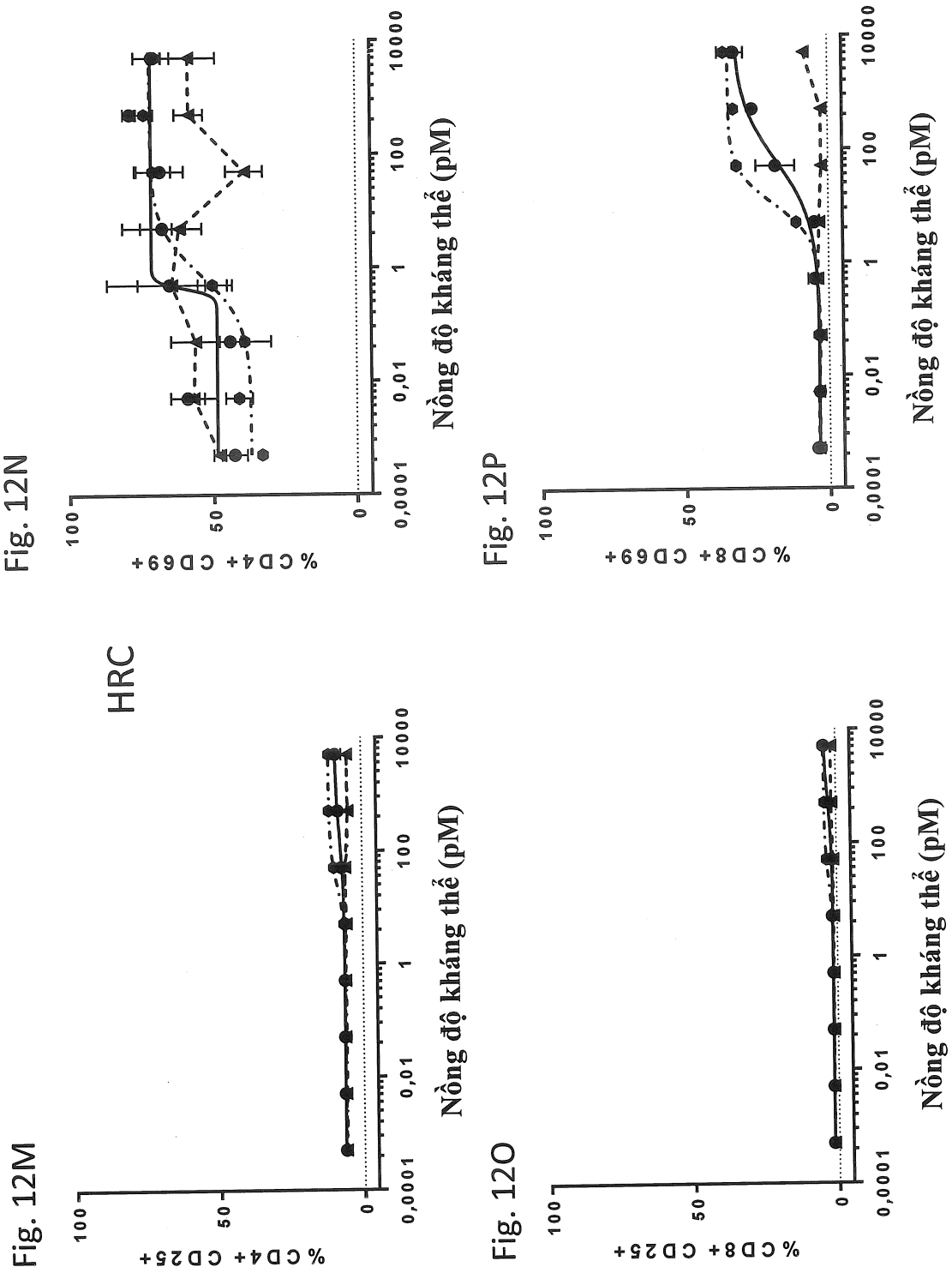
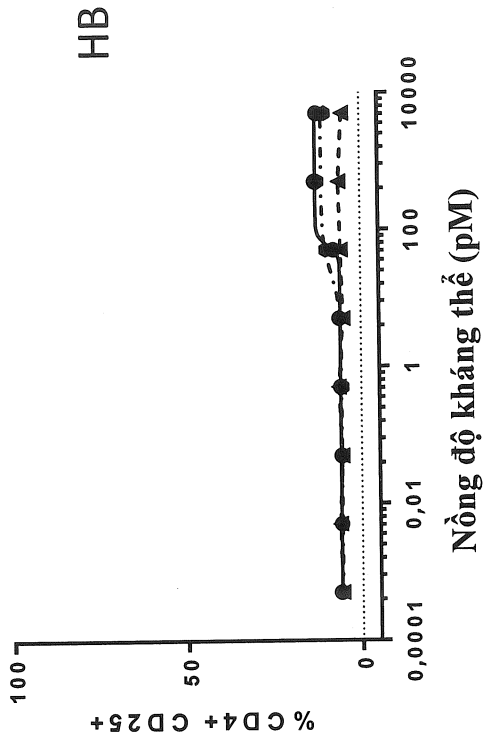

Fig. 12N
HRC
% CD4+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 12M
% CD4+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 12P
% CD8+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 12O
% CD8+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
16D5 FolR1 TCB
9D11 FolR1 TCB
DP47 TCB

Fig. 12Q



HB

Fig. 12R

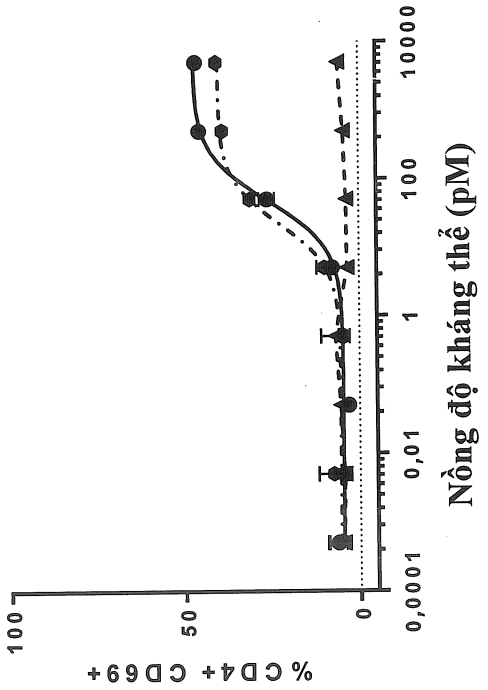


Fig. 12S

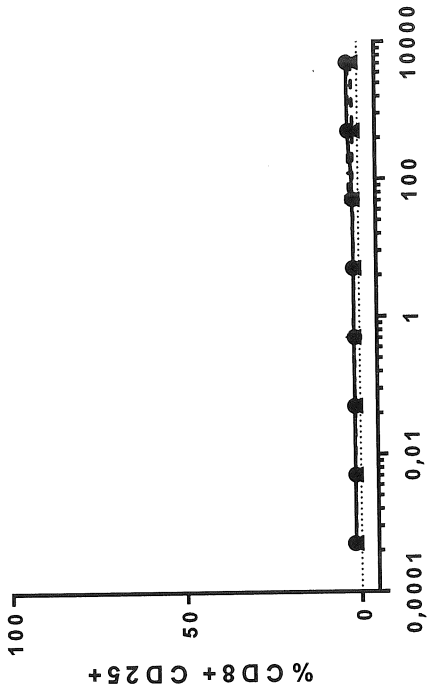
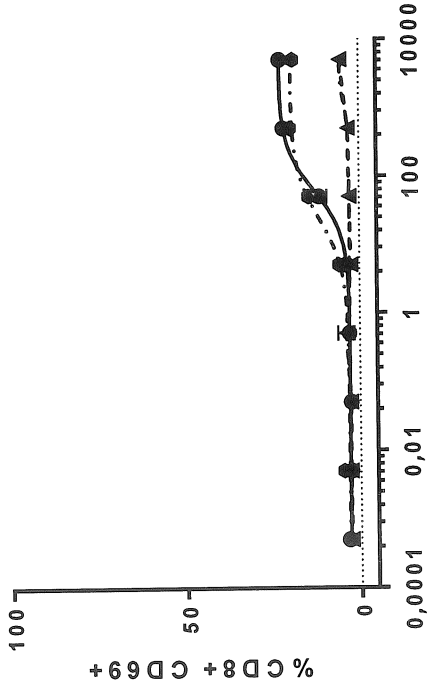
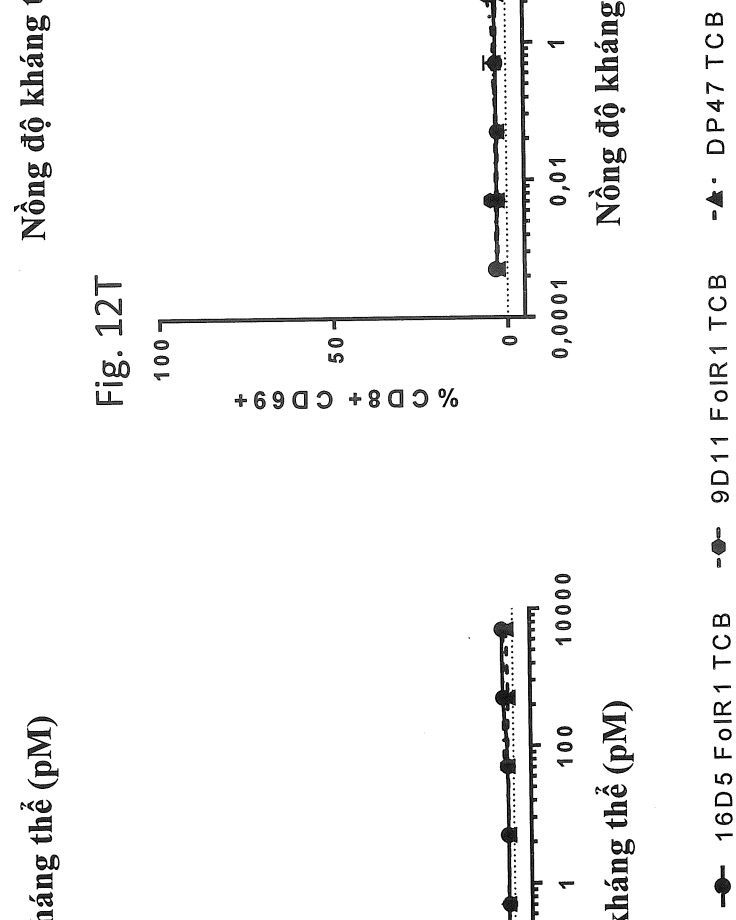


Fig. 12T





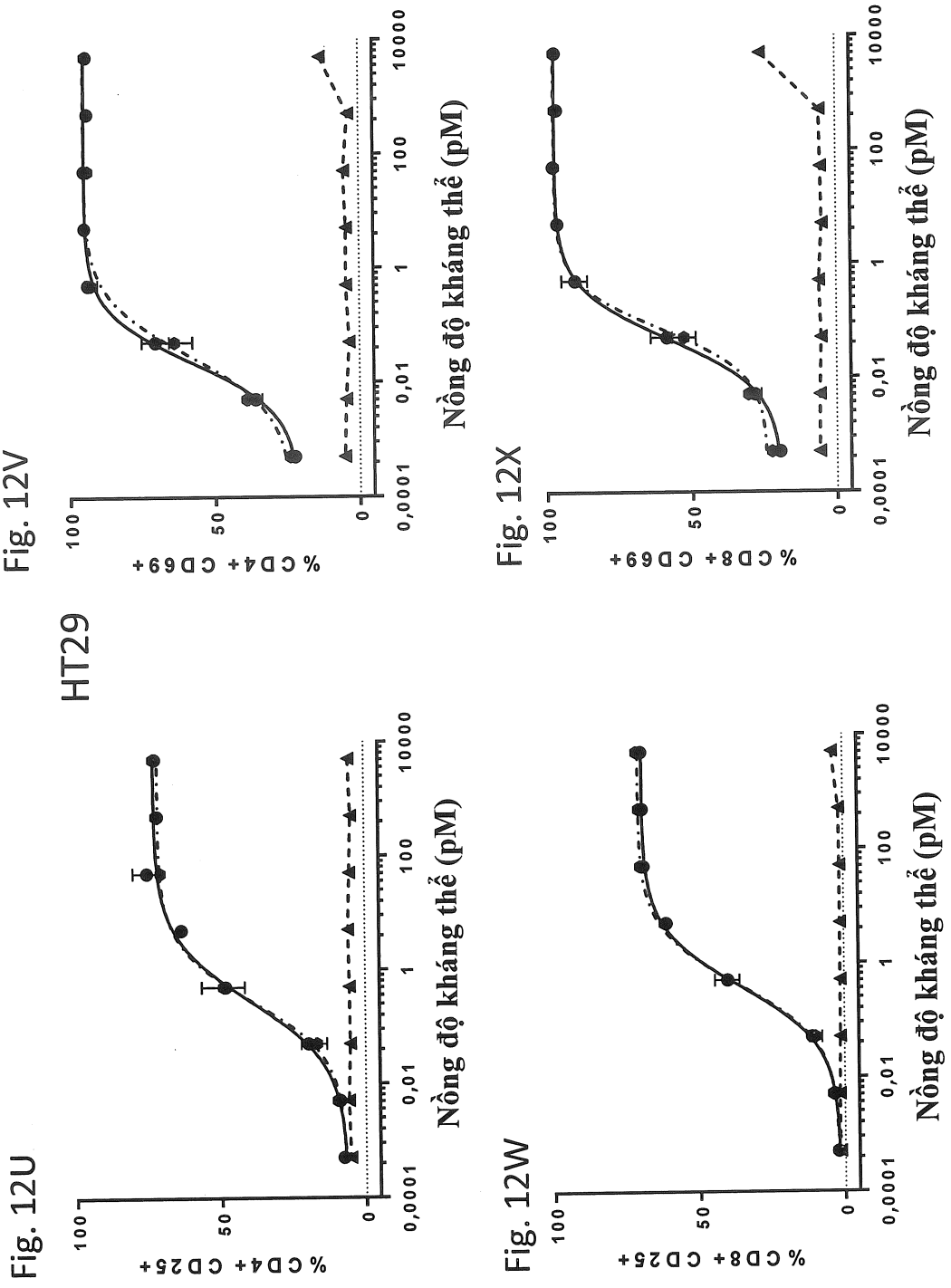

HT29
Fig. 12U
% CD4+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 12V
% CD4+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 12W
% CD8+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 12X
% CD8+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
16D5 FolR1 TCB
9D11 FolR1 TCB
DP47 TCB

Fig. 13A

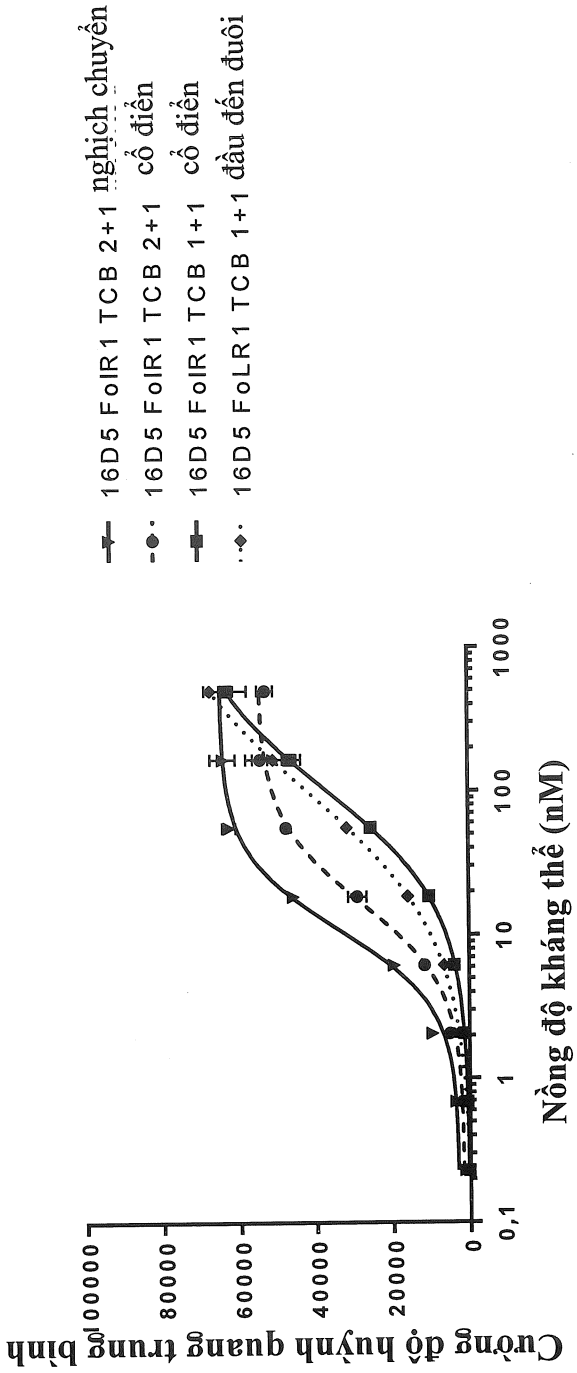

16D5 FolR1 TCB 2+1 nghịch chuyển
16D5 FolR1 TCB 2+1 cổ điển
16D5 FolR1 TCB 1+1 cổ điển
16D5 FoLR1 TCB 1+1 đầu đến đuôi
Cường độ huỳnh quang trung bình
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể (nM)

Fig. 13B

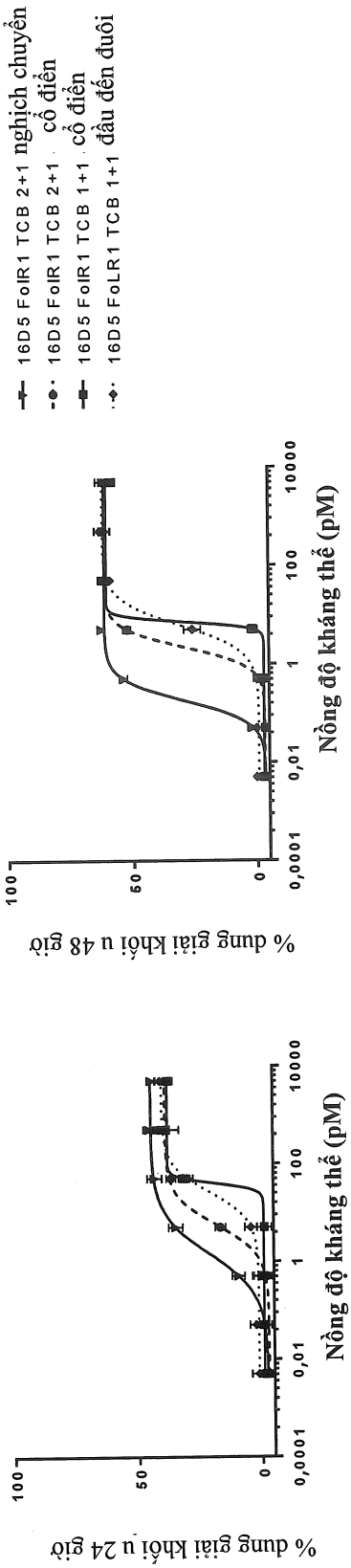

16D5 FolR1 TCB 2+1 nghịch chuyển cổ điển
16D5 FolR1 TCB 2+1 cổ điển
16D5 FolR1 TCB 1+1 cổ điển
16D5 FoLR1 TCB 1+1 đầu đến đuôi
% dung giải khối u 48 giờ
% dung giải khối u 24 giờ
100
50
0
0,0001
0,01
1
100
10000
Nồng độ kháng thể (pM)

Fig. 13C

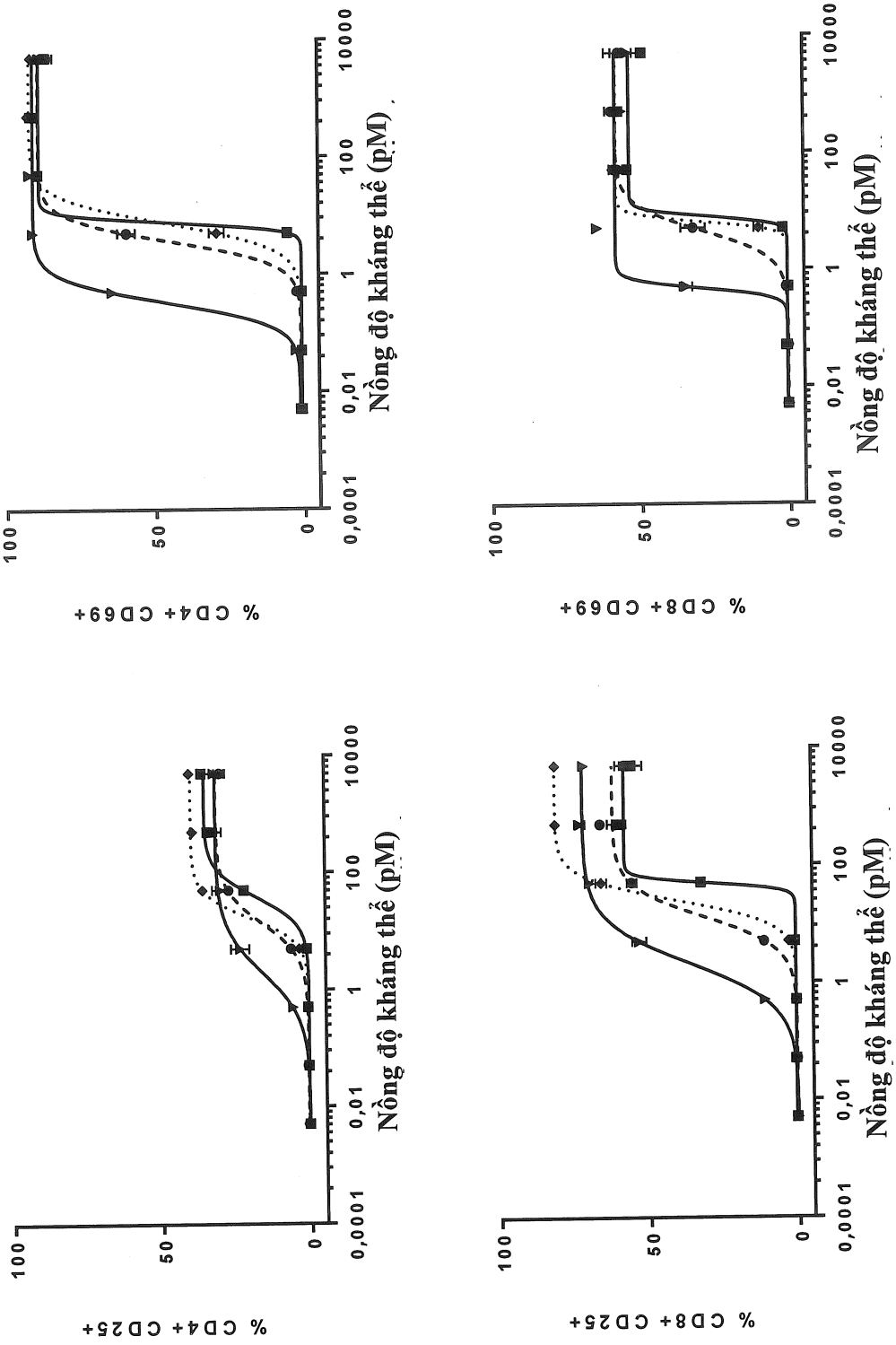

% CD4+ CD69+
% CD8+ CD69+
% CD4+ CD25+
% CD8+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
0,0001
0,01
1
100
10000
0
50
100
16D5 FoIR1 TCB 2+1 nghịch chuyển
16D5 FoIR1 TCB 2+1 cổ điển
16D5 FoIR1 TCB 1+1 cổ điển
16D5 FoLR1 TCB 1+1 đầu đến đuôi

Fig. 14A

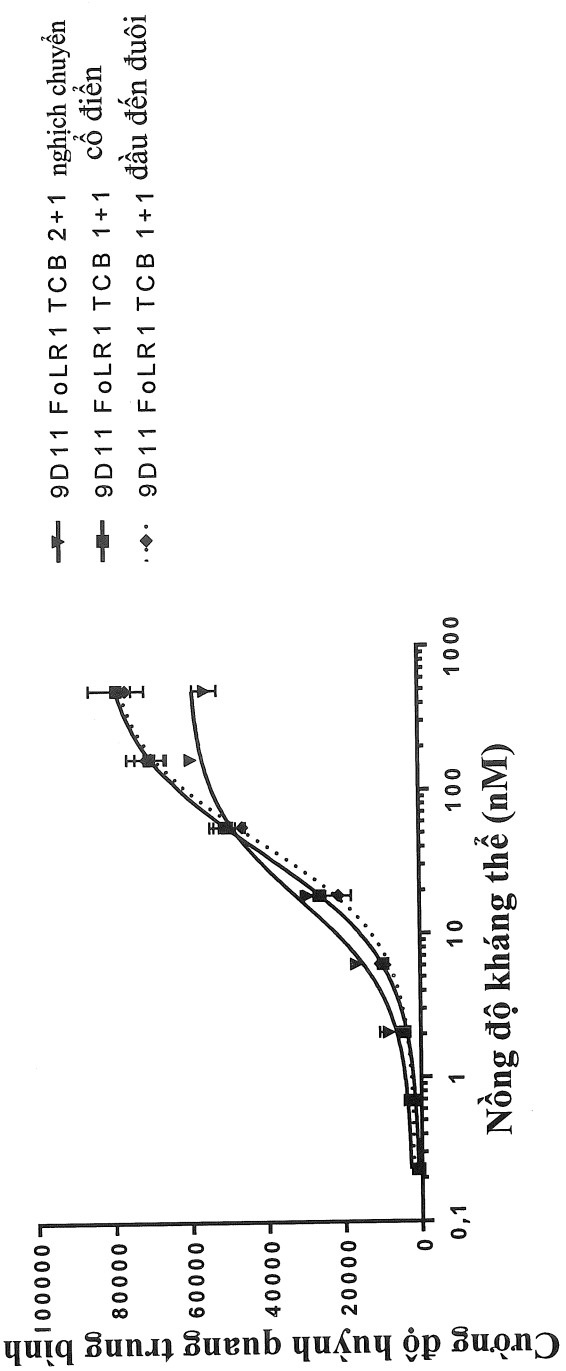

9D11 FoLR1 TCB 2+1 nghịch chuyển
9D11 FoLR1 TCB 1+1 cổ điển
9D11 FoLR1 TCB 1+1 đầu đến đuôi
Cường độ huỳnh quang trung bình
100000
80000
60000
40000
20000
0
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ kháng thể (nM)

