



(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)



1-0036940

(51)⁷ C07K 16/46

(13) B

(21) 1-2019-00321

(22) 19/07/2017

(86) PCT/KR2017/007791 19/07/2017

(87) WO 2018/016881 25/01/2018

(30) 10-2016-0091157 19/07/2016 KR

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/04/2019 373A

(73) IBENTRUS, Inc. (KR)

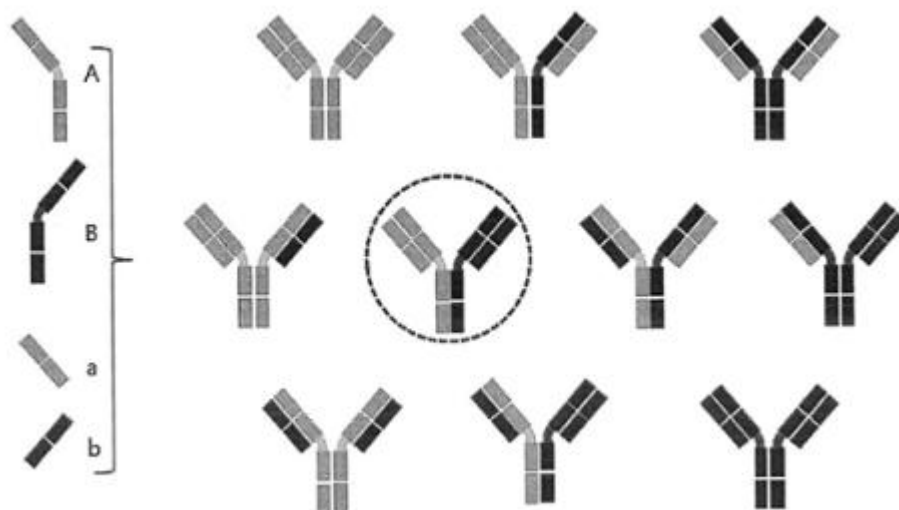
401, 1646, Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon, 34054, Republic of Korea

(72) KIM, Hoon (KR); BAE, Sohyun (KR).

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

(54) PROTEIN ĐẶC HIỆU KÉP VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến protein đặc hiệu kép và phương pháp sản xuất chúng, trong đó đột biến được đưa vào chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ để tăng cường sự dimer hóa dị loại giữa chuỗi nặng (miền CH3 hoặc Fc) và chuỗi nặng (miền CH3 hoặc Fc) và dimer hóa giữa chuỗi nặng (miền CH1) và chuỗi nhẹ, cả hai đều nhắm tới vật liệu tương tự, từ đó tạo cấu trúc protein đặc hiệu kép dị dimer có độ tinh khiết cao. Protein đặc hiệu kép theo sáng chế có thể tìm thấy các ứng dụng trong nhiều lĩnh vực bao gồm trị liệu ung thư, việc quy định đơn thuốc, chẩn đoán, v.v..



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein đặc hiệu kép với tỷ lệ dime hóa dị loại cao và phương pháp sản xuất protein đặc hiệu kép.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng thể đặc hiệu kép (BsAb), là kháng thể có hai paratop có khả năng nhận biết hai loại kháng nguyên đích khác nhau, là thuật ngữ chung để chỉ kháng thể có khả năng liên kết đồng thời với hai kháng nguyên đích khác nhau hoặc để chỉ mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Đặc điểm này cho phép xây dựng chiến lược điều trị mà không khả thi đối với các kháng thể đơn dòng thông thường. Các kháng thể đặc hiệu kép hiếm khi xuất hiện một cách tự nhiên và phần lớn được tạo ra bằng cách nhân tạo để liên kết đồng thời với hai loại đích sinh học khác nhau. Khả năng gắn đích kép có thể tạo ra các BsAb với lĩnh vực áp dụng mới mà chưa được quản lý bởi các kháng thể đơn đặc hiệu (MsAb). Khi kháng thể này được sử dụng cho mục đích điều trị, lợi ích đáng kể bao gồm (1) đảm bảo huy động các tế bào miễn dịch vào gần các tế bào đích, (2) ức chế hoặc hoạt hóa hai con đường truyền tín hiệu riêng biệt cách xa nhau trong các tế bào đích để tạo ra tác dụng hiệp đồng, và (3) phân phối đặc hiệu và có kiểm soát các dược chất, thuốc, độc tố, v.v. vào tế bào đích.