Fig. 14B

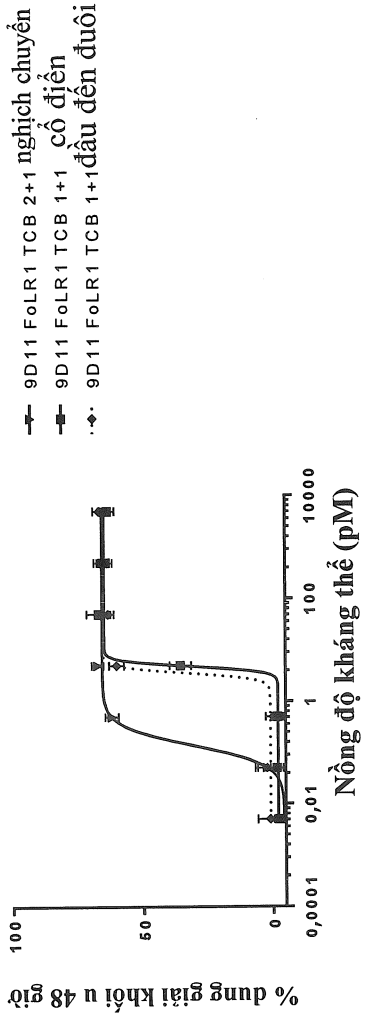

9D11 FoLR1 TCB 2+1 nghịch chuyển
9D11 FoLR1 TCB 1+1 cổ điển
9D11 FoLR1 TCB 1+1đầu đến đuôi
% dung giải khối u 48 giờ
100
50
0
0,0001
0,01
1
100
10000
Nồng độ kháng thể (pM)
% dung giải khối u 24 giờ
100
50
0
0,0001
0,01
1
100
10000
Nồng độ kháng thể (pM)

Fig. 14C

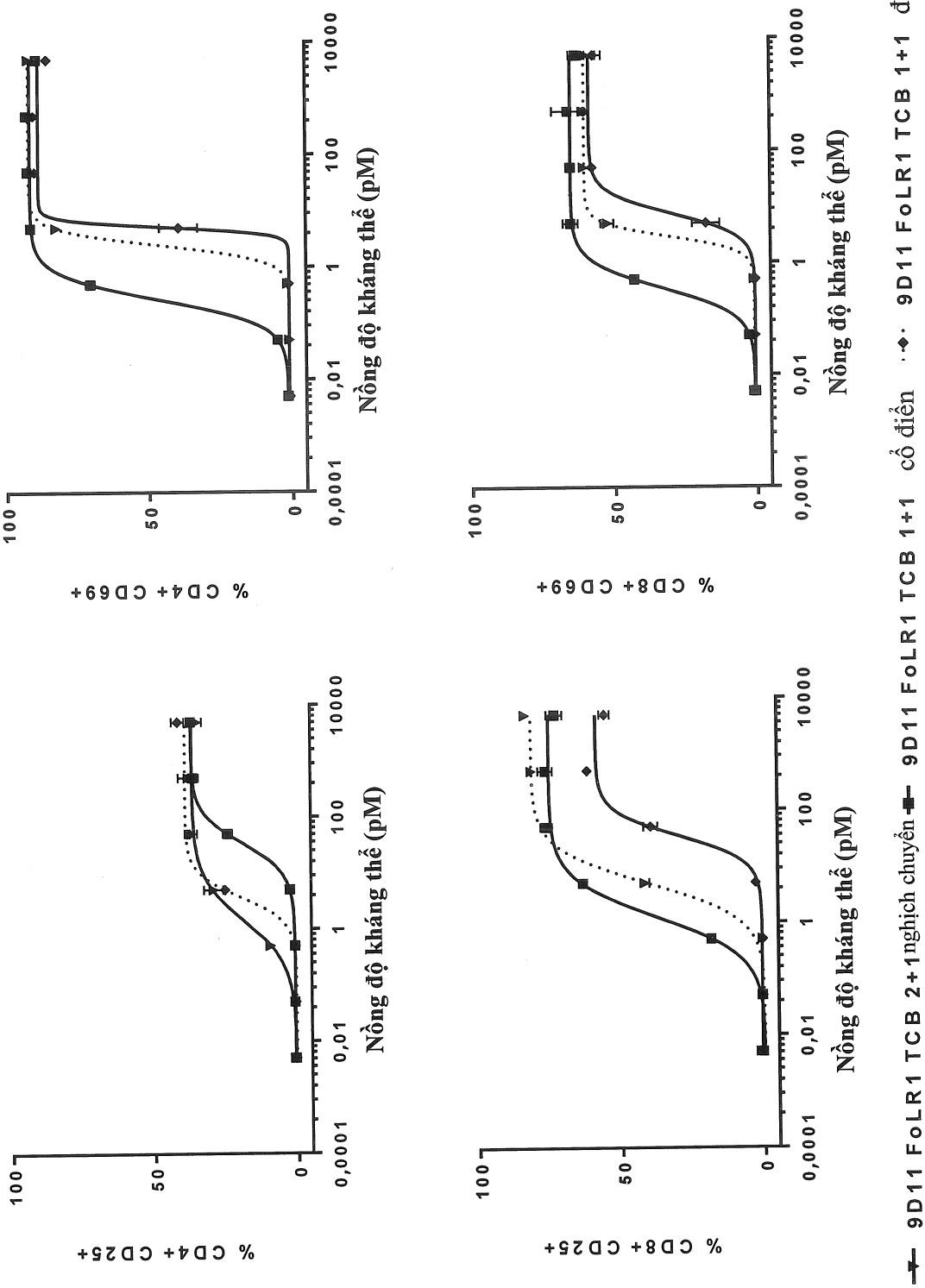

% CD4+ CD69+
% CD8+ CD69+
% CD4+ CD25+
% CD8+ CD25+
100
50
0
0,0001
0,01
1
100
10000
Nồng độ kháng thể (pM)
9D11 FoLR1 TCB 2+1 nghịch chuyển
9D11 FoLR1 TCB 1+1 cổ điển
9D11 FoLR1 TCB 1+1 đầu đến đuôi

Fig. 15

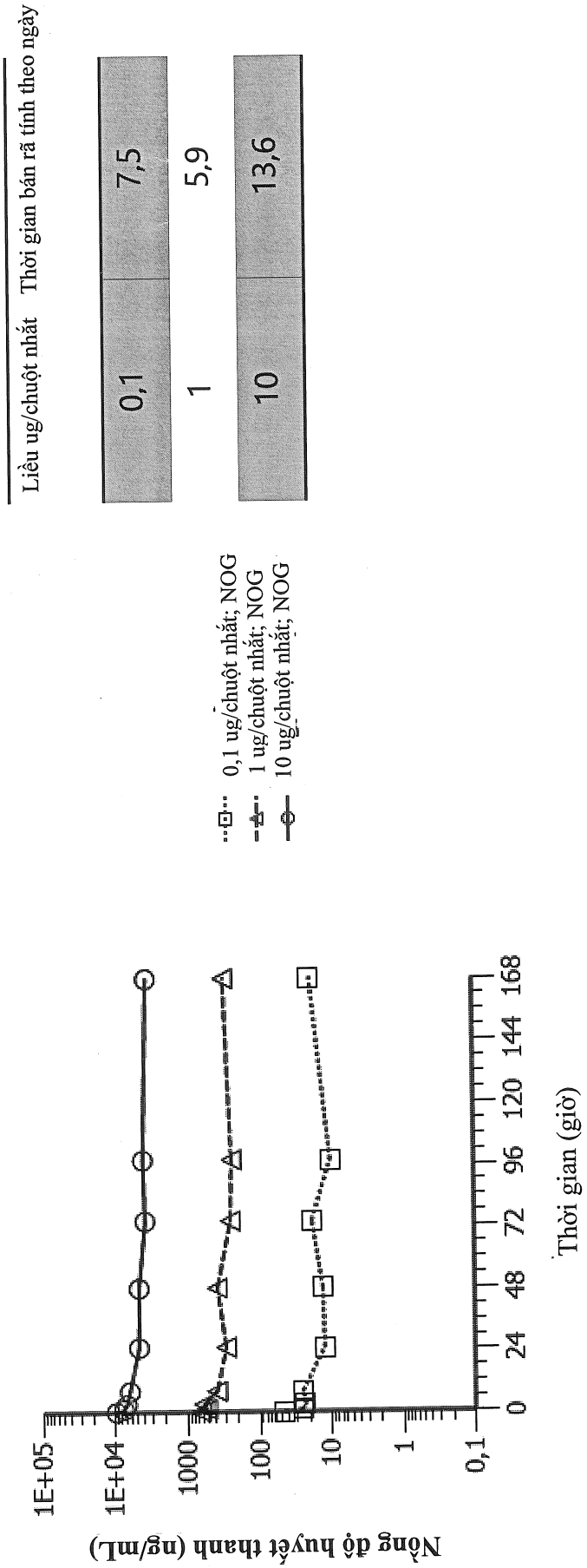

Liều ug/chuột nhắt
Thời gian bán rã tính theo ngày
0,1
7,5
1
5,9
10
13,6
0,1 ug/chuột nhắt; NOG
1 ug/chuột nhắt; NOG
10 ug/chuột nhắt; NOG
Nồng độ huyết thanh (ng/mL)
1E+05
1E+04
1000
100
10
1
0,1
0
24
48
72
96
120
144
168
Thời gian (giờ)

Fig. 16

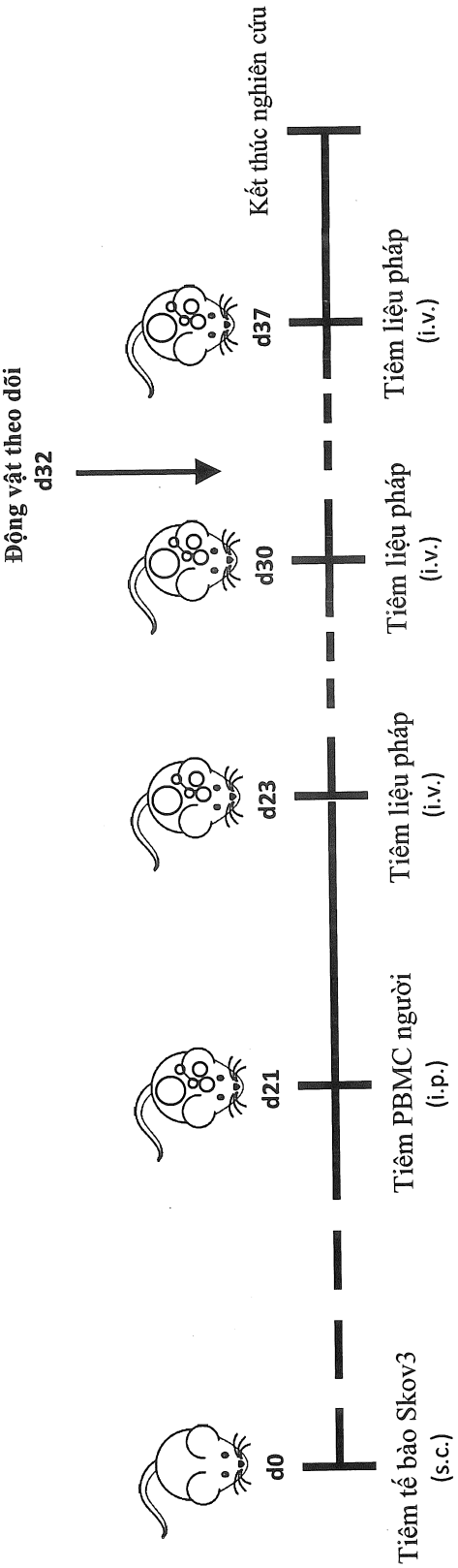

d0
Tiêm tế bào Skov3 (s.c.)
d21
Tiêm PBMC người (i.p.)
d23
Tiêm liệu pháp (i.v.)
Động vật theo dõi d32
d30
Tiêm liệu pháp (i.v.)
d37
Tiêm liệu pháp (i.v.)
Kết thúc nghiên cứu

Fig. 17A

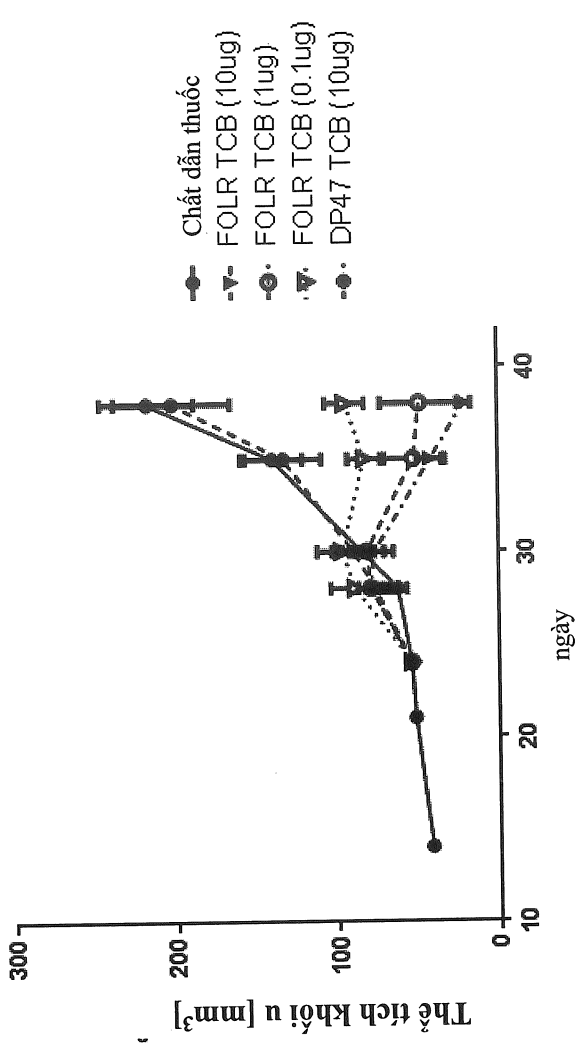


Fig. 17B

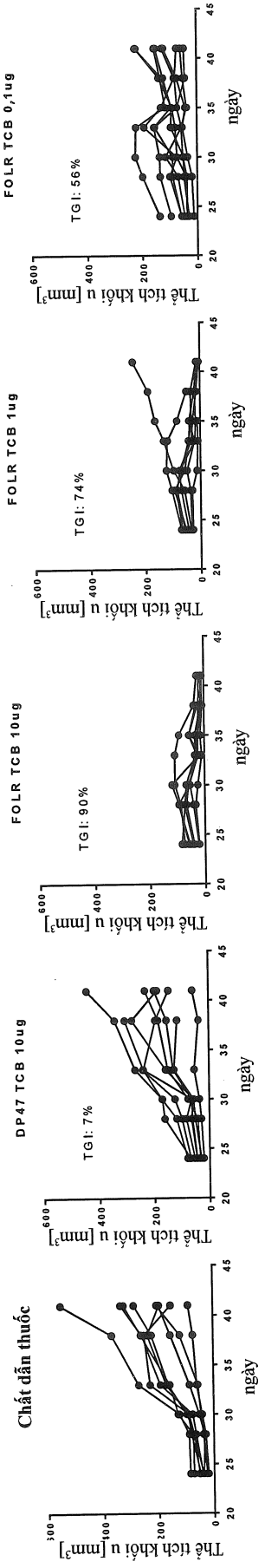


Fig. 18

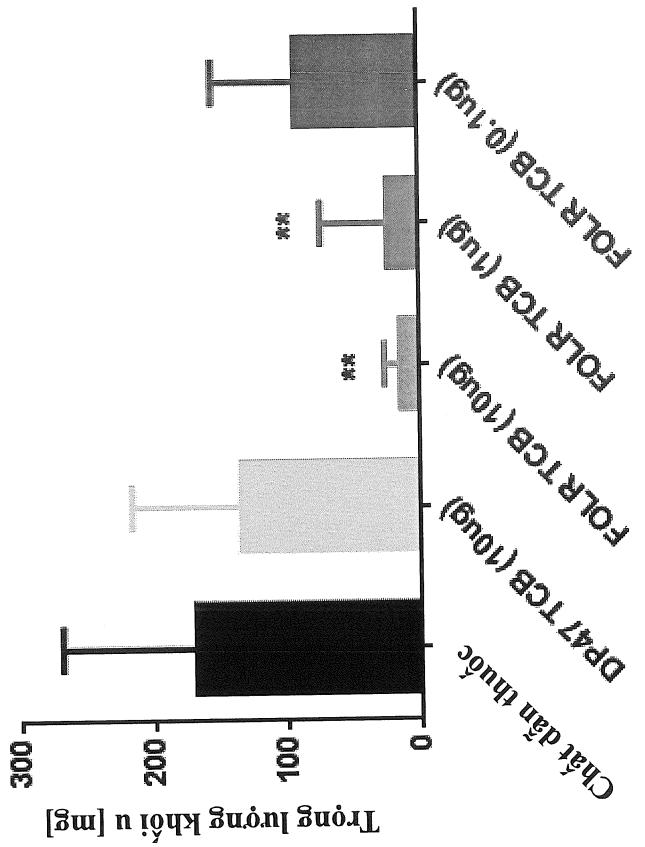

Trọng lượng khối u [mg]
300
200
100
0
Chất dẫn thuốc
DP47 TCB (10ug)
FOLR TCB (10ug)
FOLR TCB (1ug)
FOLR TCB (0,1ug)
**
**
** p≤0,01 (so với nhóm chất dẫn thuốc)
Kiểm định T: không bắt cặp, hai đuôi

Fig. 19A



Fig. 19B

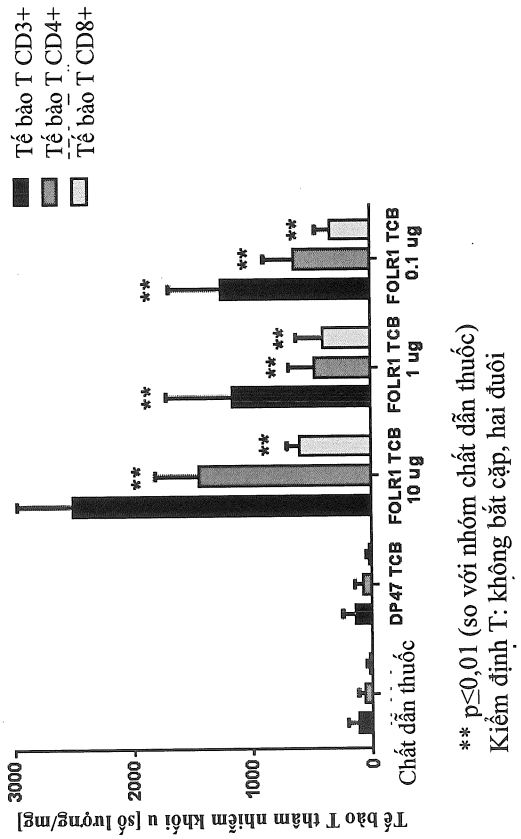
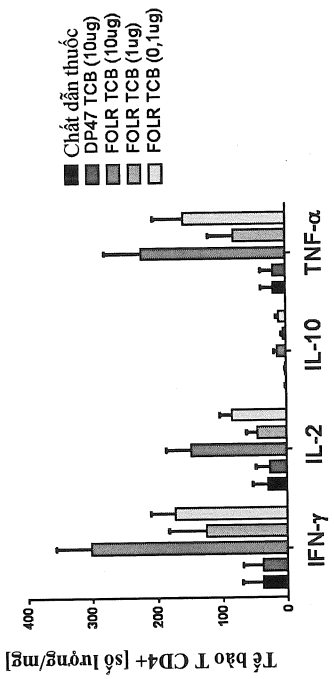
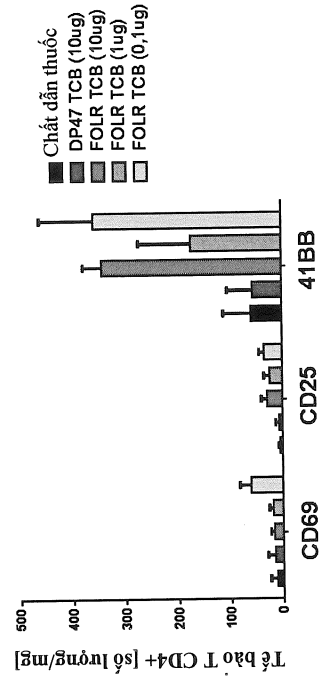


Fig. 20A





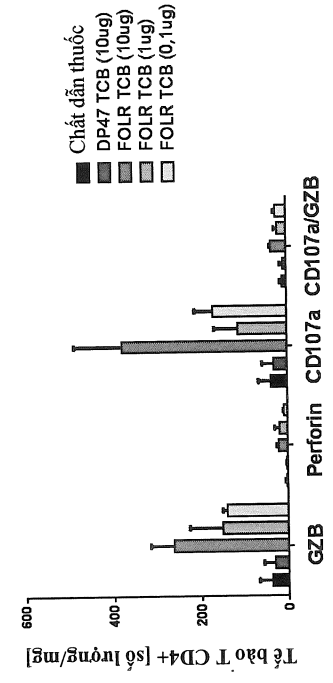
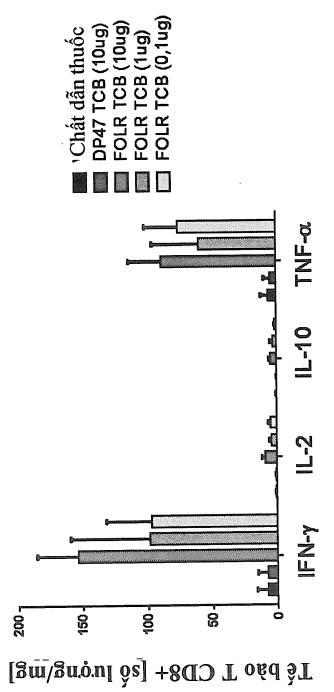
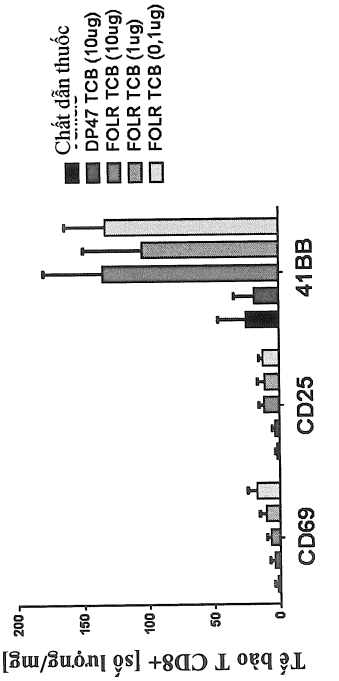


Fig. 20B





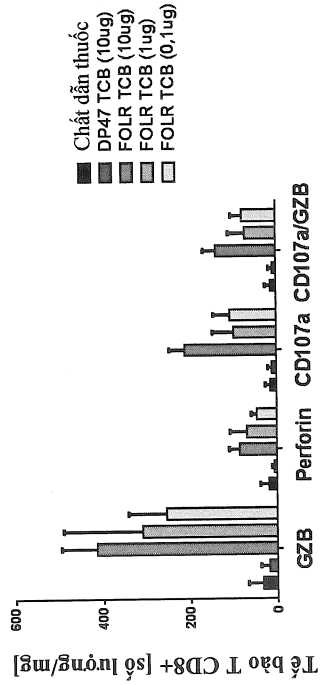


Fig. 21B

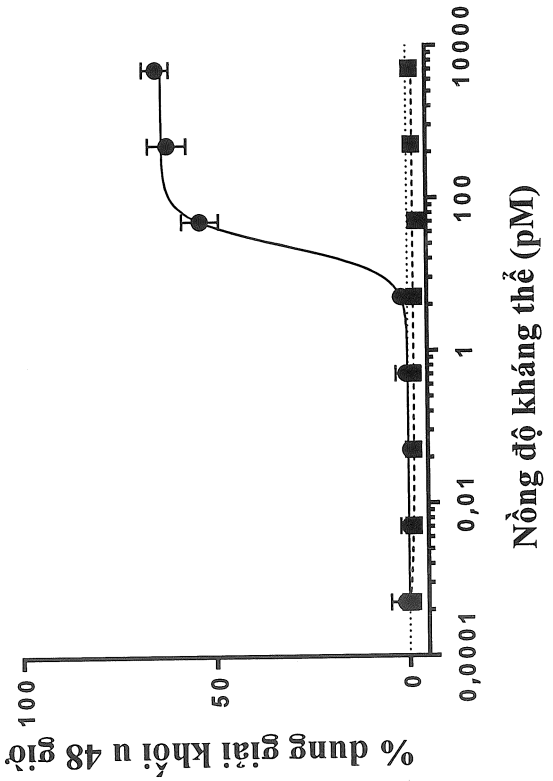
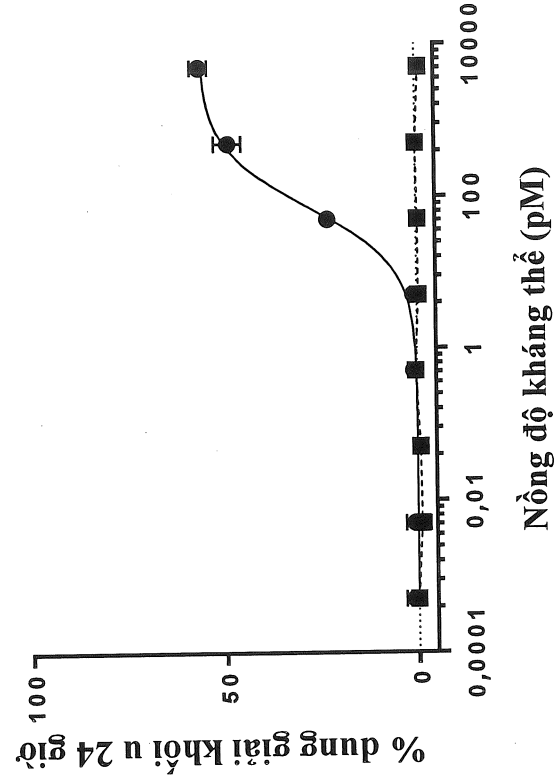


Fig. 21A



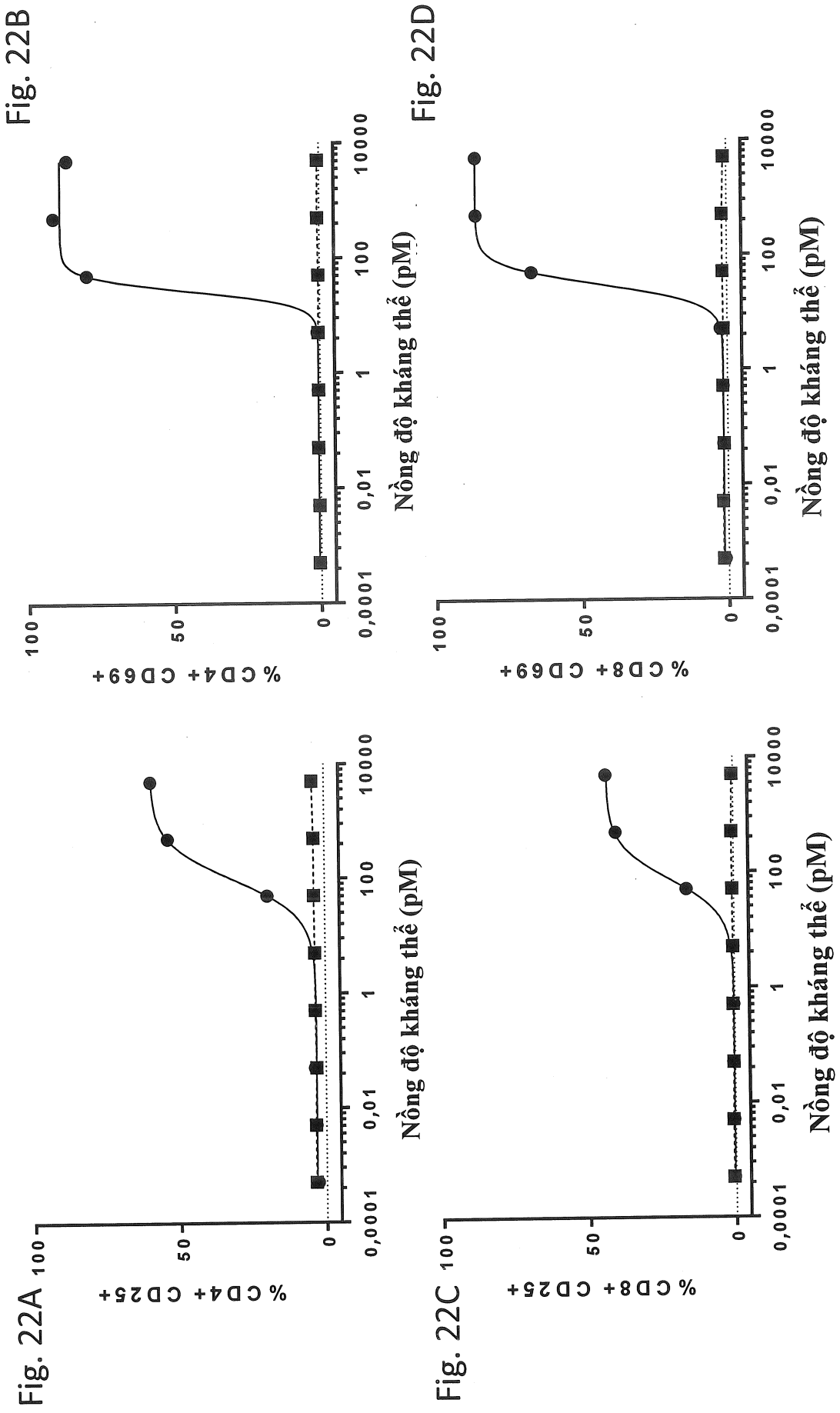

Fig. 22A
% CD4+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 22B
% CD4+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 22C
% CD8+ CD25+
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 22D
% CD8+ CD69+
Nồng độ kháng thể (pM)
DP47 TCB
kappa lambda FolR1 TCB

Fig. 23A

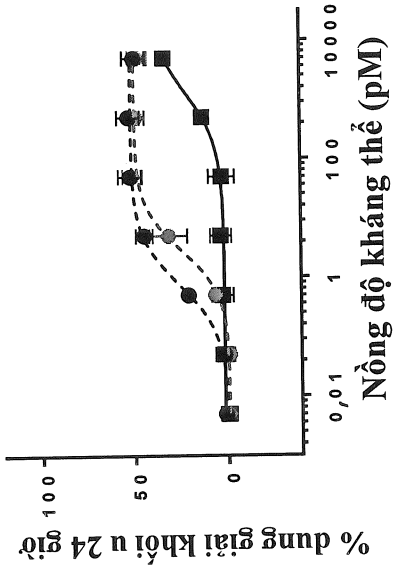


Fig. 23B

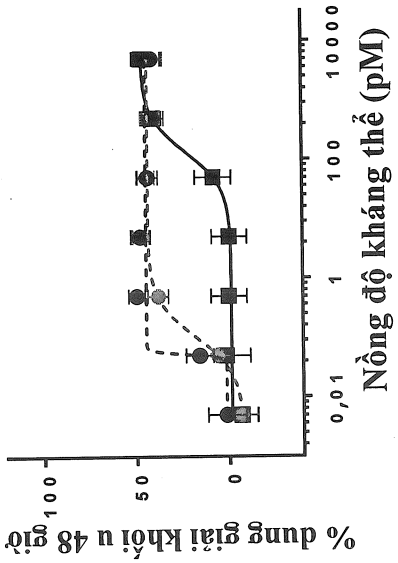


Fig. 24A

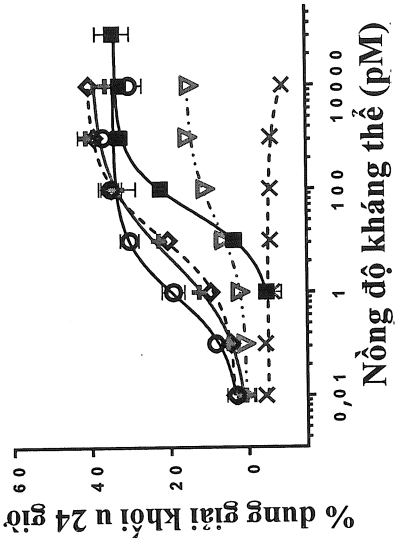
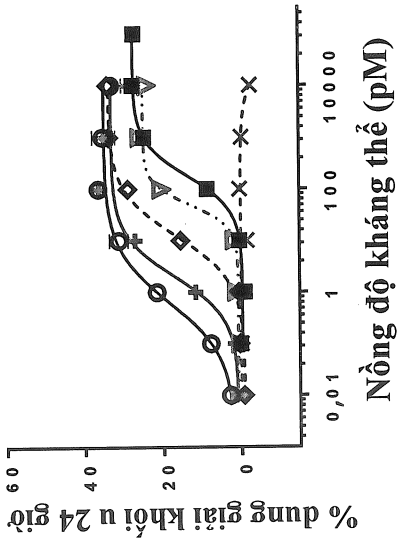


Fig. 24B



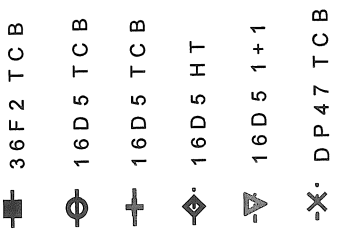


Fig. 24C

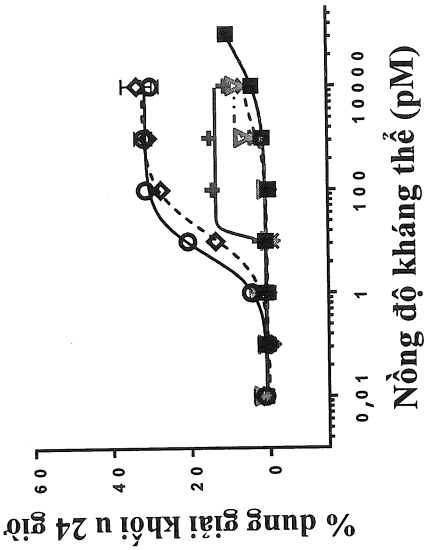
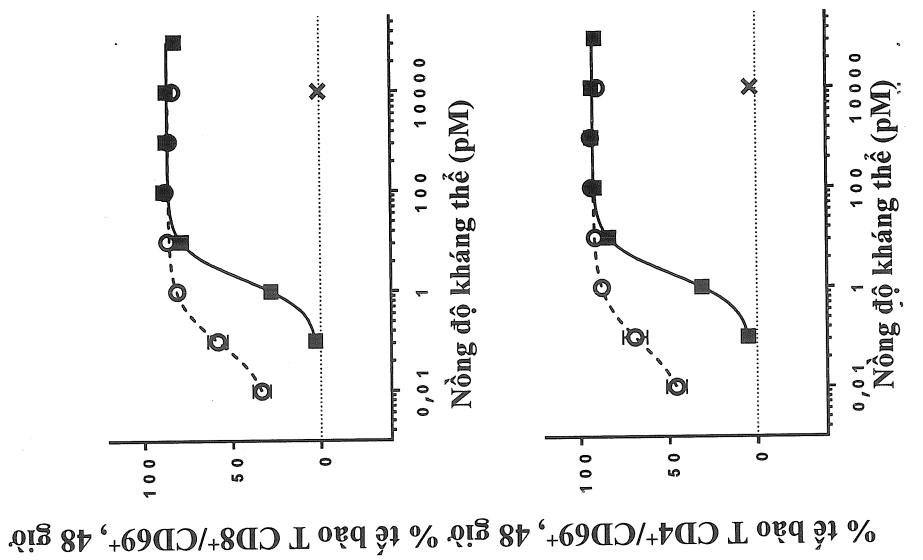


Fig. 25A


% tế bào T CD4+/CD69+, 48 giờ
% tế bào T CD8+/CD69+, 48 giờ
100
50
0
0,01
1
100
10000
Nồng độ kháng thể (pM)
36F2 TCB
16D5 TCB
DP47 TCB

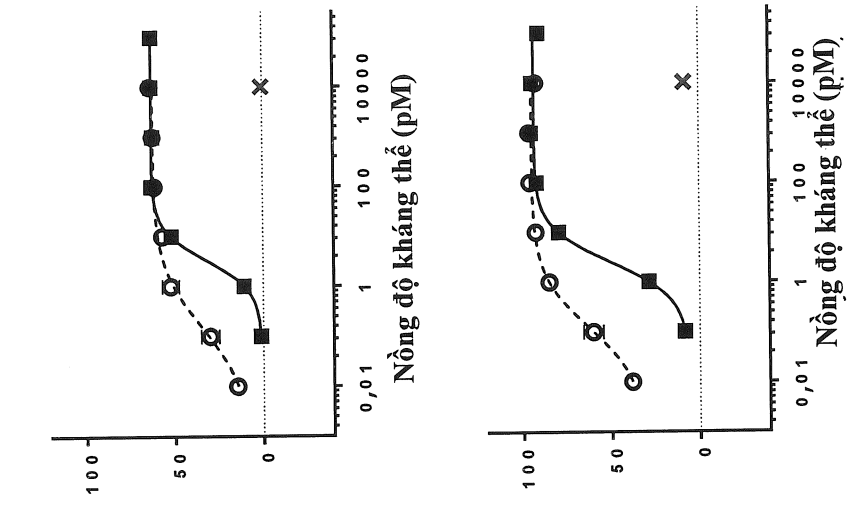

% tế bào T CD4+/CD25+, 48 giờ
% tế bào T CD8+/CD25+, 48 giờ
100
50
0
0,01
1
100
10000
Nồng độ kháng thể (pM)

Fig. 25B

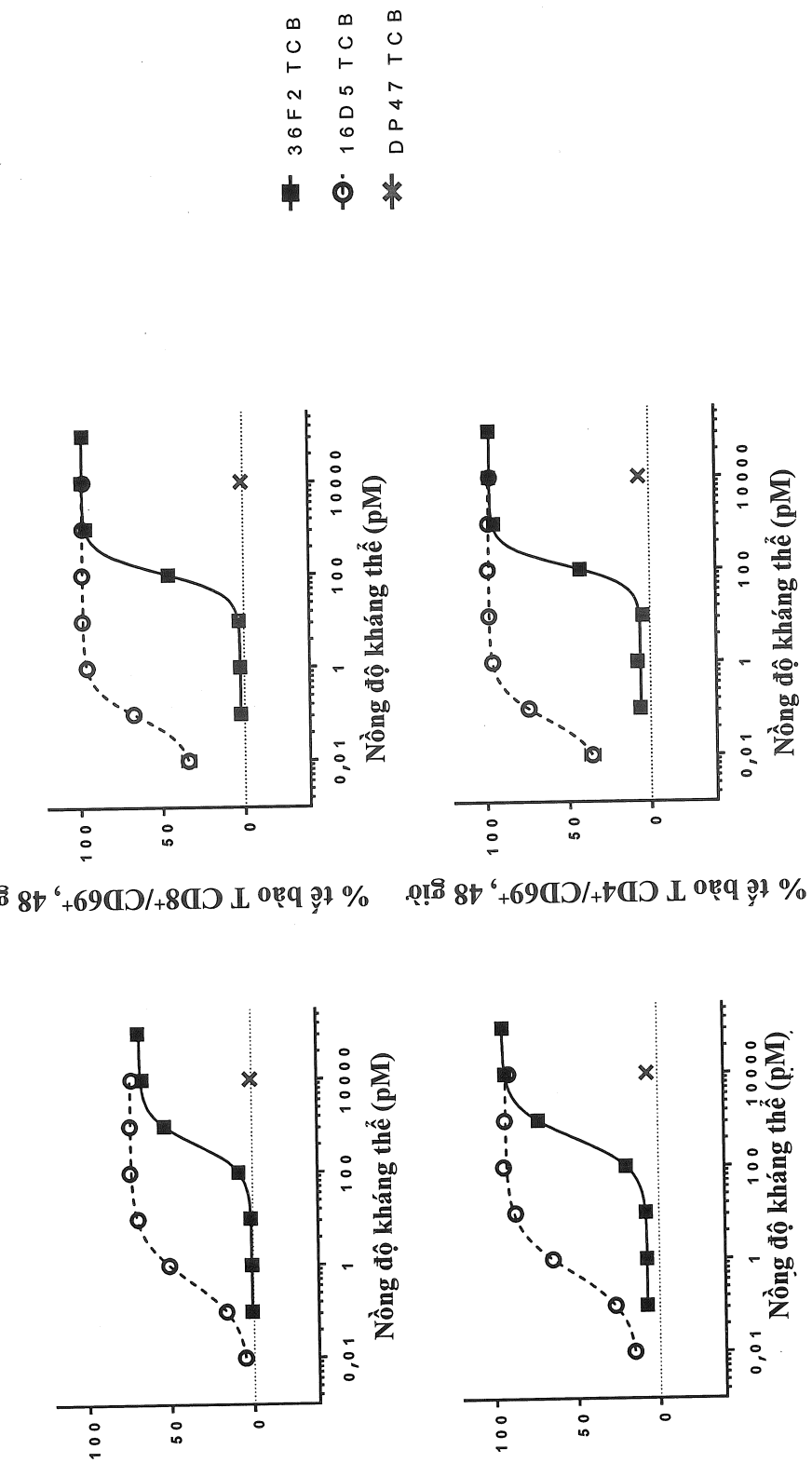
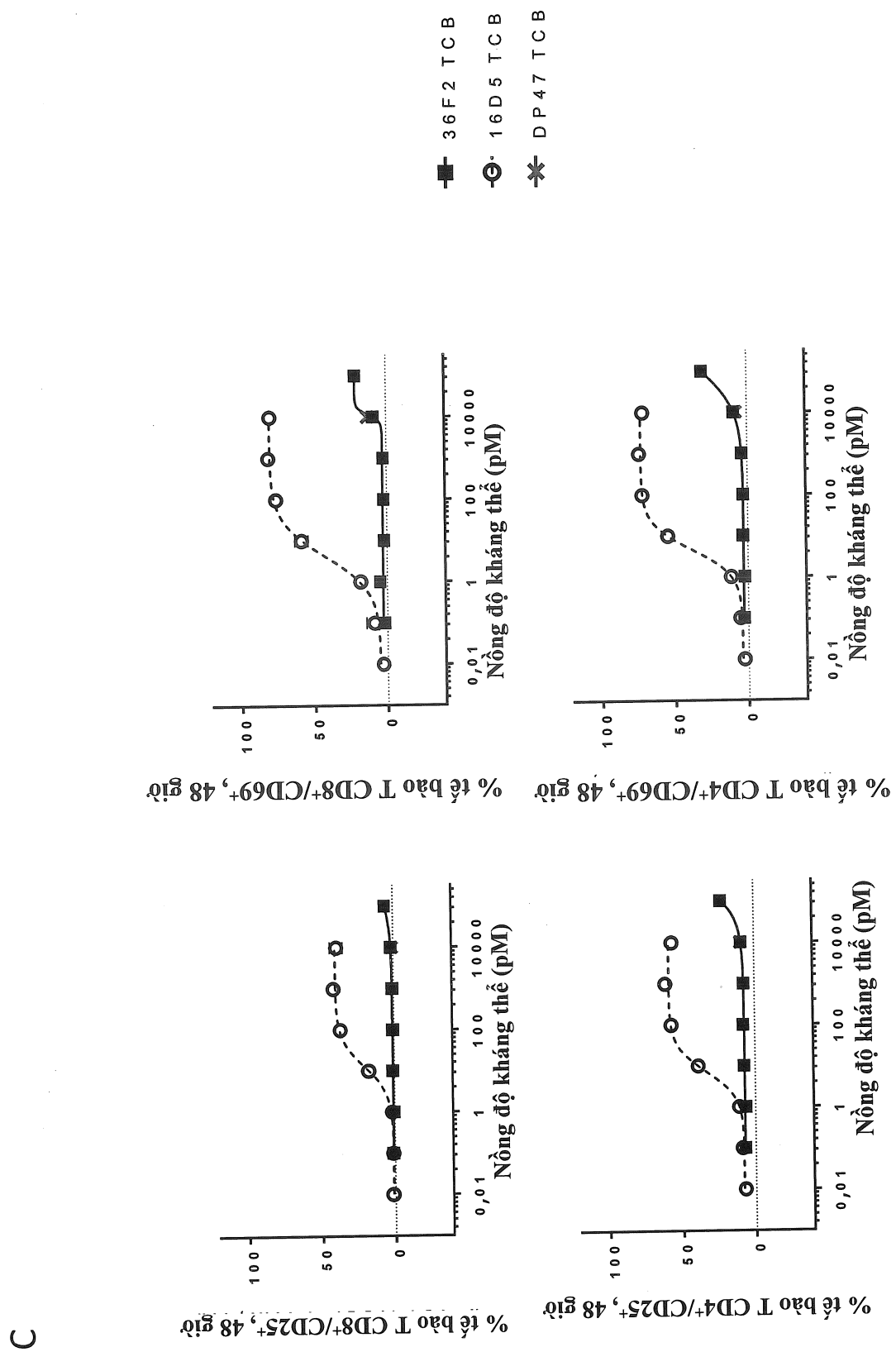

36F2 TCB
16D5 TCB
DP47 TCB
% tế bào T CD4+/CD25+, 48 giờ
% tế bào T CD8+/CD25+, 48 giờ
% tế bào T CD4+/CD69+, 48 giờ
% tế bào T CD8+/CD69+, 48 giờ
Nồng độ kháng thể (pM)
0,01
1
100
10000
0
50
100

Fig. 25C


36F2 TCB
16D5 TCB
DP47 TCB
% tế bào T CD4+/CD69+, 48 giờ
% tế bào T CD8+/CD69+, 48 giờ
% tế bào T CD4+/CD25+, 48 giờ
% tế bào T CD8+/CD25+, 48 giờ
Nồng độ kháng thể (pM)
0,01
1
100
10000
0
50
100

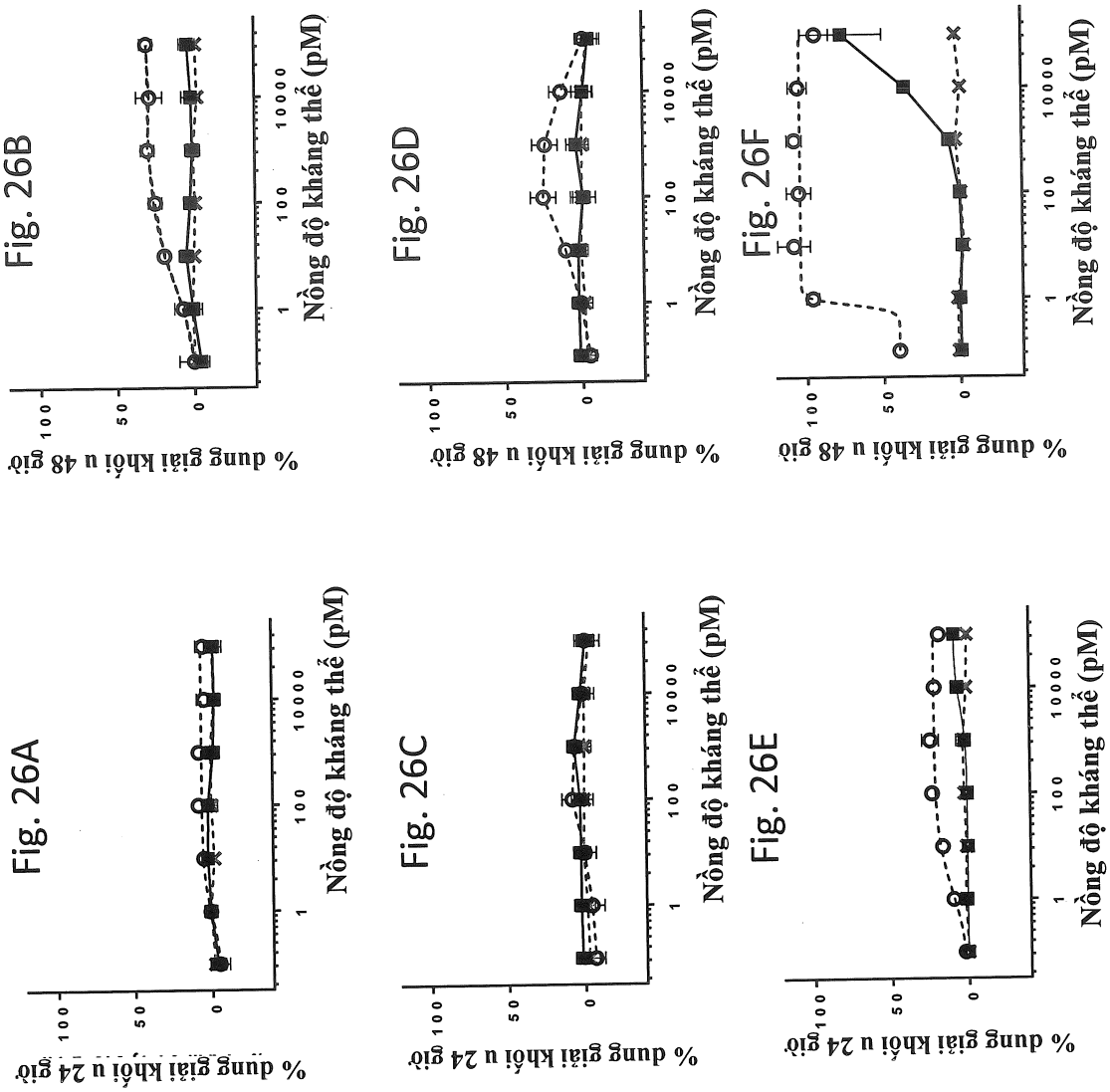

36F2 TCB
16D5 TCB
DP47 TCB
Fig. 26A
Fig. 26B
Fig. 26C
Fig. 26D
Fig. 26E
Fig. 26F
% dung giải khối u 24 giờ
% dung giải khối u 48 giờ
Nồng độ kháng thể (pM)
0
50
100
1
100
10000

Fig. 27

Dòng tế bào	Vị trí gắn kết	Dòng tế bào	Vị trí gắn kết
Hela	2'240'716	Biểu mô phế quản	492
Skov3	91'510	Biểu mô đám rối màng mạch	104
OVCAR5	22'077	Biểu mô vỏ thận	312
HT29	10'135	Biểu mô sắc tố võng mạc	822
MKN45	54	Skov3	69'890