Nhiều kỹ thuật khác nhau liên quan đến BsAb (45 dạng khác nhau) đã được phát triển. Các kỹ thuật này được phân loại thành bốn nhóm theo cấu trúc: thứ nhất, kỹ thuật đặc hiệu kép khác loại các chuỗi nặng bằng nhiều phương pháp khác nhau bao gồm bổ sung cấu trúc, còn được biết là núp-trong-lỗ hoặc đơn giản là KiH, tác dụng lái tĩnh điện, và trộn rối miền CH3 (được gọi là SEEDbody™); thứ hai, nhiều dạng đoạn kháng thể khác nhau như Diabody™ (thể kép: các đoạn kháng thể dime) BiTE™ (BiTE: các chất gắn kết tế bào T đặc hiệu kép), và DART™ (DART: kháng thể đặc hiệu kép gắn đích lại ái lực kép); thứ ba, công nghệ sử dụng một hoặc nhiều miền chức năng kết hợp với kháng thể nguyên vẹn, như Modular Antibody™, Zybody™, dAbs™ (dAb : các kháng thể miền đơn), và DVD-IG™ (DVD-Ig: globulin miễn dịch miền biến đổi kép); và thứ tư, kỹ thuật thu nhận sơ đồ tương tự IgG có độ dài đầy đủ như Duobody™ (trao đổi nhánh Fab), CrossMab™, Azymetric™, và KI body™ đã được phát triển.

Ví dụ, patent Mỹ số 2013-892198 A của Zymeworks mô tả cấu trúc polyme khác loại của các chuỗi globulin miễn dịch có các đột biến trong miền Fc, chỉ ra cụ thể là các kháng thể có cấu trúc polyme khác loại có thể được tạo ra bằng cách biến đổi các gốc xystein tham gia

vào liên kết disulfua thành các axit amin tích điện để gây ra tương tác điện.

Có nhiều vấn đề với các kỹ thuật tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép thông thường như sau.

Thứ nhất, có các tổ hợp chuỗi nặng không mong muốn. Khi các chuỗi nặng (A và B) lần lượt có nguồn gốc từ hai kháng thể gắn đích các epitop khác nhau kết hợp ngẫu nhiên với nhau, hai tổ hợp của các nguồn gốc giống nhau (AA và BB) và một tổ hợp của các nguồn gốc khác nhau (AB hoặc BA) được tạo ra. Các tổ hợp giữa các chuỗi nặng từ cùng một nguồn gốc là các tạp chất không mong muốn trong quá trình tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép, làm giảm độ tinh khiết của các kháng thể đặc hiệu kép và đòi hỏi quá trình loại bỏ các tổ hợp này. Do đó chúng có thể có các tác dụng bất lợi, như gây khó khăn trong việc phân lập và tinh chế kháng thể, gây ra các đáp ứng miễn dịch không mong muốn hoặc truyền tín hiệu gây ra các tác dụng phụ, v.v.. Do đó, tồn tại nhu cầu về quy trình chỉ tạo ra các tổ hợp giữa các chuỗi nặng có nguồn gốc khác loại cho phép không tạo ra hoặc tạo ra ở mức độ bị hạn chế đáng kể các tổ hợp giữa các chuỗi nặng có nguồn gốc cùng loại.

Thứ hai, mặc dù các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có nguồn gốc cùng loại được kết hợp đặc hiệu với nhau, vẫn xảy ra các trường hợp trong đó các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng kết hợp với nhau có nguồn gốc khác loại. Kháng thể đặc hiệu kép gắn đích hai loại epitop khác nhau. Mỗi epitop có thể được nhận biết bởi một kháng thể trong đó chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có cùng nguồn gốc được kết hợp. Các kháng thể được tạo ra bằng các tổ hợp của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có nguồn gốc khác loại có thể nhận biết các epitop mới khác với hai epitop mong muốn, là tạp chất gây khó khăn cho việc phân lập và tinh chế các kháng thể cần quan tâm và gây ra tác dụng phụ. Do đó, việc tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép đòi hỏi các tổ hợp của các cặp chính xác của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong khi tổ hợp không đặc hiệu của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng không xảy ra hoặc xảy ra ở mức độ không đáng kể.

Khi xem xét các vấn đề được đề cập trên đây cùng với việc đề xuất các kháng thể đặc hiệu kép, các yêu cầu về việc tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép được tóm tắt như sau. Tổng số mười tổ hợp là khả thi khi các kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra với các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng từ hai loại kháng thể khác nhau lần lượt nhận biết hai epitop khác nhau, như được thể hiện trong Fig. 1. Trong số chúng, tổ hợp được đánh dấu bằng đường tròn chấm chấm đáp ứng yêu cầu là (1) các chuỗi nặng thu được từ các kháng thể khác nhau được kết hợp với nhau và (2) các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ cùng một kháng thể được kết hợp với nhau. Chín tổ hợp còn lại không nên được tạo thành hoặc nên được tạo thành ở mức độ tối thiểu.