Fig. 28A

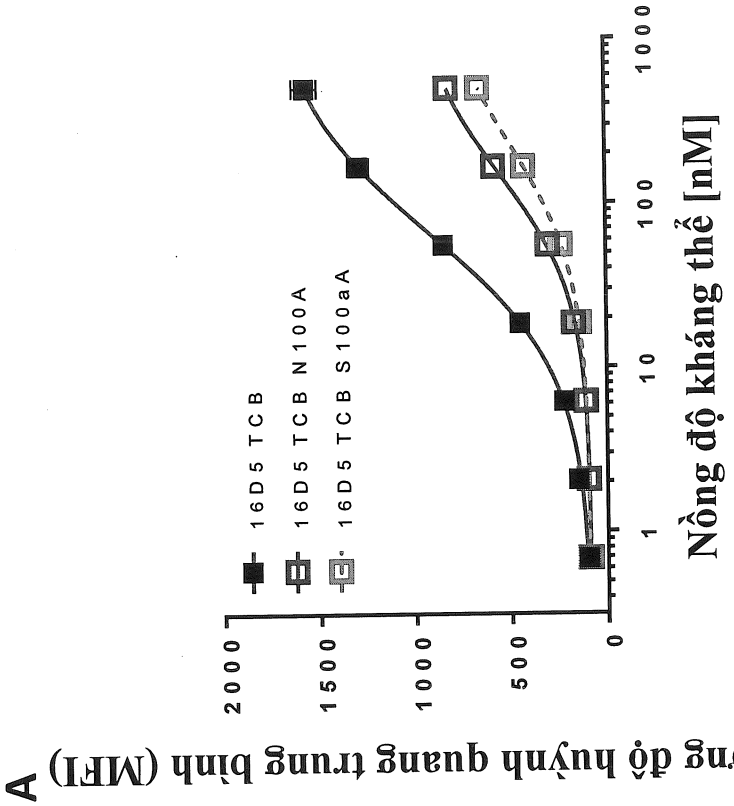


Fig. 28B

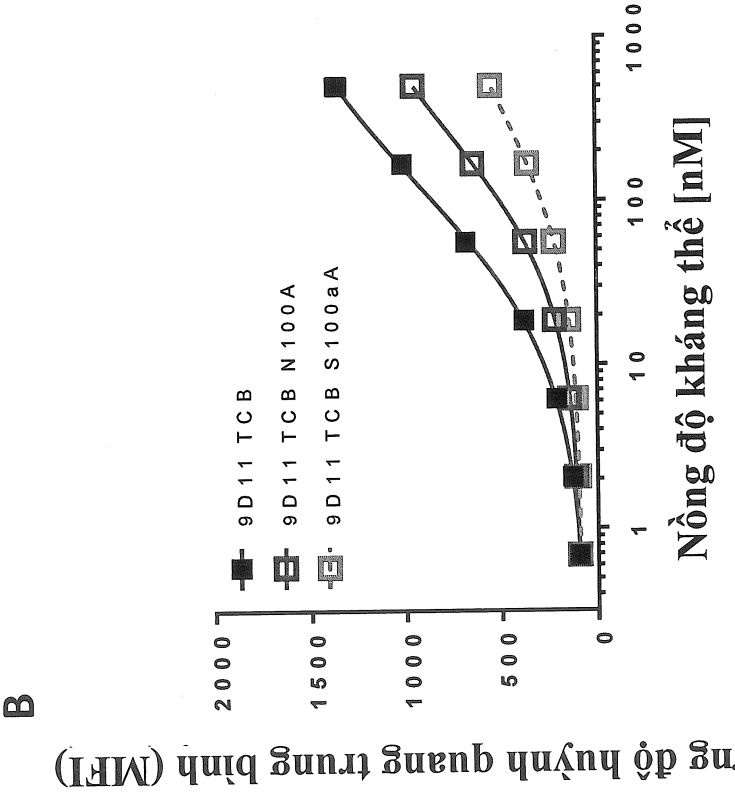


Fig. 29A

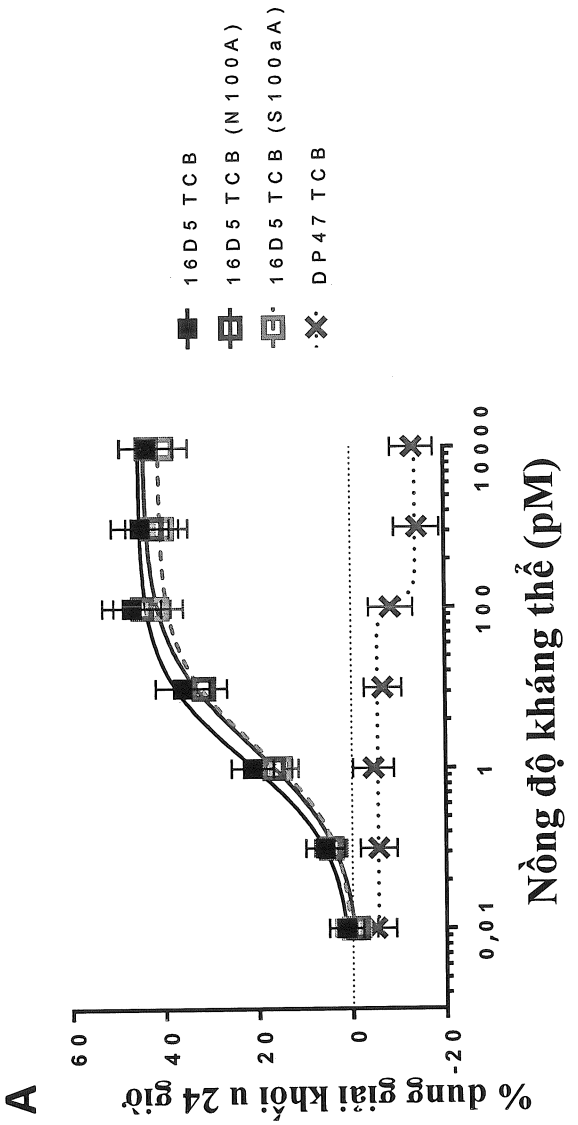


Fig. 29B

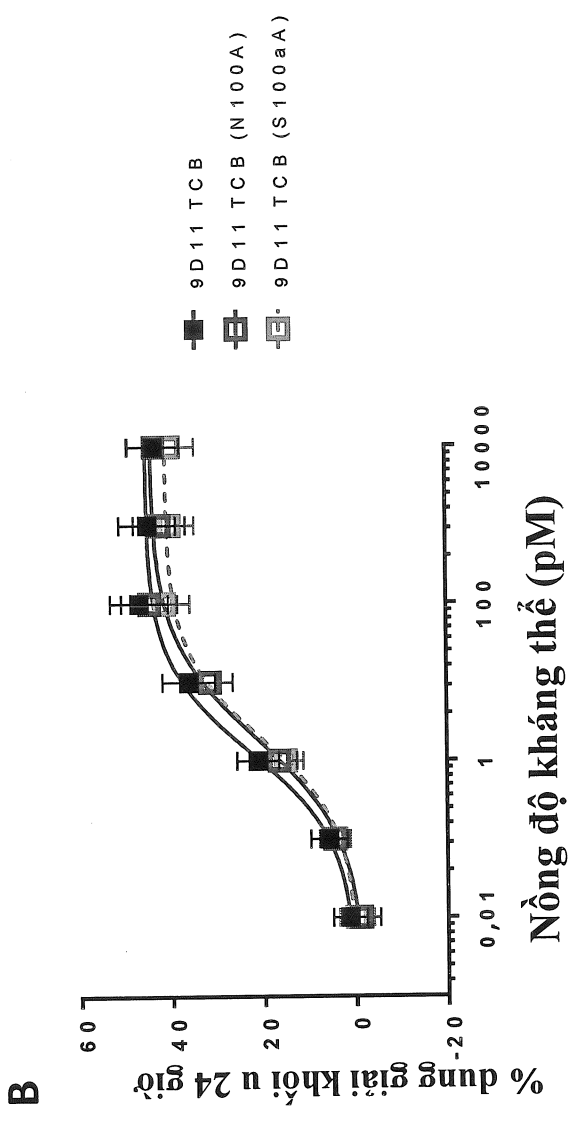


Fig. 30A

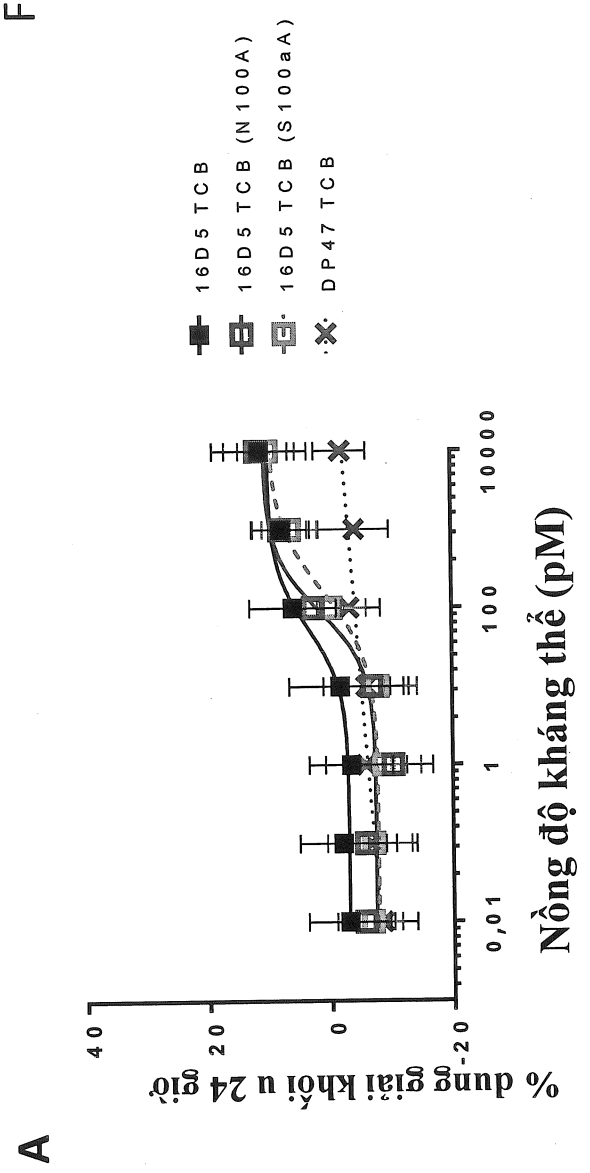


Fig. 30B

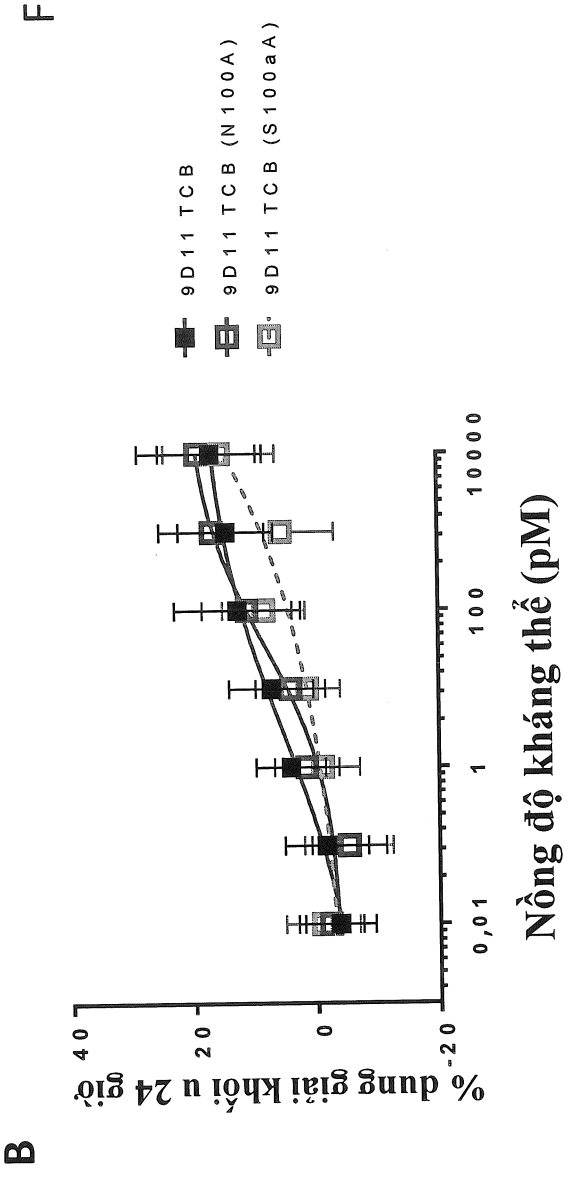


Fig. 31A

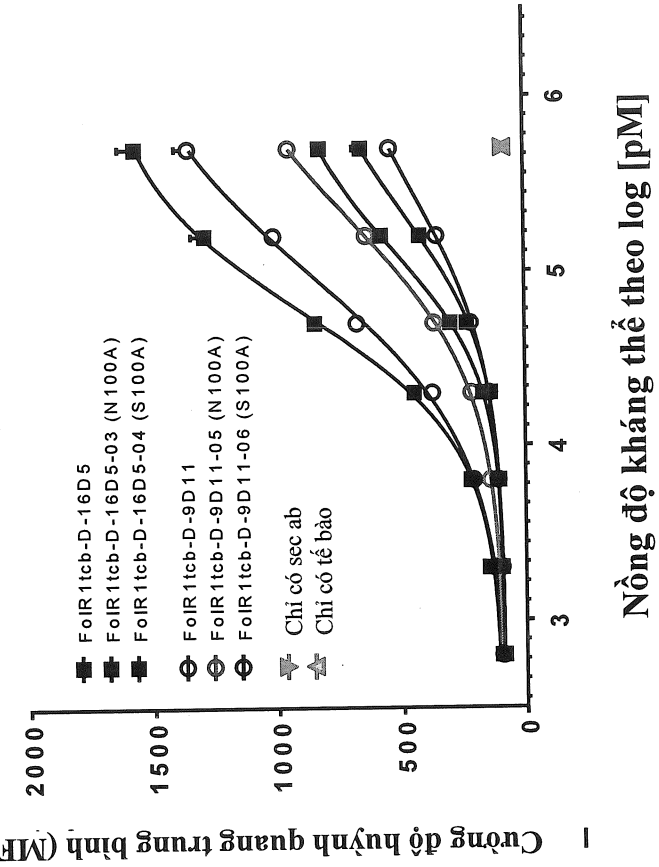


Fig. 31B

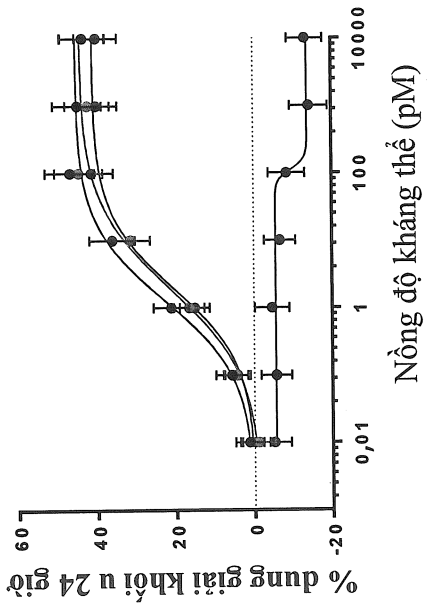


Fig. 31C

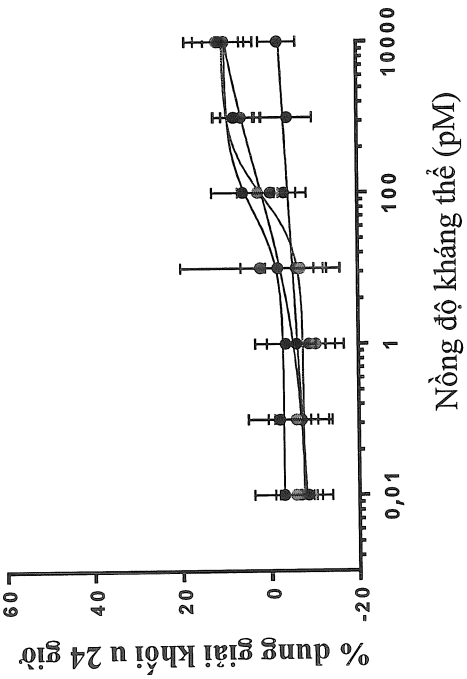


Fig. 32A

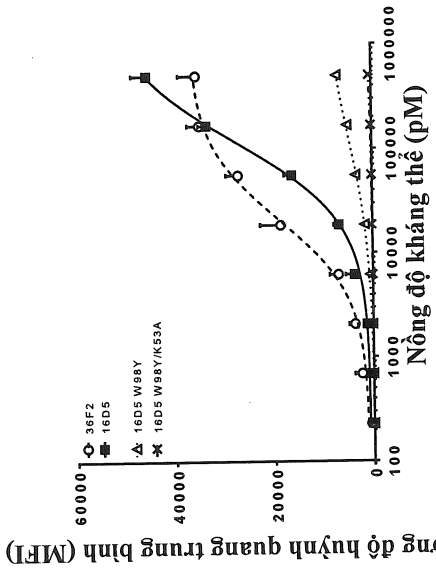


Fig. 32B

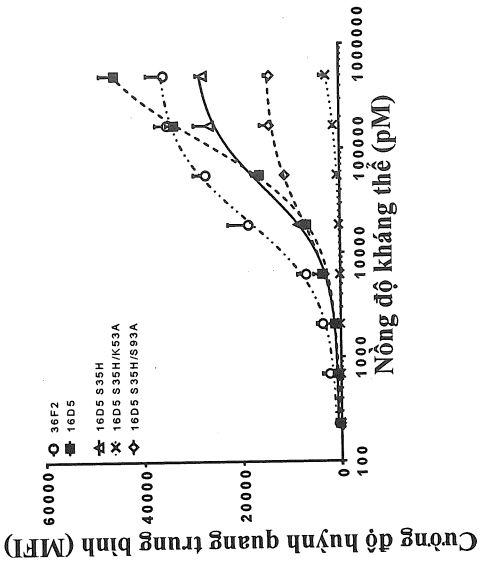


Fig. 32C

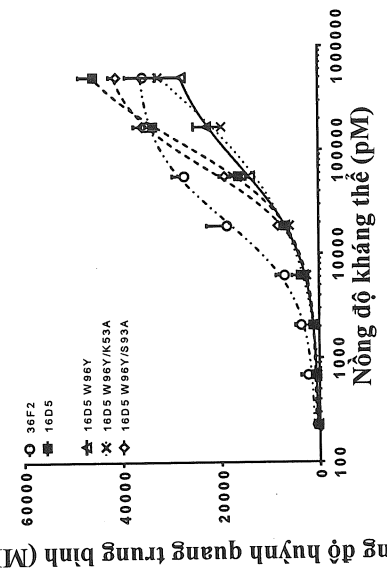


Fig. 32D

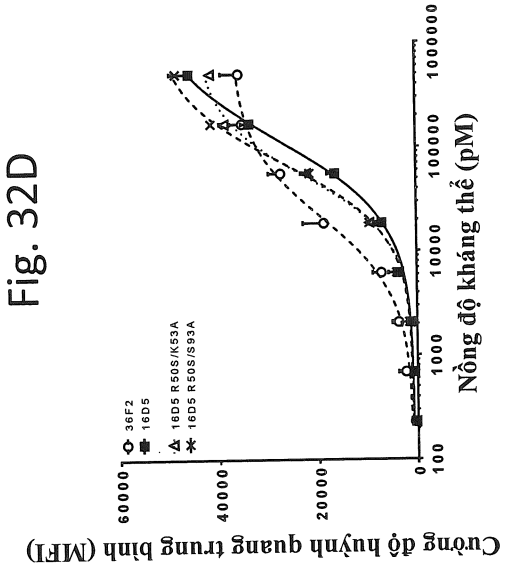


Fig. 32E

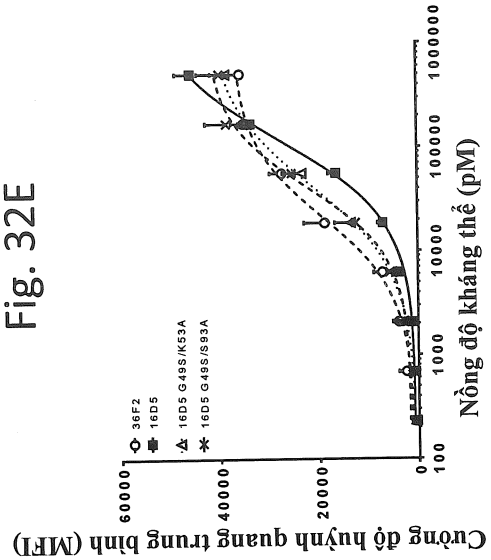


Fig. 33

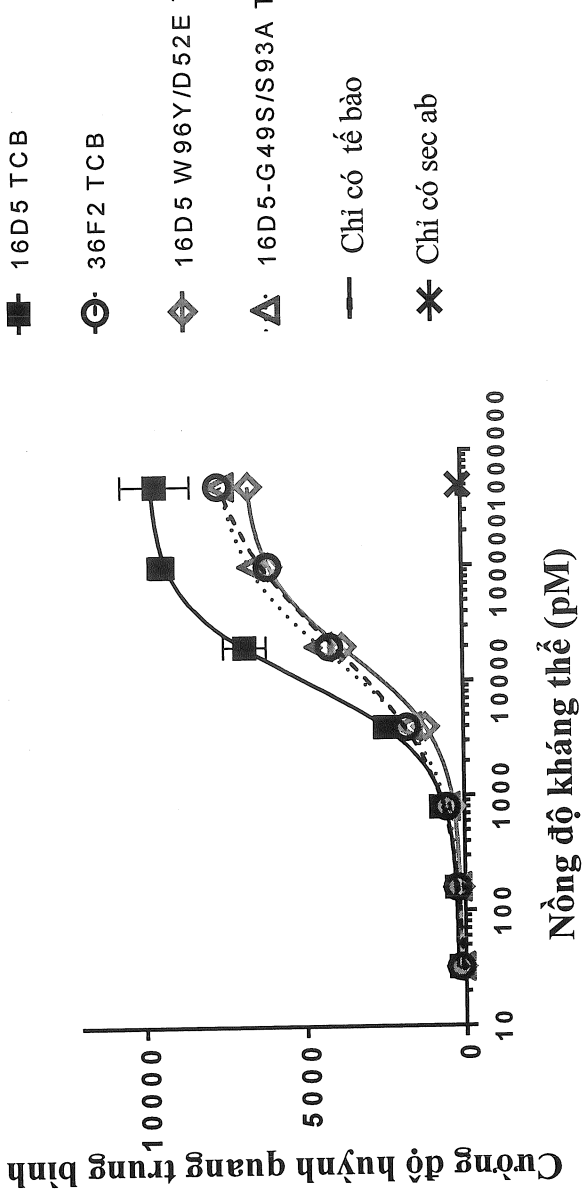

16D5 TCB
36F2 TCB
16D5 W96Y/D52E TCB
16D5-G49S/S93A TCB
Chỉ có tế bào
Chỉ có sec ab
Cường độ huỳnh quang trung bình
10000
5000
0
10
100
1000
10000
100000
1000000
Nồng độ kháng thể (pM)

Fig. 34A

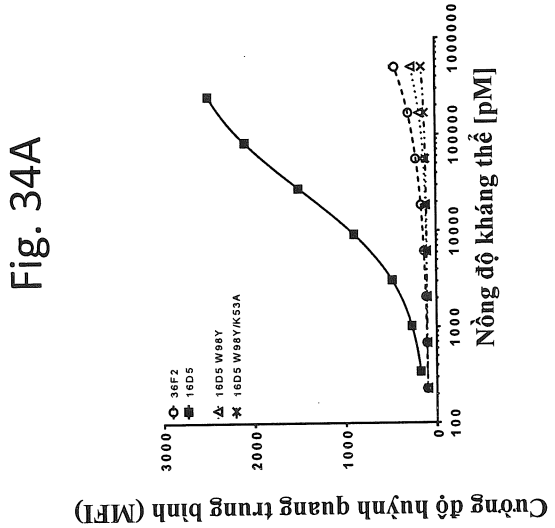


Fig. 34B

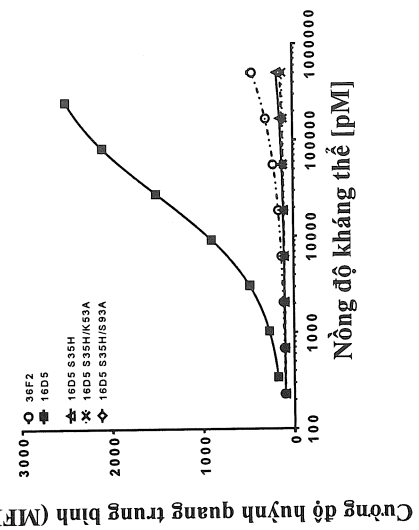


Fig. 34C

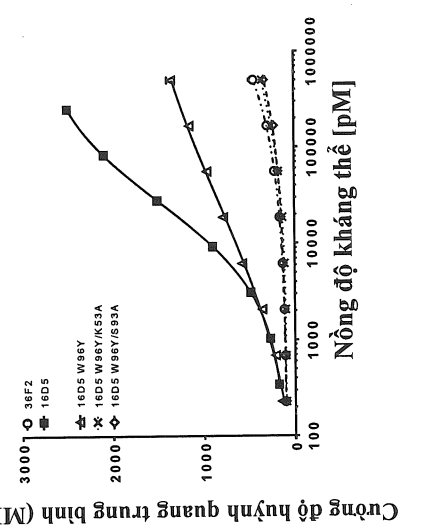


Fig. 34D

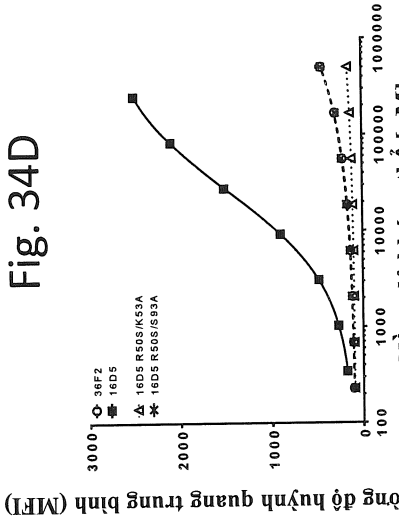
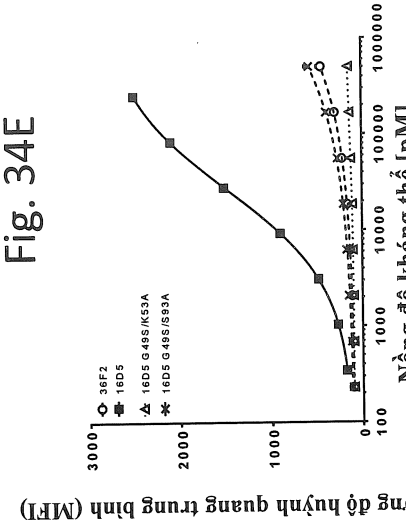


Fig. 34E



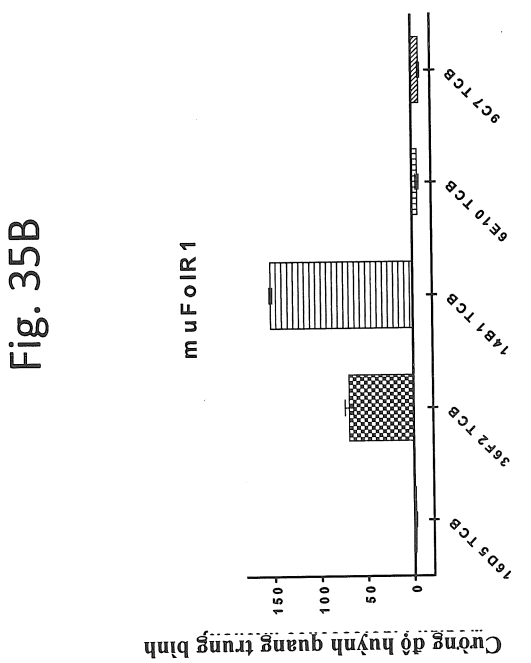


Fig. 35B

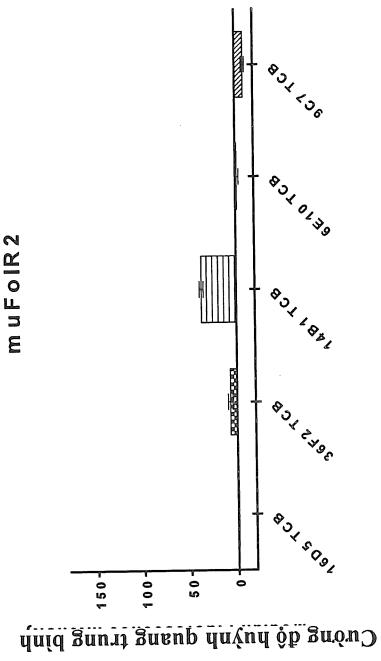


Fig. 35D

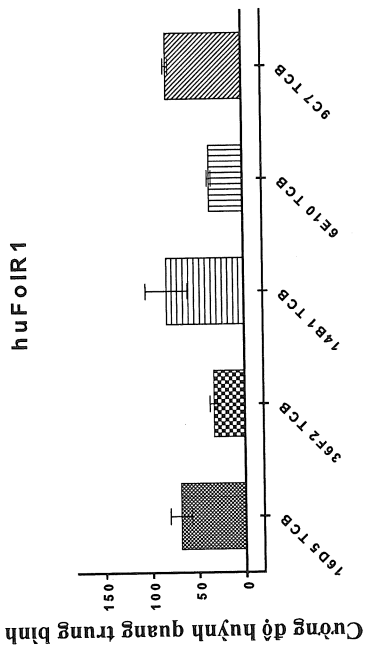


Fig. 35A

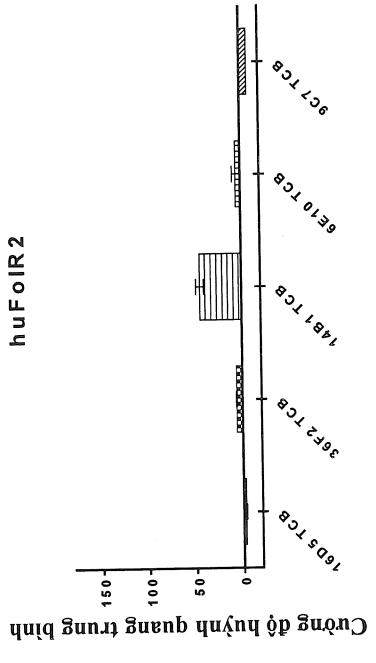


Fig. 35C

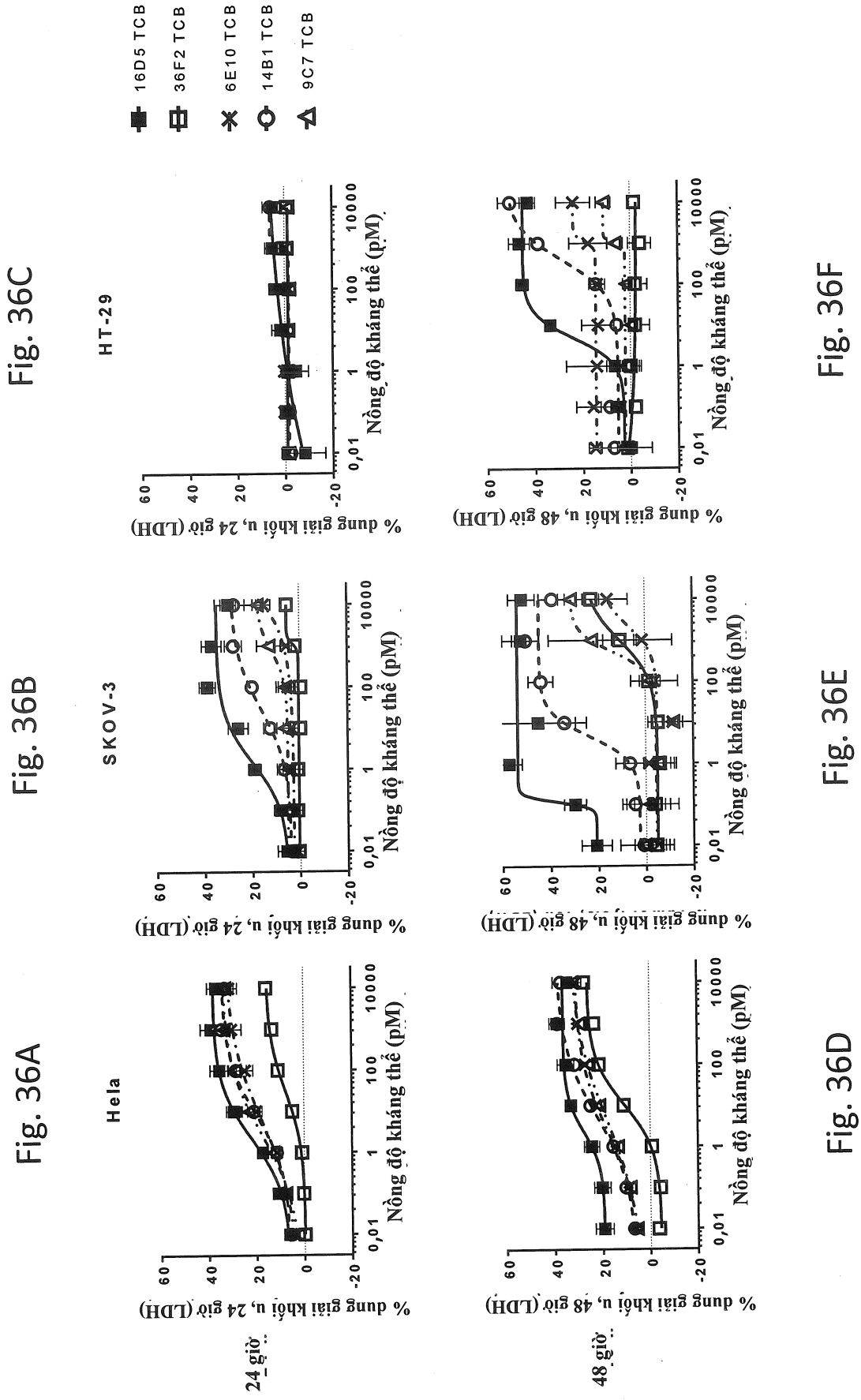
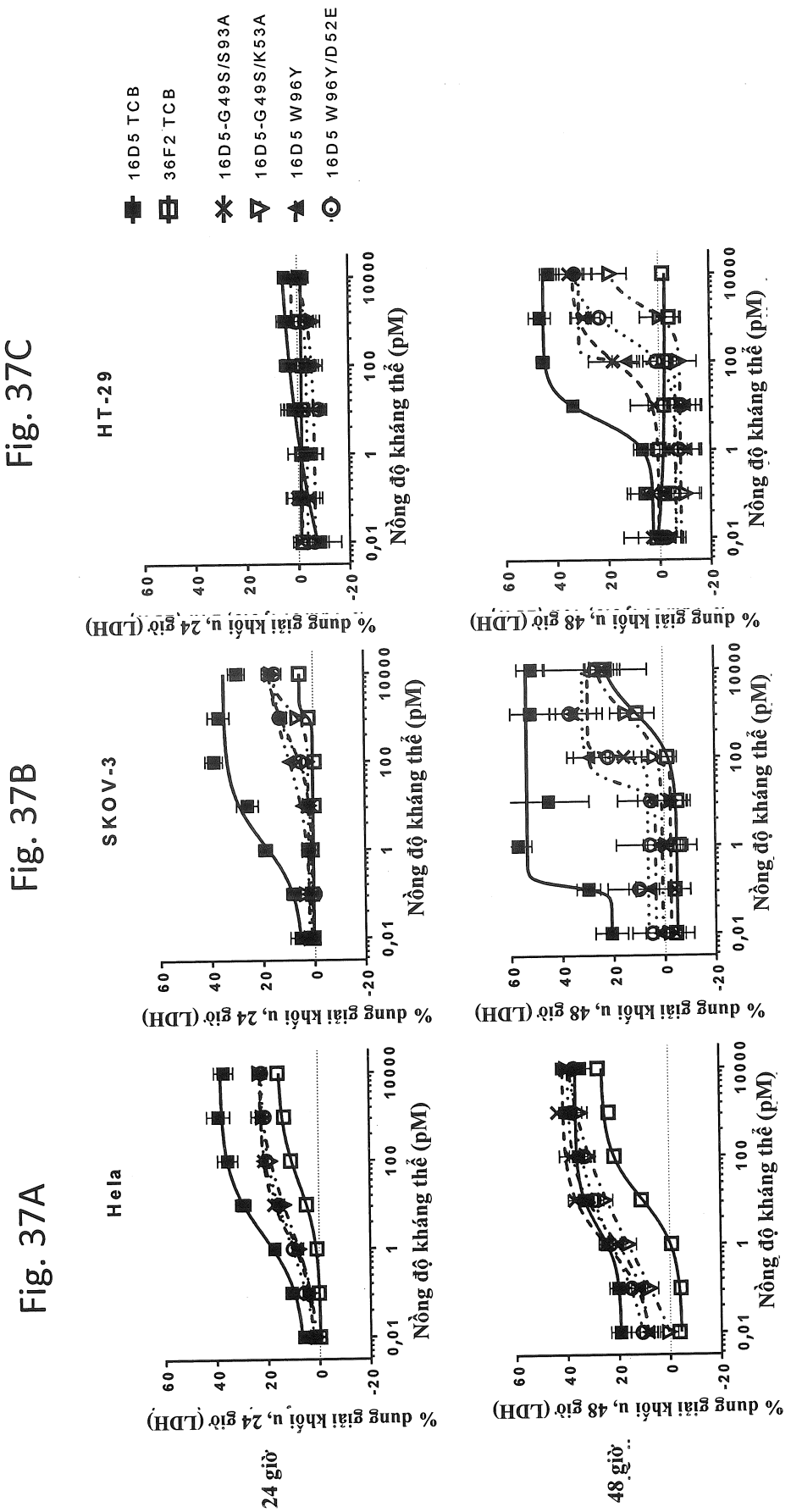


Fig. 36A Fig. 36B Fig. 36C

Fig. 36D Fig. 36E Fig. 36F


Fig. 37A
Fig. 37B
Fig. 37C
Fig. 37D
Fig. 37E
Fig. 37F
Hela
SKOV-3
HT-29
24 giờ
48 giờ
% dung giải khối u, 24 giờ (LDH)
% dung giải khối u, 48 giờ (LDH)
Nồng độ kháng thể (pM)
16D5 TCB
36F2 TCB
16D5-G49S/S93A
16D5-G49S/K53A
16D5 W96Y
16D5 W96Y/D52E

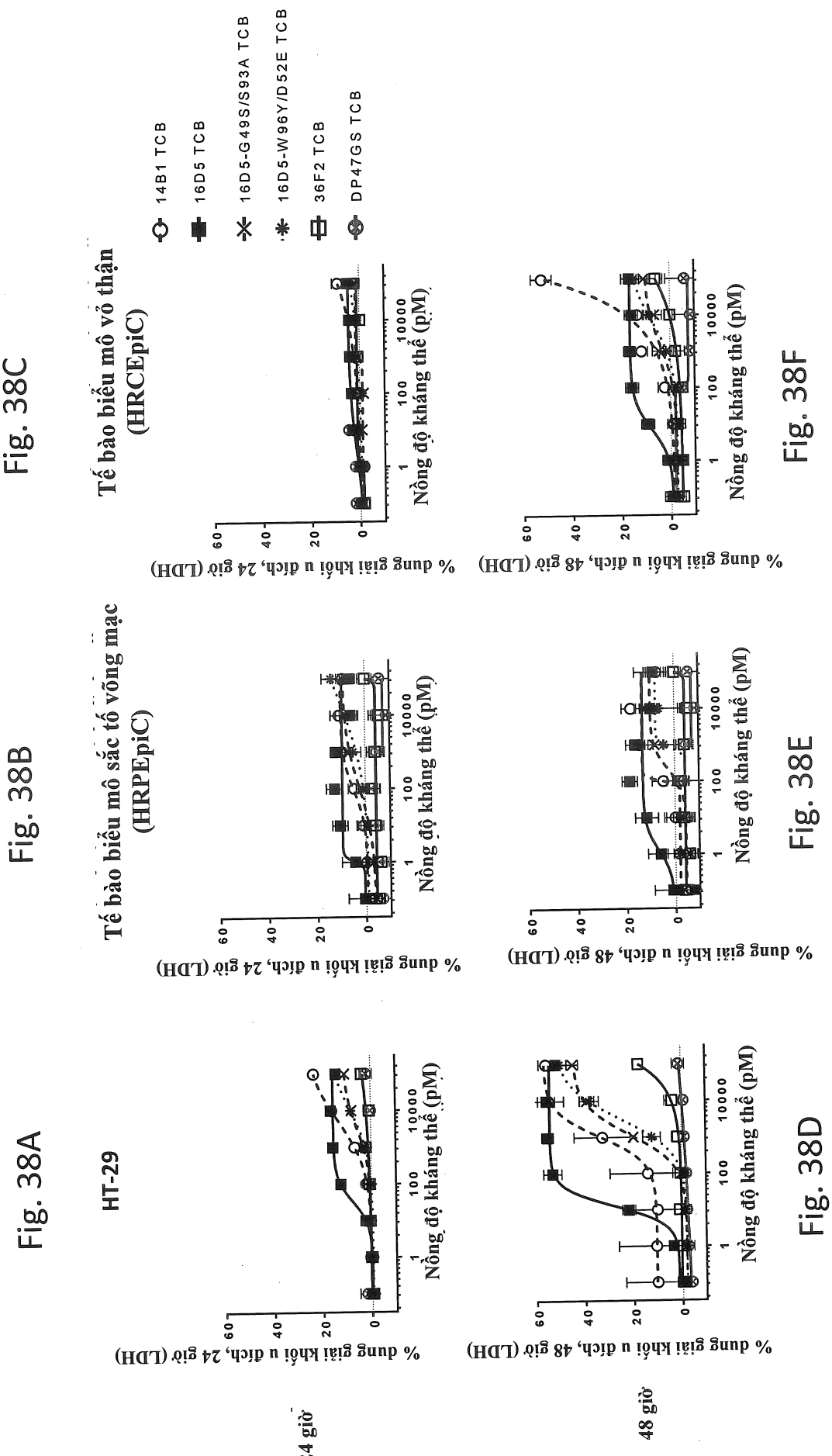

Fig. 38A
HT-29
24 giờ
48 giờ
% dung giải khối u đích, 24 giờ (LDH)
% dung giải khối u đích, 48 giờ (LDH)
Nồng độ kháng thể (pM)
Fig. 38D
Fig. 38B
Tế bào biểu mô sắc tố võng mạc (HRPEpiC)
Fig. 38E
Fig. 38C
Tế bào biểu mô vỏ thận (HRCEpiC)
14B1 TCB
16D5 TCB
16D5-G49S/S93A TCB
16D5-W96Y/D52E TCB
36F2 TCB
DP47GS TCB
Fig. 38F

Fig. 39A

Nhóm	Cấu trúc	Chủng chuột nhắt	Khối u	Liều lượng (mg/kg)	Chất gắn kết	Thời gian bán rã (ngày)	Cmax (ug/ml)
A	FOLR1 TCB (dòng: 16D5 W96Y/D52E)	NOG	không	0,5	16D5 W96Y/D52E	10,6	16
B	FOLR1 TCB (dòng: 16D5 G49S/S93A)	NOG	không	0,5	16D5 G49S/S93A	4,35	11
C	FOLR1 TCB (dòng: 16D5)	NOG	không	0,5	16D5	13,6	10
D	FOLR1 TCB (dòng: 36F2)	NOG	không	0,5	36F2	3,6	9

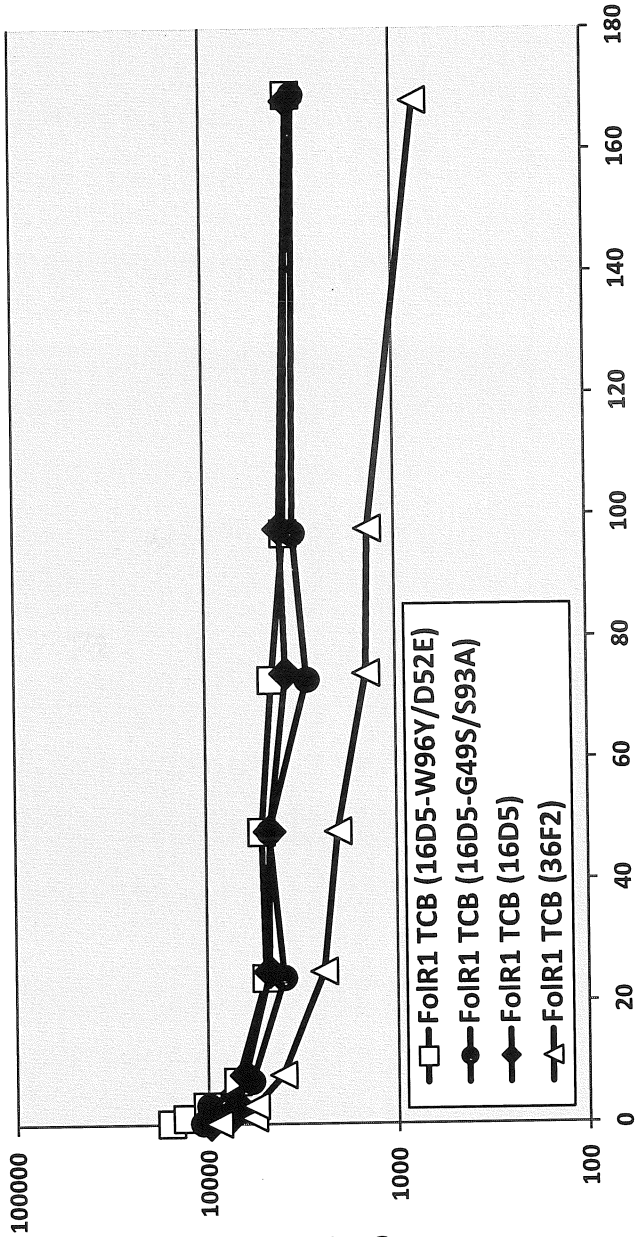


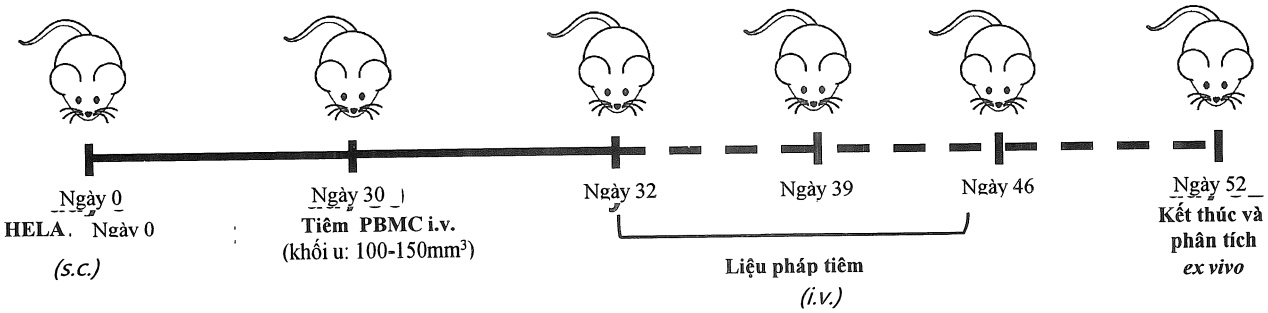
Fig. 39B

Fig. 40A

Nhóm	Cấu trúc	Tiêm PBMC (ngày 30)	Khối u (s.c.)	Bắt đầu điều trị	Liều lượng (mg/kg)	Chế độ
A	Chất dẫn thuốc	$10x10^6$	HELA	Ngày 32	--	Một lần một tuần
B	FOLR1 TCB (dòng: 16D5)	$10x10^6$	HELA	Ngày 32	0,5	Một lần một tuần
C	FOLR1 TCB (dòng: 16D5 W96Y/D52E)	$10x10^6$	HELA	Ngày 32	2,5	Một lần một tuần
D	FOLR1 TCB (dòng: 16D5 W96Y/D52E)	$10x10^6$	HELA	Ngày 32	0,5	Một lần một tuần
E	FOLR1 TCB (dòng: 16D5 G49S/S93A)	$10x10^6$	HELA	Ngày 32	2,5	Một lần một tuần
F	FOLR1 TCB (dòng: 16D5 G49S/S93A)	$10x10^6$	HELA	Ngày 32	0,5	Một lần một tuần

S Phương pháp nghiên cứu

Fig. 40B



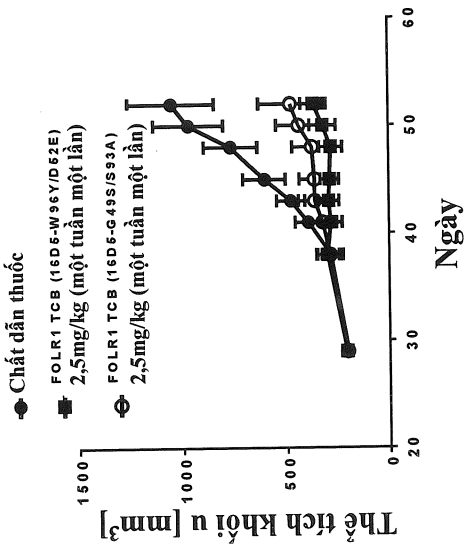


Fig. 40C

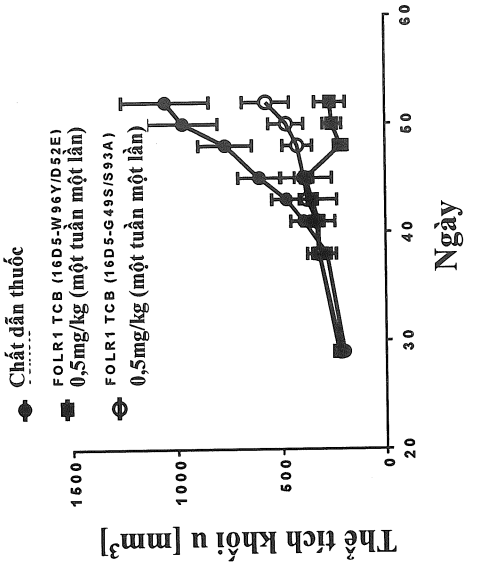


Fig. 40D

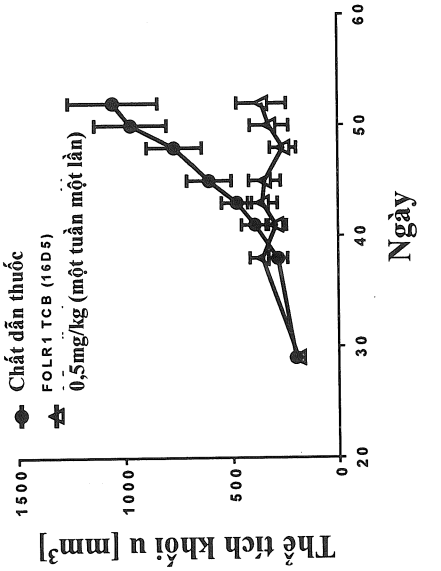


Fig. 40E

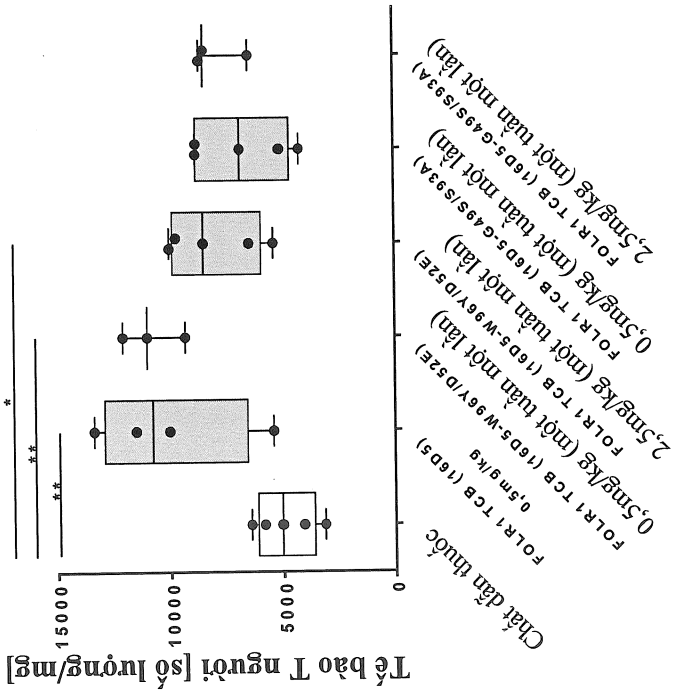


Fig. 40G

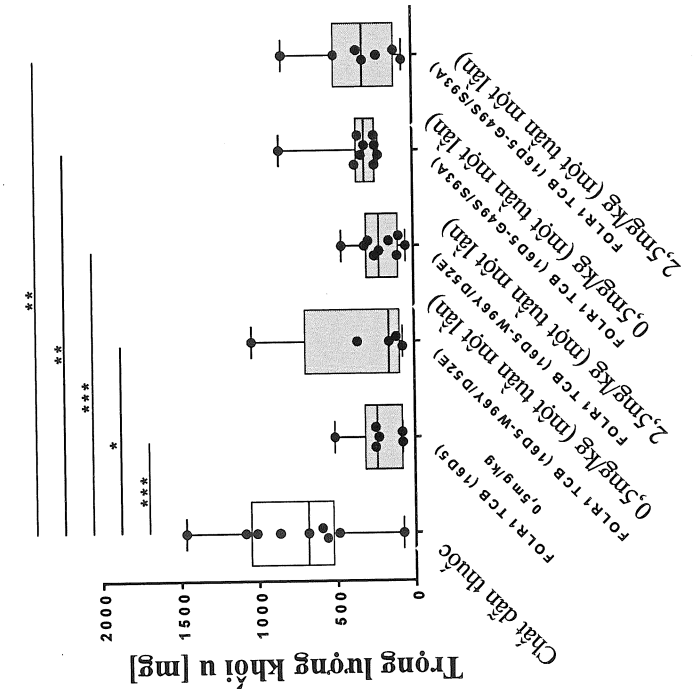


Fig. 40F

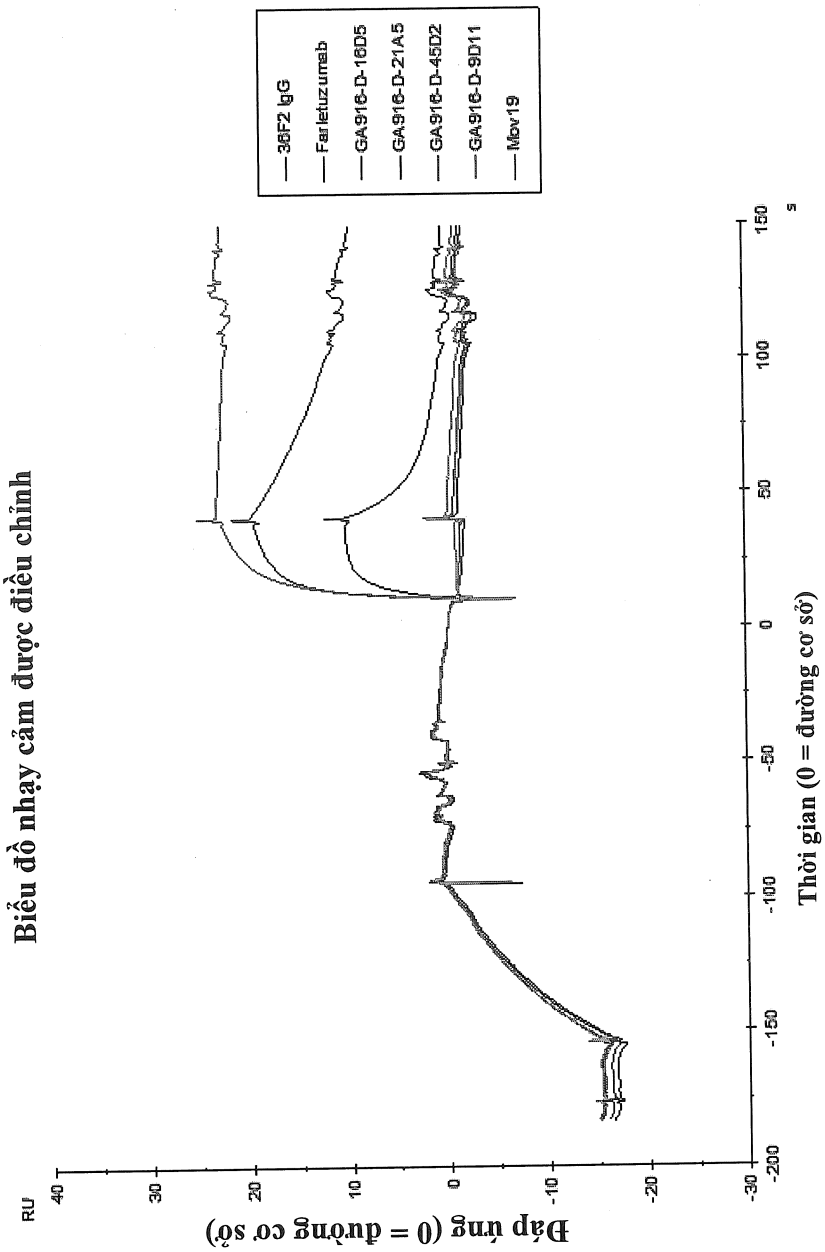

Biểu đồ nhạy cảm được điều chỉnh
Đáp ứng (0 = đường cơ sở)
RU
40
30
20
10
0
-10
-20
-30
-200
-150
-100
-50
0
50
100
150
s
Thời gian (0 = đường cơ sở)
36F2 IgG
Farletuzumab
GA916-D-16D5
GA916-D-21A5
GA916-D-45D2
GA916-D-9D11
Mov19

Fig. 41

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

<120> PHÂN TỬ GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN ĐẶC HIỆU KÉP HOẠT HÓA TẾ BÀO T, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PHÂN TỬ NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

<130> 32186

<140>
<141>

<150> EP14194147.6
<151> 2014-11-20

<160> 316

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 1
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 120
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 2
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Tyr Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 3
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 4
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 5
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 6
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 7
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 8
Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 9
<211> 17

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 9
Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 10
Asn Tyr Tyr Ile Gly Val Val Thr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 11
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 11
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 12
Gly Glu Trp Arg Arg Tyr Thr Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 13
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Trp Ile Arg Trp Glu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 14
Gly Gly Trp Ile Arg Trp Glu His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 5
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 16
Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 17
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 18
Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr
1 5

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 19
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 20
Pro Trp Glu Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ala Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 22
Pro Trp Glu Trp Ala Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 24
Pro Trp Glu Trp Ala Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 25
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 25
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Thr Gly Trp Ser Arg Trp Gly Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 26
Thr Gly Trp Ser Arg Trp Gly Tyr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 27
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 27
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Glu Trp Ile Arg Tyr Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 28
Gly Glu Trp Ile Arg Tyr Tyr His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 29
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 29
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Val Gly Trp Tyr Arg Trp Gly Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 30

Val Gly Trp Tyr Arg Trp Gly Tyr Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 31
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 31
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 32
Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 33
Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 34
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 35
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 35
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 36
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 36
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37
<211> 5

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 37
Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 38
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 38
Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 39
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 39
His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 228
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 40
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys
225

<210> 41
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 41
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 42
Ser Tyr Ala Ile Ser
1   5

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 43
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1   5   10   15

Gly

<210> 44
<211> 12
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 44
Ala Val Phe Tyr Arg Ala Trp Tyr Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 45
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 46
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 47
Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 48
Gln Gln Tyr Thr Ser Pro Pro Pro Thr
1 5

<210> 49
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 49
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 50
Ser Phe Phe Thr Gly Phe His Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 51
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 52
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 53
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 54
Gln Gln Tyr Thr Asn Glu His Tyr Tyr Thr
1 5 10

<210> 55
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 55
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 56
Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

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

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 57
Gly Asp Phe Ala Trp Leu Asp Tyr
1 5

<210> 58
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 58
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

Ser Ile Met Asn Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 59
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 59
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 60
Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 61
Met Gln Ala Ser Ile Met Asn Arg Thr
1 5

<210> 62
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 62
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

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

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

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 63
Met Gln Ala Ser Ile Met Ser Arg Thr
1 5

<210> 64
<211> 112
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 64
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

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

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 65
Met Gln Ala Ser Ile Met Gln Arg Thr
1 5

<210> 66
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 66
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

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

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 67
Met Gln Ala Ser Ile Met Asn Arg Ala
1 5

<210> 68
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 68
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

Ser Ile Met Asn Arg Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 69
Met Gln Ala Ser Ile Met Asn Arg Asn
1 5

<210> 70
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Ser Tyr Ile Asp Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 71
Ser Tyr Ile Asp Met Asp Tyr
1 5

<210> 72
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 72
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 73
Gln Gln Asp Asn Trp Ser Pro Thr
1 5

<210> 74
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 75
Ser Tyr Val Asp Met Asp Tyr
1 5

<210> 76
<211> 107

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 76
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ile Trp Ser Pro
85 90 95

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

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 77
Gln Gln Asp Ile Trp Ser Pro Thr
1 5

<210> 78
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 78
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Lys Asp Ser Ser Tyr Val Glu Trp Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 79
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 79
Ser Tyr Ala Met Ser
1   5

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 80
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1   5   10   15

Gly

<210> 81
<211> 12
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 81
Asp Ser Ser Tyr Val Glu Trp Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 82
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 82
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 83
Gln Gln Pro Thr Ser Ser Pro Ile Thr
1 5

<210> 84
<211> 103
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 84
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
100

<210> 85
<211> 103
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 85
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
100

<210> 86
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 86
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 87
<211> 232
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 87
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 88
<211> 105
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 88
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
1 5 10 15

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
20 25 30

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
35 40 45

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
50 55 60

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
65 70 75 80

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
85 90 95

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 89
<211> 689
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 89
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
225                 230                 235                 240

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                245                 250                 255

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg
            260                 265                 270

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys
        275                 280                 285

Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    290                 295                 300

Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
305                 310                 315                 320

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly
                325                 330                 335
```

```
Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            340                 345                 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    370                 375                 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385                 390                 395                 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                405                 410                 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            420                 425                 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        435                 440                 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    450                 455                 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465                 470                 475                 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                485                 490                 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            500                 505                 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        515                 520                 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    530                 535                 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545                 550                 555                 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
                565                 570                 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            580                 585                 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
        595                 600                 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    610                 615                 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625                 630                 635                 640
```

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 90
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 90
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445

Gly Lys
    450


<210> 91
<211> 689
```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 91
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
225 230 235 240

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

```
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp
            260                 265                 270

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
        275                 280                 285

Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
    290                 295                 300

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu
305                 310                 315                 320

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                325                 330                 335

Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            340                 345                 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    370                 375                 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385                 390                 395                 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                405                 410                 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            420                 425                 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        435                 440                 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    450                 455                 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465                 470                 475                 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                485                 490                 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            500                 505                 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        515                 520                 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    530                 535                 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545                 550                 555                 560
```

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
565 570 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
580 585 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
595 600 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 92
<211> 455
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 92
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 93
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 93
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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> 94
<211> 690
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

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

```
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
            180                 185                 190

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                245                 250                 255

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
            260                 265                 270

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
        275                 280                 285

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
    290                 295                 300

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
305                 310                 315                 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly
                325                 330                 335

Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            340                 345                 350

Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
        355                 360                 365

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
    370                 375                 380

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
385                 390                 395                 400

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
                405                 410                 415

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
            420                 425                 430

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
        435                 440                 445

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp
    450                 455                 460

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
465                 470                 475                 480
```

```
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                485                 490                 495

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            500                 505                 510

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        515                 520                 525

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    530                 535                 540

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
545                 550                 555                 560

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
                565                 570                 575

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            580                 585                 590

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        595                 600                 605

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    610                 615                 620

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
625                 630                 635                 640

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                645                 650                 655

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            660                 665                 670

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        675                 680                 685

Gly Lys
    690


<210> 95
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
      polypeptit tổng hợp"

<400> 95
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 Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270

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

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320
```

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 96
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 96
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

Ser Ile Met Asn Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 97
<211> 648
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<220>
<221> cơ sở cải biến
<222> (603)..(603)
<223> a, c, t, g, không được biết hoặc khác

<400> 97
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatacca acgaacatta ttatacgttc 300

ggccagggga ccaaagtgga aatcaaacgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 360

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 480

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 540

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 600

canggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648

<210> 98
<211> 459
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 98
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
130 135 140

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

```
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
225                 230                 235                 240

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
                245                 250                 255

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

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

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

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

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
                325                 330                 335

Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
            340                 345                 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
        355                 360                 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
    370                 375                 380

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
        435                 440                 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455


<210> 99
<211> 689
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
      polypeptit tổng hợp"

<400> 99
```

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
225                 230                 235                 240

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                245                 250                 255

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg
            260                 265                 270

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys
        275                 280                 285

Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
    290                 295                 300
```

```
Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
305                 310                 315                 320

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly
                325                 330                 335

Asn Phe Gly Ala Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            340                 345                 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        355                 360                 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    370                 375                 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385                 390                 395                 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                405                 410                 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            420                 425                 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        435                 440                 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    450                 455                 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465                 470                 475                 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                485                 490                 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            500                 505                 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        515                 520                 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    530                 535                 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545                 550                 555                 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
                565                 570                 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            580                 585                 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
        595                 600                 605
```

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 100
<211> 689
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 100
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
245 250 255

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg
260 265 270

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys
275 280 285

Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
290 295 300

Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
305 310 315 320

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly
325 330 335

Asn Phe Gly Asn Ala Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
340 345 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
355 360 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
370 375 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385 390 395 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
405 410 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
420 425 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
435 440 445

```
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    450                 455                 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465                 470                 475                 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                485                 490                 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            500                 505                 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        515                 520                 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    530                 535                 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545                 550                 555                 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
                565                 570                 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            580                 585                 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
        595                 600                 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    610                 615                 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625                 630                 635                 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                645                 650                 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            660                 665                 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        675                 680                 685

Lys
```

<210> 101
<211> 441
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 101

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

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

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

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

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
        275                 280                 285

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
    290                 295                 300
```

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 102
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 102

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
165 170 175

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

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

<210> 103
<211> 231
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 103
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
165 170 175

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
180 185 190

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
195 200 205

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
210 215 220

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230

<210> 104
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 104
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 105
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 106
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
            20                  25                  30

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210> 107
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
      polypeptit tổng hợp"

<400> 107
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 108
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 108
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 109
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 109
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115


<210> 110
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
      polypeptit tổng hợp"

<400> 110
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

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


<210> 111
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
```

polypeptit tổng hợp"

<400> 111
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 112
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 112
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 113
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 113
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 114
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 114
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 115
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 115
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 116
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 116
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 117
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 117
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Ser Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 118
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 118
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Tyr Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 119
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 119
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Tyr Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 120
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 120
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Tyr Thr Ile Val Val Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 121
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 121
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Tyr Phe Ile Gly Ser Val Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 122
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 122
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Leu Thr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115

<210> 123
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 123
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

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

Arg Thr

<210> 124
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 124
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser
115

<210> 125
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 125
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Gly Ser Ser Ser
85 90 95

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

<210> 126
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 126
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

<210> 127
<211> 115
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 127
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

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

Lys Arg Thr
115

<210> 128
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 128
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115

<210> 129
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 129
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

Trp His Ser Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr

<210> 130
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 130
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Thr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115

<210> 131
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 131
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

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

Arg Thr

<210> 132
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 132
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

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

<210> 133
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 133
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

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

<210> 134
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 134
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

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

<210> 135
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 135
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

Ser Ile Met Asn Arg Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 136
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 136
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

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

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

```
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270

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

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

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

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

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

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

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
    370                 375                 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385                 390                 395                 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                405                 410                 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
            420                 425                 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 137
<211> 691
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

```
<400> 137
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

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

```
Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65                  70                  75                  80

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

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
225                 230                 235                 240

Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala
                245                 250                 255

Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
            260                 265                 270

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn
        275                 280                 285

Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile
    290                 295                 300

Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu
305                 310                 315                 320

Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe
                325                 330                 335
```

```
Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            340                 345                 350

Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
        355                 360                 365

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
    370                 375                 380

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
385                 390                 395                 400

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
                405                 410                 415

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
            420                 425                 430

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
        435                 440                 445

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    450                 455                 460

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                485                 490                 495

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            500                 505                 510

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        515                 520                 525

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    530                 535                 540

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
545                 550                 555                 560

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
                565                 570                 575

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            580                 585                 590

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
        595                 600                 605

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    610                 615                 620

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
625                 630                 635                 640
```

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
645 650 655

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
660 665 670

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
675 680 685

Pro Gly Lys
690

<210> 138
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 138
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 139
<211> 257
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 139
Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100 105 110

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

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
245 250 255

Ser

<210> 140
<211> 468
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 140
Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala
1 5 10 15

Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln
20 25 30

Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln
35 40 45

Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His
50 55 60

Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr
65 70 75 80

Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val
85 90 95

Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys
100 105 110

Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys
115 120 125

Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys
130 135 140

Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr
145 150 155 160

Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser
165 170 175

Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro
180 185 190

Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala
195 200 205

Met Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Trp 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 Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile
450 455 460

Glu Trp His Glu
465

<210> 141
<211> 227

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 141
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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> 142
<211> 255

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 142
Met Ala His Leu Met Thr Val Gln Leu Leu Leu Leu Val Met Trp Met
1 5 10 15

Ala Glu Cys Ala Gln Ser Arg Ala Thr Arg Ala Arg Thr Glu Leu Leu
20 25 30

Asn Val Cys Met Asp Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu
35 40 45

Asp Asn Leu His Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Thr Asn Ser Cys Cys
50 55 60

Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Tyr
65 70 75 80

Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Thr Met Thr Ser Glu Cys Lys Arg
85 90 95

His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly
100 105 110

Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu
115 120 125

Asp Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Gln Gln Trp Trp Glu Asp Cys
130 135 140

Gln Ser Ser Phe Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp
145 150 155 160

Ser Ser Gly His Asn Glu Cys Pro Val Gly Ala Ser Cys His Pro Phe
165 170 175

Thr Phe Tyr Phe Pro Thr Ser Ala Ala Leu Cys Glu Glu Ile Trp Ser
180 185 190

His Ser Tyr Lys Leu Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile
195 200 205

Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala
210 215 220

Arg Phe Tyr Ala Glu Ala Met Ser Gly Ala Gly Leu His Gly Thr Trp
225 230 235 240

Pro Leu Leu Cys Ser Leu Ser Leu Val Leu Leu Trp Val Ile Ser
245 250 255

<210> 143
<211> 466
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 143

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
450 455 460

His Glu
465

<210> 144
<211> 257
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 144
Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Thr Ala Arg Ala Arg Thr Glu
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45

```
Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Lys Lys Asn Ala
    50                  55                  60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
                85                  90                  95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
            100                 105                 110

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

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu
    130                 135                 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145                 150                 155                 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Pro Val Gly Ala Ala Cys Gln
                165                 170                 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
            180                 185                 190

Trp Thr Tyr Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
        195                 200                 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
    210                 215                 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225                 230                 235                 240

Ala Trp Pro Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Thr Leu Leu Trp Leu Leu
                245                 250                 255

Ser
```

<210> 145
<211> 468
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 145

```
Arg Thr Ala Arg Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala
1               5                   10                  15
```

```
Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln
            20                  25                  30

Cys Arg Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln
        35                  40                  45

Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His
    50                  55                  60

Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr
65                  70                  75                  80

Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val
                85                  90                  95

Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys
            100                 105                 110

Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys
        115                 120                 125

Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys
    130                 135                 140

Cys Pro Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr
145                 150                 155                 160

Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr Tyr Ser Tyr Lys Val Ser
                165                 170                 175

Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro
            180                 185                 190

Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala
        195                 200                 205

Met Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Trp 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 Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile
450 455 460

Glu Trp His Glu
465

<210> 146
<211> 255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 146
Met Val Trp Lys Trp Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Val Cys Val Ala
1 5 10 15

Thr Met Cys Ser Ala Gln Asp Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met
20 25 30

Asp Ala Lys His His Lys Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His
35 40 45

Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr
50 55 60

Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp
65 70 75 80

Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln
85 90 95

Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln
100 105 110

Gln Val Asn Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu
115 120 125

Cys Lys Glu Asp Cys Gln Arg Trp Trp Glu Asp Cys His Thr Ser His
130 135 140

Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Arg Gly Trp Asp Trp Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

Asn Lys Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Thr Phe Glu Ser Tyr Phe
165 170 175

Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Tyr Lys
180 185 190

Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe
195 200 205

Asp Ser Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
210 215 220

Ala Ala Met His Val Asn Ala Gly Glu Met Leu His Gly Thr Gly Gly
225 230 235 240

Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Gln Leu Trp Leu Leu Gly
245 250 255

<210> 147
<211> 472
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 147
Thr Met Cys Ser Ala Gln Asp Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met
1 5 10 15

Asp Ala Lys His His Lys Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His
20 25 30

Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr
35 40 45

Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp
50 55 60

Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln
65 70 75 80

Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln
85 90 95

```
Gln Val Asn Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu
            100                 105                 110

Cys Lys Glu Asp Cys Gln Arg Trp Trp Glu Asp Cys His Thr Ser His
        115                 120                 125

Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Arg Gly Trp Asp Trp Thr Ser Gly Val
    130                 135                 140

Asn Lys Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Thr Phe Glu Ser Tyr Phe
145                 150                 155                 160

Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Tyr Lys
                165                 170                 175

Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe
            180                 185                 190

Asp Ser Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
        195                 200                 205

Ala Ala Met His Val Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu
450 455 460

Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
465 470

<210> 148
<211> 243
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 148
Met Ala Trp Gln Met Met Gln Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val Thr Ala
1 5 10 15

Ala Gly Ser Ala Gln Pro Arg Ser Ala Arg Ala Arg Thr Asp Leu Leu
20 25 30

Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Thr Gln Pro Ser Pro Glu
35 40 45

Asp Glu Leu Tyr Gly Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys
50 55 60

Thr Ala Ser Thr Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr
65 70 75 80

Asn Phe Asn Trp Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Thr Cys Lys Arg
85 90 95

His Phe Ile Gln Asp Ser Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly
100 105 110

Pro Trp Ile Arg Gln Val Asn Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu
115 120 125

Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu Asp Cys
130 135 140

Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp
145 150 155 160

Thr Ser Gly Ile Asn Glu Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Ser Thr Phe
165 170 175

Glu Ser Tyr Phe Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser
180 185 190

His Ser Phe Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile
195 200 205

Gln Met Trp Phe Asp Ser Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala
210 215 220

Lys Phe Tyr Ala Ala Ala Met Asn Ala Gly Ala Pro Ser Arg Gly Ile
225 230 235 240

Ile Asp Ser

<210> 149
<211> 479
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 149
Ser Ala Arg Ala Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys
1 5 10 15

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

Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr Ser Gln Glu
35 40 45

Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp Asp His Cys
50 55 60

Gly Lys Met Glu Pro Thr Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Ser Cys
65 70 75 80

Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Arg Gln Val Asn
85 90 95

Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu
100 105 110

Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys
115 120 125

Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Ile Asn Glu Cys
130 135 140

Pro Ala Gly Ala Leu Cys Ser Thr Phe Glu Ser Tyr Phe Pro Thr Pro
145 150 155 160

Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Phe Lys Val Ser Asn
165 170 175

```
Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Ser Ala
            180                 185                 190

Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Lys Phe Tyr Ala Ala Ala Met
        195                 200                 205

Asn Ala Gly Ala Pro Ser Arg Gly Ile Ile Asp Ser Val Asp Glu Gln
    210                 215                 220

Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr
225                 230                 235                 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
                245                 250                 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
            260                 265                 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
        275                 280                 285

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
    290                 295                 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
305                 310                 315                 320

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
                325                 330                 335

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
            340                 345                 350

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
        355                 360                 365

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
    370                 375                 380

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


Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
                405                 410                 415

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
        435                 440                 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly
    450                 455                 460

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
465                 470                 475
```

<210> 150
<211> 207
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150
Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 151
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 151
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacgctggtg ttactccgtt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 152
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 152
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacatcggtg ttgttacttt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 153
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 153
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacactggtg gttcttctgc tttcgactat tggggtcaag gcaccctcgt aacggtttct 360

tct 363

<210> 154
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<220>
<221> cơ sở cải biến
<222> (47)..(47)
<223> a, c, t, g, không được biết hoặc khác

<400> 154
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgnttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgaa 300

tggcgtcgtt acacttcttt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 155
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 155
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtggt 300

tggatccgtt gggaacattt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 156
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 156
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacctgttct ctacttcttt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 157
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 157
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgag gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacatcggta tcgttccgtt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 158
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 158
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 159
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<220>
<221> cơ sở cải biến
<222> (53)..(53)
<223> a, c, t, g, không được biết hoặc khác

<400> 159
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc ccngcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaacc gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttactt cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 160
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:

polynucleotit tổng hợp"

<400> 160
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

tacgttggtg tttctccgtt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 161
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<220>
<221> cơ sở cải biến
<222> (47)..(47)
<223> a, c, t, g, không được biết hoặc khác

<220>
<221> cơ sở cải biến
<222> (177)..(177)
<223> a, c, t, g, không được biết hoặc khác

<400> 161
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgnttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcntac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaacttc 300

actgttctgc gtgttccgtt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 162
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 162
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat gggcttggtt cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 163
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 163
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaacc gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccttgggaat gggcttactt cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 164
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 164
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcactggt 300

tggtctcgtt ggggttacat ggactattgg ggccaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 165
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 165
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgaa 300

tggatccgtt actaccattt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 166
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 166
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcgttggt 300

tggtaccgtt ggggttacat ggactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

<210> 167
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 167
caggtgcaat tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtaaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagagctgtt 300

ttctaccgtg cttggtactc tttcgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360

tca 363

<210> 168
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 168
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60

atcacttgcc gtgccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180

cgtttcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240

gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataccagcc caccaccaac gtttggccag 300

ggcaccaaag tcgagatcaa g 321

<210> 169
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 169
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccatgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgctctttc 300

ttcactggtt tccatctgga ctattggggt caaggcaccc tcgtaacggt ttcttct 357

<210> 170
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 170
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatacca acgaacatta ttatacgttc 300

ggccagggga ccaaagtgga aatcaaa 327

<210> 171
<211> 351
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 171
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggccc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

ttcgcttggc tggactattg gggtcaaggc accctcgtaa cggtttcttc t 351

<210> 172
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 172
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcaag cattatgaac 300

cggacttttg gtcaaggcac caaggtcgaa attaaa 336

<210> 173
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 173
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcaag cattatgagc 300

cggacttttg gtcaaggcac caaggtcgaa attaaa 336

<210> 174

<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 174
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcaag cattatgcag 300

cggacttttg gtcaaggcac caaggtcgaa attaaa 336

<210> 175
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 175
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcaag cattatgaac 300

cgggcttttg gtcaaggcac caaggtcgaa attaaa 336

<210> 176
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 176
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcaag cattatgaac 300

cggaattttg gtcaaggcac caaggtcgaa attaaa 336

<210> 177
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 177
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgctcttac 300

atcgacatgg actattgggg tcaaggcacc ctcgtaacgg tttcttct 348

<210> 178
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 178
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caggataact ggagcccaac gttcggccag 300

gggaccaaag tggaaatcaa a 321

<210> 179
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 179
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgctcttac 300

gttgacatgg actattgggg tcaaggcacc ctcgtaacgg tttcttct 348

<210> 180
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 180
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctacc tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caggatattt ggagcccaac gttcggccag 300

gggaccaaag tggaaatcaa a 321

<210> 181
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 181
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagactct 300

tcttacgttg aatggtacgc tttcgactac tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360

agt 363

<210> 182
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 182
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gactccactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagccaacca gcagcccaat tacgttcggc 300

caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 183
<211> 684
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 183

gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt caagcgctag taccaagggc cccagcgtgt tcccccctggc acccagcagc 420

aagagcacat ctggcggaac agccgctctg ggctgtctgg tgaaagacta cttccccgag 480

cccgtgaccg tgtcttggaa ctctggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac ctttccagcc 540

gtgctgcaga gcagcggcct gtactccctg tcctccgtgg tcaccgtgcc ctctagctcc 600

ctgggaacac agacatatat ctgtaatgtc aatcacaagc cttccaacac caaagtcgat 660

aagaaagtcg agcccaagag ctgc 684

<210> 184
<211> 696
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 184
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt caagcgctag tgtggccgct ccctccgtgt ttatctttcc cccatccgat 420

gaacagctga aaagcggcac cgcctccgtc gtgtgtctgc tgaacaattt ttaccctagg 480

gaagctaaag tgcagtggaa agtggataac gcactgcagt ccggcaactc ccaggaatct 540

gtgacagaac aggactccaa ggacagcacc tactccctgt cctccaccct gacactgtct 600

aaggctgatt atgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 660

tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgt 696

<210> 185
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
đoạn mồi tổng hợp"

<400> 185
gcaggcaagc attatgcagc ggacttttgg tcaagg 36

<210> 186
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
đoạn mồi tổng hợp"

<400> 186
caggcaagca ttatgagccg gacttttggt caagg 35

<210> 187
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
đoạn mồi tổng hợp"

<400> 187
cattatgaac cgggcttttg gtcaaggcac caaggtc 37

<210> 188
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
đoạn mồi tổng hợp"

<400> 188

cattatgaac cggaattttg gtcaaggcac caaggtc 37

<210> 189
<211> 2067
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 189
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacactttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720

tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840

tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900

aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960

agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcaac 1020

agctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 190
<211> 1350
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 190
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 191
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 191
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtcctaggt caacccaagg ctgcccccag cgtgaccctg 360

ttcccccca gcagcgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatcagc 420

gacttctacc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggccg acagcagccc cgtgaaggcc 480

ggcgtggaga ccaccacccc cagcaagcag agcaacaaca agtacgccgc cagcagctac 540

ctgagcctga cccccgagca gtggaagagc cacaggtcct acagctgcca ggtgacccac 600

gagggcagca ccgtggagaa aaccgtggcc cccaccgagt gcagc 645

<210> 192
<211> 2067
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 192
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt catctgctag cacaaagggc cctagcgtgt tccctctggc ccccagcagc 420

aagagcacaa gcggcggaac agccgccctg ggctgcctcg tgaaggacta cttccccgag 480

cccgtgacag tgtcttggaa cagcggagcc ctgacaagcg gcgtgcacac cttccctgcc 540

gtgctgcaga gcagcggcct gtactccctg agcagcgtgg tcaccgtgcc tagcagcagc 600

ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aaccacaagc ccagcaacac caaagtggac 660

aagaaggtgg agcccaagag ctgtgatggc ggaggagggt ccggaggcgg aggatccgag 720

gtgcaattgg ttgaatctgg tggtggtctg gtaaaaccgg gcggttccct gcgtctgagc 780

tgcgcggctt ccggattcac cttctccaac gcgtggatga gctgggttcg ccaggccccg 840

ggcaaaggcc tcgagtgggt tggtcgtatc aagtctaaaa ctgacggtgg caccacggat 900

tacgcggctc cagttaaagg tcgttttacc atttcccgcg acgatagcaa aaacactctg 960

tatctgcaga tgaactctct gaaaactgaa gacaccgcag tctactactg tactaccccg 1020

tgggaatggt cttggtacga ttattggggc cagggcacgc tggttacggt gtctagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc aggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 193
<211> 1365
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 193
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt catctgctag caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 420

aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480

ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540

gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600

ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660

aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct 720

gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg 780

atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840

gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960

tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc 1020

gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080

ccatgccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc 1140

tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200

accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1260

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaa 1365

<210> 194
<211> 681
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 194
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg 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 cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 420

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgcttcac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 195
<211> 2070
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 195
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggccc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

ttcgcttggc tggactattg gggtcaaggc accctcgtaa cggtttcttc tgctagcaca 360

aagggcccca gcgtgttccc tctggccct agcagcaaga gcacatctgg cggaacagcc 420

gccctgggct gcctcgtgaa ggactacttt cccgagcctg tgaccgtgtc ctggaactct 480

ggcgccctga caagcggcgt gcacaccttt ccagccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 540

tctctgagca gcgtggtcac cgtgcctagc agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaaa gtggacaaga aggtggagcc caagagctgt 660

gatggcggag gagggtccgg aggcggagga tccgaggtgc agctgctgga atctggcggc 720

ggactggtgc agcctggcgg atctctgaga ctgagctgtg ccgccagcgg cttcaccttc 780

agcacctacg ccatgaactg ggtgcgccag gcccctggca aaggcctgga atgggtgtcc 840

cggatcagaa gcaagtacaa caactacgcc acctactacg ccgacagcgt gaagggccgg 900

ttcaccatca gccgggacga cagcaagaac accctgtacc tgcagatgaa cagcctgcgg 960

gccgaggaca ccgccgtgta ctattgtgtg cggcacggca acttcggcaa cagctatgtg 1020

tcttggtttg cctactgggg ccagggcacc ctcgtgaccg tgtcaagcgc tagtgtggcc 1080

gctccctccg tgtttatctt tcccccatcc gatgaacagc tgaaaagcgg caccgcctcc 1140

gtcgtgtgtc tgctgaacaa tttttaccct agggaagcta aagtgcagtg gaaagtggat 1200

aacgcactgc agtccggcaa ctcccaggaa tctgtgacag aacaggactc caaggacagc 1260

acctactccc tgtcctccac cctgacactg tctaaggctg attatgagaa acacaaagtc 1320

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 1380

ggagagtgtg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccctgaagc tgctggcggc 1440

ccttctgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 1500

gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 1560

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 1620

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1680

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1740

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1800

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1860

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1920

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1980

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 2040

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2070

<210> 196
<211> 1341
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 196
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggccc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

ttcgcttggc tggactattg gggtcaaggc accctcgtaa cggtttcttc tgctagcacc 360

aagggcccct ccgtgttccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc 420

gctctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc 480

ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat 540

agcctgagca gcgtggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 197
<211> 657
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 197
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcaag cattatgaac 300

cggacttttg gtcaaggcac caaggtcgaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 198
<211> 642
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 198
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360

cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420

aaggattatt ttcctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480

gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540

acagtgccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600

agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

<210> 199
<211> 1377
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 199
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt catctgctag cgtggccgct ccctccgtgt ttatctttcc cccatccgat 420

gaacagctga aaagcggcac cgcctccgtc gtgtgtctgc tgaacaattt ttaccctagg 480

gaagctaaag tgcagtggaa agtggataac gcactgcagt ccggcaactc ccaggaatct 540

gtgacagaac aggactccaa ggacagcacc tactccctgt cctccaccct gacactgtct 600

aaggctgatt atgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 660

tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgtgaca agacccacac ctgtcccccc 720

tgtcctgccc ctgaagctgc tggcggccct tctgtgttcc tgttcccccc aaagcccaag 780

gacaccctga tgatcagccg gacccccgaa gtgacctgcg tggtggtgga tgtgtcccac 840

gaggaccctg aagtgaagtt caattggtac gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag 900

acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 960

ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1020

ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1080

tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg 1140

gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1200

aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1260

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1320

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1377

<210> 200
<211> 2067
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:

polynucleotit tổng hợp"

<400> 200
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacactttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720

tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840

tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900

aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960

agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcgcc 1020

agctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc aggggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 201
<211> 2067
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 201
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacactttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720

tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840

tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900

aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960

agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcaac 1020

gcctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc aggggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 202
<211> 1323
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 202
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgctagca ccaagggccc atcggtcttc 360

cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc 420

aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc 480

gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg 540

accgtgccct ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 600

agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc 660

ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 720

cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 780

agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat 840

gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 900

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 960

gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1020

caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc 1080

tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1140

ccggagaaca actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1200

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc 1260

gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt 1320

aaa 1323

<210> 203
<211> 681
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 203
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcgtgg ccgctccctc cgtgttcatc ttcccacctt ccgacgagca gctgaagtcc 420

ggcaccgctt ctgtcgtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag 480

tggaaggtgg acaacgccct gcagtccggc aacagccagg aatccgtgac cgagcaggac 540

tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc accctgaccc tgtccaaggc cgactacgag 600

aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc caccagggcc tgtctagccc cgtgaccaag 660

tctttcaacc ggggcgagtg c 681

<210> 204
<211> 693
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 204
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggagga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt caccttctcc acctacgcca tgaactgggt gcgacaggct 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtgtcccgg atcagatcca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg actccgtgaa gggccggttc accatctctc gggacgactc caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaactc cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaactc ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt catctgctag ccccaaggct gcccccagcg tgaccctgtt tcccccccagc 420

agcgaggaac tgcaggccaa caaggccacc ctggtctgcc tgatcagcga cttctaccca 480

ggcgccgtga ccgtggcctg gaaggccgac agcagccccg tgaaggccgg cgtggagacc 540

accacccccca gcaagcagag caacaacaag tacgccgcca gcagctacct gagcctgacc 600

cccgagcagt ggaagagcca caggtcctac agctgccagg tgacccacga gggcagcacc 660

gtggagaaaa ccgtggcccc caccgagtgc agc 693

<210> 205
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 205
cagaccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcagcag 120

aagccaggcc aggctcccag aggactgatc ggcggcacca acgccagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgtg 240

cagcctgaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtccta 327

<210> 206
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 206
cagaccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcagcag 120

aagccaggcc aggctcccag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgtg 240

cagcctgaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acgccaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtccta 327

<210> 207
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:

polynucleotit tổng hợp"

<400> 207
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgatgg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctgggagt ggtcttggta cgactattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcctct 360

gctagc 366

<210> 208
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 208
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgtcccgg atcaagagca agaccgatgg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctgggagt ggtcttggta cgactattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcctct 360

gctagc 366

<210> 209
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 209
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggatct atcaagagca agaccgacgg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctgggagt ggtcttggta cgactattgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcctct 360

gctagc 366

<210> 210
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 210
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgatgg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctacgagt ggtcttggta cgactactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcatct 360

gctagc 366

<210> 211
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 211
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgatgg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctgggagt actcttggta cgactactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcatct 360

gctagc 366

<210> 212
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 212
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

actatcgttg tttctccgtt cgactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

gctagc 366

<210> 213
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 213
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcaactac 300

ttcatcggtt ctgttgctat ggactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

gctagc 366

<210> 214
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 214
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtctg 300

acttactcta tggactattg gggtcaaggc accctcgtaa cggtttcttc tgctagc 357

<210> 215
<211> 342
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 215
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcact gcagattcca 300

aacacttttg gtcaaggcac caaggtcgaa attaaacgta cg 342

<210> 216
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 216
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatacgct 300

tacgctctgg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagtgc tagc 354

<210> 217
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 217
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagcatggca gcagcagcac gttcggccag 300

gggaccaaag tggaaatcaa acgtacg 327

<210> 218
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 218
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

ttctctgctg gtcgtctgat ggactattgg ggtcaaggca ccctcgtaac ggtttcttct 360

gctagc 366

<210> 219
<211> 345
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 219
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcact gcagacccca 300

ccaattacct ttggtcaagg caccaaggtc gaaattaaac gtacg 345

<210> 220
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 220
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

tacaacgctt tcgactattg gggtcacggc accctcgtaa cggtttcttc tgctagc 357

<210> 221
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 221
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcatg gcatagccca 300

actttggtc aaggcaccaa ggtcgaaatt aaacgtacg 339

<210> 222
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 222
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgct 300

acttacacta tggactattg gggtcaaggc accctcgtaa cggtttcttc tgctagc 357

<210> 223
<211> 342
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 223
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcact gcagacccca 300

attacttttg gtcaaggcac caaggtcgaa attaaacgta cg 342

<210> 224
<211> 1344
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 224
caggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctcgtgaaac ctggcgcctc cgtgaagatc 60

agctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc ggctacttca tgaactgggt caagcagagc 120

cacggcaaga gcctggaatg gatcggcaga atccaccct acgacggcga caccttctac 180

aaccagaact tcaaggacaa ggccaccctg accgtggaca agagcagcaa caccgcccac 240

atggaactgc tgagcctgac cagcgaggac ttcgccgtgt actactgcac cagatacgac 300

ggcagccggg ccatggatta ttggggccag ggcaccaccg tgacagtgtc cagcgctagc 360

accaagggcc cctccgtgtt ccccctggcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420

gccgctctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480

agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag ttctggcctg 540

tatagcctga gcagcgtggt caccgtgcct tctagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaggtgga gcccaagagc 660

tgcgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtgc accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080

aagaaccagg tcagcctctc gtgcgcagtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ccttcttcct cgtgagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320

agcctctccc tgtctccggg taaa 1344

<210> 225
<211> 2073
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 225
caggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctcgtgaaac ctggcgcctc cgtgaagatc 60

agctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc ggctacttca tgaactgggt caagcagagc 120

cacggcaaga gcctggaatg gatcggcaga atccaccccct acgacggcga caccttctac 180

aaccagaact tcaaggacaa ggccaccctg accgtggaca agagcagcaa caccgcccac 240

atggaactgc tgagcctgac cagcgaggac ttcgccgtgt actactgcac cagatacgac 300

ggcagccggg ccatggatta ttggggccag ggcaccaccg tgacagtgtc cagcgctagc 360

acaaagggcc ccagcgtgtt ccctctggcc cctagcagca agagcacatc tggcggaaca 420

gccgccctgg gctgcctcgt gaaggactac tttcccgagc ctgtgaccgt gtcctggaac 480

tctggcgccc tgacaagcgg cgtgcacacc tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg 540

tactctctga gcagcgtggt caccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaagtggaca agaaggtgga gcccaagagc 660

tgtgatggcg gaggagggtc cggaggcgga ggatccgaag tgcagctggt ggaaagcggc 720

ggaggcctgg tgcagcctaa gggctctctg aagctgagct gtgccgccag cggcttcacc 780

ttcaacacct acgccatgaa ctgggtgcgc caggcccctg gcaaaggcct ggaatgggtg 840

gcccggatca gaagcaagta caacaattac gccacctact acgccgacag cgtgaaggac 900

cggttcacca tcagccggga cgacagccag agcatcctgt acctgcagat gaacaacctg 960

aaaaccgagg acaccgccat gtactactgc gtgcggcacg gcaacttcgg caacagctat 1020

gtgtcttggt ttgcctactg gggccagggc accctcgtga cagtgtctgc tgctagcgtg 1080

gccgctccct ccgtgtttat ctttccccca tccgatgaac agctgaaaag cggcaccgcc 1140

tccgtcgtgt gtctgctgaa caatttttac cctagggaag ctaaagtgca gtggaaagtg 1200

gataacgcac tgcagtccgg caactcccag gaatctgtga cagaacagga ctccaaggac 1260

agcacctact ccctgtcctc caccctgaca ctgtctaagg ctgattatga gaaacacaaa 1320

gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac 1380

aggggagagt gtgacaagac ccacacctgt ccccccttgtc ctgcccctga agctgctggc 1440

ggcccttctg tgttcctgtt cccccccaaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc 1500

cccgaagtga cctgcgtggt ggtggatgtg tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat 1560

tggtacgtgg acggcgtgga agtgcacaac gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 1620

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1680

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1740

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atgccgggat 1800

gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1860

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1920

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1980

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 2040

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 2073

<210> 226
<211> 654
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 226
gacatcgagc tgacccagag ccctgcctct ctggccgtgt ctctgggaca gagagccatc 60

atcagctgca aggccagcca gagcgtgtcc tttgccggca cctctctgat gcactggtat 120

caccagaagc ccggccagca gcccaagctg ctgatctaca gagccagcaa cctggaagcc 180

ggcgtgccca caagattttc cggcagcggc agcaagaccg acttcaccct gaacatccac 240

cccgtggaag aagaggacgc cgccacctac tactgccagc agagcagaga gtaccctac 300

accttcggcg gaggcaccaa gctggaaatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360

atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 227
<211> 209
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 227

Arg	Ile	Ala	Trp	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Leu	Asn	Val	Cys	Met	Asn	Ala
1				5					10					15	

Lys	His	His	Lys	Glu	Lys	Pro	Gly	Pro	Glu	Asp	Lys	Leu	His	Glu	Gln
			20					25					30		

Cys	Arg	Pro	Trp	Arg	Lys	Asn	Ala	Cys	Cys	Ser	Thr	Asn	Thr	Ser	Gln
		35					40					45			

Glu	Ala	His	Lys	Asp	Val	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Phe	Asn	Trp	Asn	His
	50					55					60				

Cys	Gly	Glu	Met	Ala	Pro	Ala	Cys	Lys	Arg	His	Phe	Ile	Gln	Asp	Thr
65					70					75					80

Cys	Leu	Tyr	Glu	Cys	Ser	Pro	Asn	Leu	Gly	Pro	Trp	Ile	Gln	Gln	Val
				85					90					95	

Asp	Gln	Ser	Trp	Arg	Lys	Glu	Arg	Val	Leu	Asn	Val	Pro	Leu	Cys	Lys
			100					105					110		

Glu	Asp	Cys	Glu	Gln	Trp	Trp	Glu	Asp	Cys	Arg	Thr	Ser	Tyr	Thr	Cys
		115					120					125			

Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys
130 135 140

Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr
145 150 155 160

Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser
165 170 175

Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro
180 185 190

Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala
195 200 205

Met

<210> 228
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 228
Thr Met Cys Ser Ala Gln Asp Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met
1 5 10 15

Asp Ala Lys His His Lys Thr Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys Leu His
20 25 30

Asp Gln Cys Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr
35 40 45

Ser Gln Glu Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp
50 55 60

Asp His Cys Gly Lys Met Glu Pro Ala Cys Lys Arg His Phe Ile Gln
65 70 75 80

Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln
85 90 95

Gln Val Asn Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Phe Leu Asp Val Pro Leu
100 105 110

Cys Lys Glu Asp Cys Gln Arg Trp Trp Glu Asp Cys His Thr Ser His
115 120 125

Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Arg Gly Trp Asp Trp Thr Ser Gly Val
130 135 140

Asn Lys Cys Pro Ala Gly Ala Leu Cys Arg Thr Phe Glu Ser Tyr Phe
145 150 155 160

Pro Thr Pro Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Tyr Lys
165 170 175

Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe
180 185 190

Asp Ser Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala
195 200 205

Ala Ala Met His Val Asn
210

<210> 229
<211> 220
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 229
Ser Ala Arg Ala Arg Thr Asp Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys
1 5 10 15

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

Ser Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Thr Ala Ser Thr Ser Gln Glu
35 40 45

Leu His Lys Asp Thr Ser Arg Leu Tyr Asn Phe Asn Trp Asp His Cys
50 55 60

Gly Lys Met Glu Pro Thr Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Ser Cys
65 70 75 80

Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Arg Gln Val Asn

85 90 95

Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu
100 105 110

Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys
115 120 125

Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly Ile Asn Glu Cys
130 135 140

Pro Ala Gly Ala Leu Cys Ser Thr Phe Glu Ser Tyr Phe Pro Thr Pro
145 150 155 160

Ala Ala Leu Cys Glu Gly Leu Trp Ser His Ser Phe Lys Val Ser Asn
165 170 175

Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Ser Ala
180 185 190

Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Lys Phe Tyr Ala Ala Ala Met
195 200 205

Asn Ala Gly Ala Pro Ser Arg Gly Ile Ile Asp Ser
210 215 220

<210> 230
<211> 208
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 230
Thr Arg Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val Cys Met Asp Ala Lys His
1 5 10 15

His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Asn Leu His Asp Gln Cys Ser
20 25 30

Pro Trp Lys Thr Asn Ser Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala
35 40 45

His Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly
50 55 60

Thr Met Thr Ser Glu Cys Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu
65 70 75 80

Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln
85 90 95

Ser Trp Arg Lys Glu Arg Ile Leu Asp Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp
100 105 110

Cys Gln Gln Trp Trp Glu Asp Cys Gln Ser Ser Phe Thr Cys Lys Ser
115 120 125

Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Ser Ser Gly His Asn Glu Cys Pro
130 135 140

Val Gly Ala Ser Cys His Pro Phe Thr Phe Tyr Phe Pro Thr Ser Ala
145 150 155 160

Ala Leu Cys Glu Glu Ile Trp Ser His Ser Tyr Lys Leu Ser Asn Tyr
165 170 175

Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln
180 185 190

Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Glu Ala Met Ser
195 200 205

<210> 231
<211> 213
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 231
Glu Ala Gln Thr Arg Thr Ala Arg Ala Arg Thr Glu Leu Leu Asn Val
1 5 10 15

Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly Pro Glu Asp Lys
20 25 30

Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Lys Lys Asn Ala Cys Cys Ser Thr
35 40 45

Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu Tyr Arg Phe
50 55 60

Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys Lys Arg His Phe
65 70 75 80

Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn Leu Gly Pro Trp
85 90 95

Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg Val Leu Asn Val
100 105 110

Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Arg Trp Trp Glu Asp Cys Arg Thr
115 120 125

Ser Tyr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp Asn Trp Thr Ser Gly
130 135 140

Phe Asn Lys Cys Pro Val Gly Ala Ala Cys Gln Pro Phe His Phe Tyr
145 150 155 160

Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile Trp Thr Tyr Ser Tyr
165 170 175

Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg Cys Ile Gln Met Trp
180 185 190

Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr
195 200 205

Ala Ala Ala Met Ser
210

<210> 232
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 232
Pro Trp Glu Tyr Ser Trp Tyr Asp Tyr
1 5

<210> 233

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

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 233
Asn Tyr Thr Ile Val Val Ser Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 234
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 234
Asn Tyr Phe Ile Gly Ser Val Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 235
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 235
Gly Leu Thr Tyr Ser Met Asp Tyr
1 5

<210> 236
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 236
Met Gln Ala Leu Gln Ile Pro Asn Thr
1 5

<210> 237
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 237
Tyr Ala Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 238
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 238
Gln Gln His Gly Ser Ser Ser Thr
1 5

<210> 239
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 239
Gly Asp Phe Ser Ala Gly Arg Leu Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 240
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 240
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 241
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 241
Gly Asp Tyr Asn Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 242
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 242
Met Gln Ala Trp His Ser Pro Thr
1 5

<210> 243
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 243
Gly Ala Thr Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 244
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 244
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Ile Thr
1 5

<210> 245
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 245
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

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

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 246
<211> 2076
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 246
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccatgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgctctttc 300

ttcactggtt tccatctgga ctattggggt caaggcaccc tcgtaacggt ttcttctgct 360

agcacaaagg gccccagcgt gttccctctg gcccctagca gcaagagcac atctggcgga 420

acagccgccc tgggctgcct cgtgaaggac tactttcccg agcctgtgac cgtgtcctgg 480

aactctggcg ccctgacaag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 540

ctgtactctc tgagcagcgt ggtcaccgtg cctagcagca gcctgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaagtgg acaagaaggt ggagcccaag 660

agctgtgatg gcggaggagg gtccggaggc ggaggatccg aggtgcagct gctggaatct 720

ggcggcggac tggtgcagcc tggcggatct ctgagactga gctgtgccgc cagcggcttc 780

accttcagca cctacgccat gaactgggtg cgccaggccc ctggcaaagg cctggaatgg 840

gtgtcccgga tcagaagcaa gtacaacaac tacgccacct actacgccga cagcgtgaag 900

ggccggttca ccatcagccg ggacgacagc aagaacaccc tgtacctgca gatgaacagc 960

ctgcgggccg aggacaccgc cgtgtactat tgtgtgcggc acggcaactt cggcaacagc 1020

tatgtgtctt ggtttgccta ctggggccag ggcaccctcg tgaccgtgtc aagcgctagt 1080

gtggccgctc cctccgtgtt tatctttccc ccatccgatg aacagctgaa aagcggcacc 1140

gcctccgtcg tgtgtctgct gaacaatttt taccctaggg aagctaaagt gcagtggaaa 1200

gtggataacg cactgcagtc cggcaactcc caggaatctg tgacagaaca ggactccaag 1260

gacagcacct actccctgtc ctccaccctg acactgtcta aggctgatta tgagaaacac 1320

aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc 1380

aacaggggag agtgtgacaa gacccacacc tgtccccctt gtcctgcccc tgaagctgct 1440

ggcggccctt ctgtgttcct gttcccccca aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg 1500

acccccgaag tgacctgcgt ggtggtggat gtgtcccacg aggaccctga agtgaagttc 1560

aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac aacgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 1620

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1680

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc 1740

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg 1800

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1860

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1920

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1980

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 2040

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 2076

<210> 247
<211> 1347
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 247
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccatgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgctctttc 300

ttcactggtt tccatctgga ctattggggt caaggcaccc tcgtaacggt ttcttctgct 360

agcaccaagg gcccctccgt gttccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420

acagccgctc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480

aacagcggag ccctgacctc cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagttctggc 540

ctgtatagcc tgagcagcgt ggtcaccgtg ccttctagca gcctgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggagcccaag 660

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc aggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tgcaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct ctcgtgcgca gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctcgtgagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

<210> 248
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 248
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 249
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 249
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 250
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 250
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 251
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 251
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 252
<211> 689
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:

polypeptit tổng hợp"

<400> 252

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
245 250 255

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg
260 265 270

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys
275 280 285

Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
290 295 300

Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
305 310 315 320

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly
325 330 335

Asn Phe Gly Ala Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
340 345 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
355 360 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
370 375 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385 390 395 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
405 410 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
420 425 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
435 440 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
450 455 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465 470 475 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
485 490 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
500 505 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
515 520 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
530 535 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545 550 555 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
565 570 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
580 585 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
595 600 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 253
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 253
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380
```

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 254
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 254
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

100 105 110

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

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

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

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

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

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

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 255
<211> 689
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 255
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Trp Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
225                 230                 235                 240

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
                245                 250                 255

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg
            260                 265                 270

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys
        275                 280                 285
```

Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
290 295 300

Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
305 310 315 320

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly
325 330 335

Asn Phe Gly Asn Ala Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
340 345 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
355 360 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
370 375 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385 390 395 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
405 410 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
420 425 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
435 440 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
450 455 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465 470 475 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
485 490 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
500 505 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

515 520 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
530 535 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545 550 555 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
565 570 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
580 585 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
595 600 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 256
<211> 690
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 256

```
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 Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly
    210                 215                 220
```

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
245 250 255

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
260 265 270

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
275 280 285

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
290 295 300

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly
325 330 335

Ala Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
340 345 350

Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
355 360 365

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
370 375 380

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
385 390 395 400

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
405 410 415

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
420 425 430

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
435 440 445

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp

```
    450                 455                 460

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
465                 470                 475                 480

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                485                 490                 495

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            500                 505                 510

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        515                 520                 525

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    530                 535                 540

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
545                 550                 555                 560

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
                565                 570                 575

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            580                 585                 590

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        595                 600                 605

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    610                 615                 620

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
625                 630                 635                 640

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                645                 650                 655

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            660                 665                 670

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        675                 680                 685
```

Gly Lys
690

<210> 257
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 257
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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270

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

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

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

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

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

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
```

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 258
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 258
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

Ser Ile Met Gln Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 259
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 259
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 260
<211> 690
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 260
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 Ser Tyr
20 25 30

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

```
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                245                 250                 255

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
            260                 265                 270
```

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn
275 280 285

Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
290 295 300

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
305 310 315 320

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly
325 330 335

Asn Ala Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
340 345 350

Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
355 360 365

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
370 375 380

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
385 390 395 400

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
405 410 415

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
420 425 430

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
435 440 445

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp
450 455 460

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
465 470 475 480

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
485 490 495

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

500 505 510

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
515 520 525

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
530 535 540

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
545 550 555 560

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
565 570 575

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
580 585 590

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
595 600 605

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
610 615 620

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
625 630 635 640

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
645 650 655

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
660 665 670

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
675 680 685

Gly Lys
690

<210> 261
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 261
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgaggg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 262
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 262
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactcaggg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

<210> 263
<211> 375
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 263
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcgccag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt caagc 375

<210> 264
<211> 375
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 264
gaggtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc acctacgcca tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtcccgg atcagaagca agtacaacaa ctacgccacc 180

tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggcc gaggacaccg ccgtgtacta ttgtgtgcgg 300

cacggcaact tcggcaacgc ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcaccctc 360

gtgaccgtgt caagc 375

<210> 265
<211> 2067
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 265
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacactttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720

tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840

tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900

aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960

agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcgcc 1020

agctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc aggggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 266
<211> 1350
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 266
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 267
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 267
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtcctaggt caacccaagg ctgcccccag cgtgaccctg 360

ttcccccccca gcagcgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatcagc 420

gacttctacc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggccg acagcagccc cgtgaaggcc 480

ggcgtggaga ccaccacccc cagcaagcag agcaacaaca agtacgccgc cagcagctac 540

ctgagcctga cccccgagca gtggaagagc cacaggtcct acagctgcca ggtgacccac 600

gagggcagca ccgtggagaa aaccgtggcc cccaccgagt gcagc 645

<210> 268
<211> 2067
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 268
gaggtgcaat tggttgaatc tggtggtggt ctggtaaaac cgggcggttc cctgcgtctg 60

agctgcgcgg cttccggatt caccttctcc aacgcgtgga tgagctgggt tcgccaggcc 120

ccgggcaaag gcctcgagtg ggttggtcgt atcaagtcta aaactgacgg tggcaccacg 180

gattacgcgg ctccagttaa aggtcgtttt accatttccc gcgacgatag caaaaacact 240

ctgtatctgc agatgaactc tctgaaaact gaagacaccg cagtctacta ctgtactacc 300

ccgtgggaat ggtcttggta cgattattgg ggccagggca cgctggttac ggtgtcttcc 360

gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacactttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720

tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840

tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900

aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960

agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcaac 1020

gcctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc aggggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 269
<211> 2070
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 269
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggccc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

ttcgcttggc tggactattg gggtcaaggc accctcgtaa cggtttcttc tgctagcaca 360

aagggcccca gcgtgttccc tctggccct agcagcaaga gcacatctgg cggaacagcc 420

gccctgggct gcctcgtgaa ggactacttt cccgagcctg tgaccgtgtc ctggaactct 480

ggcgccctga caagcggcgt gcacaccttt ccagccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 540

tctctgagca gcgtggtcac cgtgcctagc agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaaa gtggacaaga aggtggagcc caagagctgt 660

gatggcggag gagggtccgg aggcggagga tccgaggtgc agctgctgga atctggcggc 720

ggactggtgc agcctggcgg atctctgaga ctgagctgtg ccgccagcgg cttcaccttc 780

agcacctacg ccatgaactg ggtgcgccag gcccctggca aaggcctgga atgggtgtcc 840

cggatcagaa gcaagtacaa caactacgcc acctactacg ccgacagcgt gaagggccgg 900

ttcaccatca gccgggacga cagcaagaac accctgtacc tgcagatgaa cagcctgcgg 960

gccgaggaca ccgccgtgta ctattgtgtg cggcacggca acttcggcgc cagctatgtg 1020

tcttggtttg cctactgggg ccagggcacc ctcgtgaccg tgtcaagcgc tagtgtggcc 1080

gctccctccg tgtttatctt tcccccatcc gatgaacagc tgaaaagcgg caccgcctcc 1140

gtcgtgtgtc tgctgaacaa tttttaccct agggaagcta aagtgcagtg gaaagtggat 1200

aacgcactgc agtccggcaa ctcccaggaa tctgtgacag aacaggactc caaggacagc 1260

acctactccc tgtcctccac cctgacactg tctaaggctg attatgagaa acacaaagtc 1320

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 1380

ggagagtgtg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccctgaagc tgctggcggc 1440

ccttctgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 1500

gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 1560

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 1620

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1680

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1740

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1800

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1860

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1920

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1980

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 2040

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2070

<210> 270
<211> 1341
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 270
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggccc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

ttcgcttggc tggactattg gggtcaaggc accctcgtaa cggtttcttc tgctagcacc 360

aagggcccct ccgtgttccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc 420

gctctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc 480

ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat 540

agcctgagca gcgtggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 271
<211> 657
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 271
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcaag cattatgcag 300

cggacttttg gtcaaggcac caaggtcgaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 272
<211> 642
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 272
caggccgtcg tgacccagga acccagcctg acagtgtctc ctggcggcac cgtgaccctg 60

acatgtggca gttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgccaactg ggtgcaggaa 120

aagcccggcc aggccttcag aggactgatc ggcggcacca acaagagagc ccctggcacc 180

cctgccagat tcagcggatc tctgctggga ggaaaggccg ccctgacact gtctggcgcc 240

cagccagaag atgaggccga gtactactgc gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

ggcggaggca ccaagctgac agtgctgagc agcgcttcca ccaaaggccc ttccgtgttt 360

cctctggctc ctagctccaa gtccacctct ggaggcaccg ctgctctcgg atgcctcgtg 420

aaggattatt ttcctgagcc tgtgacagtg tcctggaata gcggagcact gacctctgga 480

gtgcatactt tccccgctgt gctgcagtcc tctggactgt acagcctgag cagcgtggtg 540

acagtgccca gcagcagcct gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc 600

agcaacacca aggtggacaa gaaggtggaa cccaagtctt gt 642

<210> 273
<211> 2070
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 273
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggccc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

ttcgcttggc tggactattg gggtcaaggc accctcgtaa cggtttcttc tgctagcaca 360

aagggcccca gcgtgttccc tctggccccc agcagcaaga gcacatctgg cggaacagcc 420

gccctgggct gcctcgtgaa ggactacttt cccgagcctg tgaccgtgtc ctggaactct 480

ggcgccctga caagcggcgt gcacaccttt ccagccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 540

tctctgagca gcgtggtcac cgtgcctagc agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaaa gtggacaaga aggtggagcc caagagctgt 660

gatggcggag gagggtccgg aggcggagga tccgaggtgc agctgctgga atctggcggc 720

ggactggtgc agcctggcgg atctctgaga ctgagctgtg ccgccagcgg cttcaccttc 780

agcacctacg ccatgaactg ggtgcgccag gcccctggca aaggcctgga atgggtgtcc 840

cggatcagaa gcaagtacaa caactacgcc acctactacg ccgacagcgt gaagggccgg 900

ttcaccatca gccgggacga cagcaagaac accctgtacc tgcagatgaa cagcctgcgg 960

gccgaggaca ccgccgtgta ctattgtgtg cggcacggca acttcggcaa cgcctatgtg 1020

tcttggtttg cctactgggg ccagggcacc ctcgtgaccg tgtcaagcgc tagtgtggcc 1080

gctccctccg tgtttatctt tcccccatcc gatgaacagc tgaaaagcgg caccgcctcc 1140

gtcgtgtgtc tgctgaacaa tttttaccct agggaagcta aagtgcagtg gaaagtggat 1200

aacgcactgc agtccggcaa ctcccaggaa tctgtgacag aacaggactc caaggacagc 1260

acctactccc tgtcctccac cctgacactg tctaaggctg attatgagaa acacaaagtc 1320

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 1380

ggagagtgtg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccctgaagc tgctggcggc 1440

ccttctgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 1500

gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 1560

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaacgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 1620

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1680

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1740

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1800

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1860

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1920

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1980

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 2040

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2070

<210> 274
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 274

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

<210> 275

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

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 275
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 276
<211> 689
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 276
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Tyr Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
245 250 255

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg
260 265 270

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys
275 280 285

Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
290 295 300

Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
305 310 315 320

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly
325 330 335

Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

340 345 350

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
355 360 365

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
370 375 380

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
385 390 395 400

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
405 410 415

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
420 425 430

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
435 440 445

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
450 455 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
465 470 475 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
485 490 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
500 505 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
515 520 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
530 535 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545 550 555 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
565 570 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
580 585 590

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
595 600 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

<210> 277
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 277
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Glu Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Thr Pro Tyr Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 278
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 278
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 279
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 279
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Glu Ser Pro Pro Thr Gly
85 90 95

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

<210> 280
<211> 674
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 280
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

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

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

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

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

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

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu
225 230 235 240

Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly
245 250 255

Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
260 265 270

Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
275 280 285

Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
290 295 300

Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
305 310 315 320

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

Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
340 345 350

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
355 360 365

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
385 390 395 400

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
405 410 415

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
420 425 430

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
435 440 445

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
450 455 460

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
465 470 475 480

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
485 490 495

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
500 505 510

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
515 520 525

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
530 535 540

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
545 550 555 560

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
565 570 575

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

580 585 590

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
595 600 605

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
610 615 620

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
625 630 635 640

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
645 650 655

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
660 665 670

Gly Lys

<210> 281
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 281
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Arg Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 282
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 282
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Glu Ser Pro Pro Thr Gly
85 90 95

Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
100 105 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Lys Lys Leu
115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 283
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 283
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 Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Trp Ser Tyr Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 284
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 284
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

Arg Gln Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 285
<211> 673
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 285
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 Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Trp Ser Tyr Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly
210 215 220

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro
225 230 235 240

Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser
245 250 255

Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu
260 265 270

Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg
275 280 285

Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys
290 295 300

Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr
305 310 315 320

Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
325 330 335

Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

340 345 350

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
355 360 365

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
370 375 380

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
385 390 395 400

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
405 410 415

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
420 425 430

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
435 440 445

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
450 455 460

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
465 470 475 480

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
485 490 495

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
500 505 510

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
515 520 525

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
530 535 540

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
545 550 555 560

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
565 570 575

Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
580 585 590

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
595 600 605

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
610 615 620

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
625 630 635 640

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
645 650 655

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
660 665 670

Lys

<210> 286
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 286
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 Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Trp Ser Tyr Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 287
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 287
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgaggg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctacgagt ggtcttggta cgactactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcatct 360

<210> 288
<211> 2067
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 288
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgaggg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctacgagt ggtcttggta cgactactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcatct 360

gctagcacaa agggccctag cgtgttccct ctggccccca gcagcaagag cacaagcggc 420

ggaacagccg ccctgggctg cctcgtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtct 480

tggaacagcg gagccctgac aagcggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagagcagc 540

ggcctgtact ccctgagcag cgtggtcacc gtgcctagca gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaaag tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgtg atggcggagg agggtccgga ggcggaggat ccgaggtgca gctgctggaa 720

tctggcggcg gactggtgca gcctggcgga tctctgagac tgagctgtgc cgccagcggc 780

ttcaccttca gcacctacgc catgaactgg gtgcgccagg cccctggcaa aggcctggaa 840

tgggtgtccc ggatcagaag caagtacaac aactacgcca cctactacgc cgacagcgtg 900

aagggccggt tcaccatcag ccgggacgac agcaagaaca ccctgtacct gcagatgaac 960

agcctgcggg ccgaggacac cgccgtgtac tattgtgtgc ggcacggcaa cttcggcaac 1020

agctatgtgt cttggtttgc ctactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcaagcgct 1080

agtaccaagg gccccagcgt gttccccctg gcacccagca gcaagagcac atctggcgga 1140

acagccgctc tgggctgtct ggtgaaagac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcttgg 1200

aactctggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctttccag ccgtgctgca gagcagcggc 1260

ctgtactccc tgtcctccgt ggtcaccgtg ccctctagct ccctgggaac acagacatat 1320

atctgtaatg tcaatcacaa gccttccaac accaaagtcg ataagaaagt cgagcccaag 1380

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc agggggaccg 1440

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 1500

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1560

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1620

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1680

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1740

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatgccg ggatgagctg 1800

accaagaacc aggtcagcct gtggtgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1860

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1920

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1980

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2040

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 2067

<210> 289
<211> 1350
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 289
gaggtgcaat tggtggaaag cggaggcggc ctcgtgaagc ctggcggatc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc aacgcctgga tgagctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaaag gactcgagtg ggtgggacgg atcaagagca agaccgaggg cggcaccacc 180

gactatgccg cccctgtgaa gggccggttc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcaccacc 300

ccctacgagt ggtcttggta cgactactgg ggccagggca ccctcgtgac cgtgtcatct 360

gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420

ggcacagccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480

tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct 540

ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagccc 660

aagagctgcg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 290
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 290
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtggtgac 300

taccgttacc gttacttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagt 357

<210> 291

<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 291
tcttctgaac tgactcaaga tccagctgtt agcgtggctc tgggtcagac tgtacgtatc 60

acctgccaag gcgattctct gcgctcctac tacgcaagct ggtaccagca gaaaccgggt 120

caggccccag ttctggtgat ttacggcaaa aacaaccgtc cgtctgggat cccggaccgt 180

ttctccggca gctcttccgg taacacggcg agcctcacca tcactggcgc tcaagcagaa 240

gacgaggccg actattactg taactctcgg gaaagcccac caaccggcct ggttgtcttc 300

ggtggcggta ccaagctgac cgtccta 327

<210> 292
<211> 2022
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 292
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtggtgac 300

taccgttacc gttacttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagtgct 360

agcaccaagg gcccctccgt gtttcctctg gccccttcca gcaagtccac ctctggcgga 420

actgccgctc tgggctgcct ggtggaagat tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480

aattctggcg ctctgacctc cggcgtgcac acctttccag ctgtgctgca gtcctccggc 540

ctgtactccc tgtcctccgt cgtgacagtg ccctccagct ctctgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaaccacaa gccctccaac accaaggtgg acgagaaggt ggaacccaag 660

tcctgcgacg gtggcggagg ttccggaggc ggaggatccc aggctgtcgt gacccaggaa 720

ccctccctga cagtgtctcc tggcggcacc gtgaccctga cctgtggatc ttctaccggc 780

gctgtgacca cctccaacta cgccaattgg gtgcaggaaa agcccggcca ggccttcaga 840

ggactgatcg gcggcaccaa caagagagcc cctggcaccc ctgccagatt ctccggttct 900

ctgctgggcg gcaaggctgc cctgactctg tctggtgctc agcctgagga cgaggccgag 960

tactactgcg ccctgtggta ctccaacctg tgggtgttcg gcggaggcac caagctgacc 1020

gtgctgtcca gcgcttccac caagggaccc agtgtgttcc ccctggcccc cagctccaag 1080

tctacatccg gtggcacagc tgccctggga tgtctcgtga aggactactt tcctgagcct 1140

gtgacagtgt cttggaacag cggagccctg accagcggag tgcacacatt ccctgcagtg 1200

ctgcagagca gcggcctgta tagcctgagc agcgtcgtga ccgtgccttc ctctagcctg 1260

ggaacacaga catatatctg taatgtgaat cataagccca gtaataccaa agtggataag 1320

aaagtggaac ctaagagctg cgataagacc cacacctgtc ccccctgccc tgctcctgaa 1380

gctgctggtg gccctagcgt gttcctgttc cccccaaagc ccaaggacac cctgatgatc 1440

tcccggaccc ccgaagtgac ctgcgtggtg gtggatgtgt cccacgagga ccctgaagtg 1500

aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagaccaa gcctagagag 1560

gaacagtaca actccaccta ccgggtggtg tccgtgctga cagtgctgca ccaggactgg 1620

ctgaacggca aagagtacaa gtgcaaggtg tccaacaagg ccctgggcgc tcccatcgaa 1680

aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc cgggaacccc aggtgtacac cctgccccca 1740

tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgtggt gcctggtcaa aggcttctat 1800

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1860

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 1920

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1980

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 2022

<210> 293
<211> 1347
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 293

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgtggtgac 300

taccgttacc gttacttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagtgct 360

agcaccaagg gcccctccgt gttccccctg gcccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420

acagccgctc tgggctgcct ggtcgaggac tacttccccg agcccgtgac cgtgtcctgg 480

aacagcggag ccctgacctc cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagttctggc 540

ctgtatagcc tgagcagcgt ggtcaccgtg ccttctagca gcctgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acgagaaggt ggagcccaag 660

agctgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaagctgc aggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tgcaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct ctcgtgcgca gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctcgtgagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

<210> 294
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 294
tcttctgaac tgactcaaga tccagctgtt agcgtggctc tgggtcagac tgtacgtatc 60

acctgccaag gcgattctct gcgctcctac tacgcaagct ggtaccagca gaaaccgggt 120

caggccccag ttctggtgat ttacggcaaa aacaaccgtc cgtctgggat cccggaccgt 180

ttctccggca gctcttccgg taacacggcg agcctcacca tcactggcgc tcaagcagaa 240

gacgaggccg actattactg taactctcgg gaaagcccac caaccggcct ggttgtcttc 300

ggtggcggta ccaagctgac cgtcctaggt caacccaagg ctgcccccag cgtgaccctg 360

ttcccccca gcagcaagaa actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatcagc 420

gacttctacc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggccg acagcagccc cgtgaaggcc 480

ggcgtggaga ccaccacccc cagcaagcag agcaacaaca agtacgccgc cagcagctac 540

ctgagcctga cccccgagca gtggaagagc cacaggtcct acagctgcca ggtgacccac 600

gagggcagca ccgtggagaa aaccgtggcc cccaccgagt gcagc 645

<210> 295
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 295
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

tggtcttact acatggacta ttggggtcaa ggcaccctcg taacggtttc ttct 354

<210> 296
<211> 333
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 296
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcacg gcagacccca 300

acttttggtc aaggcaccaa ggtcgaaatt aaa 333

<210> 297
<211> 2019
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 297
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

tggtcttact acatggacta ttggggtcaa ggcaccctcg taacggtttc ttctgctagc 360

accaagggcc cctccgtgtt tcctctggcc ccttccagca agtccacctc tggcggaact 420

gccgctctgg gctgcctggt ggaagattac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaat 480

tctggcgctc tgacctccgg cgtgcacacc tttccagctg tgctgcagtc ctccggcctg 540

tactccctgt cctccgtcgt gacagtgccc tccagctctc tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc ctccaacacc aaggtggacg agaaggtgga acccaagtcc 660

tgcgacggtg gcggaggttc cggaggcgga ggatcccagg ctgtcgtgac ccaggaaccc 720

tccctgacag tgtctcctgg cggcaccgtg accctgacct gtggatcttc taccggcgct 780

gtgaccacct ccaactacgc caattgggtg caggaaaagc ccggccaggc cttcagagga 840

ctgatcggcg gcaccaacaa gagagccccc ggcacccctg ccagattctc cggttctctg 900

ctgggcggca aggctgccct gactctgtct ggtgctcagc ctgaggacga ggccgagtac 960

tactgcgccc tgtggtactc caacctgtgg gtgttcggcg gaggcaccaa gctgaccgtg 1020

ctgtccagcg cttccaccaa gggacccagt gtgttccccc tggcccccag ctccaagtct 1080

acatccggtg gcacagctgc cctgggatgt ctcgtgaagg actactttcc tgagcctgtg 1140

acagtgtctt ggaacagcgg agccctgacc agcggagtgc acacattccc tgcagtgctg 1200

cagagcagcg gcctgtatag cctgagcagc gtcgtgaccg tgccttcctc tagcctggga 1260

acacagacat atatctgtaa tgtgaatcat aagcccagta ataccaaagt ggataagaaa 1320

gtggaaccta agagctgcga taagacccac acctgtcccc cctgccctgc tcctgaagct 1380

gctggtggcc ctagcgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacaccct gatgatctcc 1440

cggacccccg aagtgacctg cgtggtggtg gatgtgtccc acgaggaccc tgaagtgaag 1500

ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc tagagaggaa 1560

cagtacaact ccacctaccg ggtggtgtcc gtgctgacag tgctgcacca ggactggctg 1620

aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc aacaaggccc tgggcgctcc catcgaaaag 1680

accatctcca aggccaaggg ccagccccgg gaaccccagg tgtacaccct gcccccatgc 1740

cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgtggtgcc tggtcaaagg cttctatccc 1800

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1860

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1920

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1980

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaa 2019

<210> 298
<211> 1344
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 298
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catccggata caccttcact tcctattaca tgcactgggt tcgtcaagcc 120

ccgggccagg gtctggaatg gatgggcatc attaacccaa gcggtggctc tacctcctac 180

gcgcagaaat tccagggtcg cgtcacgatg acccgtgaca ctagcacctc taccgtttat 240

atggagctgt ccagcctgcg ttctgaagat actgcagtgt actactgtgc acgcggtgac 300

tggtcttact acatggacta ttggggtcaa ggcaccctcg taacggtttc ttctgctagc 360

accaagggcc cctccgtgtt ccccctggcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420

gccgctctgg gctgcctggt cgaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480

agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag ttctggcctg 540

tatagcctga gcagcgtggt caccgtgcct tctagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggacg agaaggtgga gcccaagagc 660

tgcgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca 720

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtgc accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080

aagaaccagg tcagcctctc gtgcgcagtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ccttcttcct cgtgagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320

agcctctccc tgtctccggg taaa 1344

<210> 299
<211> 654
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polynucleotit tổng hợp"

<400> 299
gatattgtta tgactcaatc tccactgtct ctgccggtga ctccaggcga accggcgagc 60

atttcttgcc gttccagcca gtctctgctg cactccaacg gctacaacta tctcgattgg 120

tacctgcaaa aaccgggtca gagccctcag ctgctgatct acctgggctc taaccgcgct 180

tccggtgtac cggaccgttt cagcggctct ggatccggca ccgatttcac gttgaaaatc 240

agccgtgttg aagcagaaga cgtgggcgtt tattactgta tgcaggcacg gcagacccca 300

acttttggtc aaggcaccaa ggtcgaaatt aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360

atcttcccgc catctgatcg gaagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 300
<211> 50
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(50)
<223> /lưu ý="Trình tự này có thể bao gồm 1-10 đơn vị lặp 'Gly Gly Gly Gly Ser', trong đó một số vị trí có thể không có mặt"

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Xem bản mô tả như được nộp để mô tả chi tiết về các biến thể thay thế và các phương án được ưu tiên"

<400> 300
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser
50

<210> 301
<211> 50

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (1)..(50)
<223> /lưu ý="Trình tự này có thể bao gồm 1-10 đơn vị lặp 'Ser Gly Gly Gly Gly', trong đó một số vị trí có thể không có mặt"

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Xem bản mô tả như được nộp để mô tả chi tiết về các biến thể thay thế và các phương án được ưu tiên"

<400> 301
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
35 40 45

Gly Gly
50

<210> 302
<211> 54
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (5)..(54)
<223> /lưu ý="vùng này có thể bao gồm 1-10 đơn vị lặp 'Ser Gly Gly Gly Gly', trong đó một số vị trí có thể không có mặt"

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Xem bản mô tả như được nộp để mô tả chi tiết về

các biến thể thay thế và các phương án được ưu tiên"

<400> 302
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50

<210> 303
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 303
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 304
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 304
Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 305
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:

peptit tổng hợp"

<400> 305
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 306
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
Thẻ Penta-His tổng hợp"

<400> 306
His His His His His
1 5

<210> 307
<211> 104
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 307
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
100

<210> 308
<211> 692
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 308
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 Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr His Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Phe Thr Gly Phe His Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly
210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
245 250 255

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
260 265 270

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
275 280 285

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
305 310 315 320

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
325 330 335

Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
340 345 350

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
355 360 365

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
370 375 380

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
385 390 395 400

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
405 410 415

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
420 425 430

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
435 440 445

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
450 455 460

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
465 470 475 480

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
485 490 495

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
500 505 510

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
515 520 525

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
530 535 540

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
545 550 555 560

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
565 570 575

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
580 585 590

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
595 600 605

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
610 615 620

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
625 630 635 640

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
645 650 655

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
660 665 670

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
675 680 685

Ser Pro Gly Lys
690

<210> 309
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 309
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 Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr His Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Phe Thr Gly Phe His Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 310
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (201)..(201)
<223> axit amin bất kỳ

<400> 310
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Thr Asn Glu His
85 90 95

Tyr Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Xaa Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 311
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 311
Gly Thr Asn Ala Arg Ala Pro
1 5

<210> 312
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 312
Ala Leu Trp Tyr Ala Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 313
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 313
Asn Ala Trp Met His
1 5

<210> 314
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 314
Ser Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 315
<211> 9

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
peptit tổng hợp"

<400> 315
Pro Tyr Glu Trp Ser Trp Tyr Asp Tyr
1 5

<210> 316
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:
polypeptit tổng hợp"

<400> 316
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Ala
85 90 95

Arg Gln Thr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215