WO2014142591, là công bố đơn trước đây của tác giả sáng chế, đưa ra “protein trong đó tương tác tĩnh điện được đưa ra trong vị trí tương tác kỵ nước và phương pháp sản xuất chúng”. Đơn này đề xuất protein hoặc kháng thể có tương tác tĩnh điện được đưa ra trong vị trí tương tác kỵ nước của nó trong đó tương tác tĩnh điện được tạo ra bởi điện tích dương và điện tích âm trên chất có điện tích dương và chất có điện tích âm được thay đổi từ cặp kỵ nước các axit amin được chọn trong vị trí tương tác kỵ nước. Dẫn đến sáng chế, nghiên cứu chuyên sâu và toàn vẹn được tạo ra bởi các tác giả sáng chế dẫn đến việc tìm ra kháng thể đặc hiệu kép có thể được thực hiện bằng cách sử dụng tương tác tĩnh điện ở vị trí tương tác không kỵ nước mà không được xem xét trong công bố đơn trước đó và có thể được tạo ra với năng suất cao ngay cả bởi liên kết phụ thuộc kích cỡ và/hoặc sự thay đổi axit amin (hoán đổi) giữa các cặp đã liên kết.

Tài liệu tham khảo

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: Patent Hàn Quốc số 10-2014-0019385 A (14, tháng 2, 2014)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép với độ tinh khiết cao và phương pháp sản xuất chúng.

Một phương án đề xuất dime chứa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai của kháng thể, hoặc các vùng Fc chứa các miền CH3, trong đó

miền CH3 thứ nhất và miền thứ hai được gây đột biến sao cho ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai được cải biến bởi ít nhất một trong số các đột biến nêu dưới đây:

(1) đột biến trong đó một axit amin của ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3 được thế bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại được thế bằng axit amin có điện tích âm;

(2) đột biến trong đó các axit amin trong ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3 được hoán đổi với nhau; và

(3) đột biến trong đó một axit amin của ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3

được thế bằng axit amin kỵ nước lớn trong khi đó axit amin còn lại được thế bằng axit amin kỵ nước nhỏ

Miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai có thể có nguồn gốc từ các loại kháng thể giống nhau hoặc khác nhau (globulin miễn dịch).

Phương án khác đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa miền CH3 sửa đổi hoặc vùng Fc sửa đổi chứa miền CH3 sửa đổi, vector tái tổ hợp mang phân tử axit nucleic, và tế bào tái tổ hợp bao gồm vector tái tổ hợp trong đó.

Như được sử dụng ở đây các thuật ngữ “một axit amin” và “axit amin khác” trong cách biểu hiện “của ít nhất một cặp axit amin, một axit amin... và axit amin khác...” nghĩa là một axit amin và axit amin khác của hai axit amin trong mỗi cặp axit amin của một hoặc nhiều cặp axit amin, tương ứng (sau đây định nghĩa tương tự sẽ được áp dụng).

Phương án khác đề xuất protein đặc hiệu kép để nhắm tới hai loại đích khác nhau, protein đặc hiệu kép chứa miền CH3 thứ nhất hoặc vùng Fc thứ nhất chứa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai hoặc vùng Fc thứ hai chứa miền CH3 thứ hai, trong đó miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai được gây đột biến sao cho ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai được cải biến bởi ít nhất một trong số các đột biến nêu dưới đây:

(1) đột biến trong đó một axit amin của ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3 được thế bằng axit amin có điện tích dương trong khi đó axit amin còn lại được thế bằng axit amin có điện tích âm;

(2) đột biến trong đó các axit amin trong ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3 được hoán đổi với nhau; và

(3) đột biến trong đó một axit amin của ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3 được thế bằng axit amin kỵ nước lớn trong khi đó axit amin còn lại được thế bằng axit amin kỵ nước nhỏ

Cặp axit amin được thế bằng các axit amin có điện tích trái dấu trong bước (1) có thể là axit amin trong môi trường tương tác kỵ nước và/hoặc axit amin trong môi trường tương tác không kỵ nước. Theo một phương án, ít nhất một hai axit amin cấu thành cặp axit amin có thể không phải là axit amin kỵ nước (tức là, axit amin ưa nước). Tương tác tĩnh điện được đưa vào bằng bước (1) thế bằng các axit amin có điện tích trái dấu có thể góp phần cải thiện sự hình

thành heterodime giữa các vùng Fc.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “heterodime” có nghĩa là cơ thể dung hợp trong đó hai protein khác nhau có thể được liên kết với nhau và được dự định bao gồm protein đặc hiệu kép bất kỳ trong đó hai protein gắn với các đích khác nhau tương ứng được liên kết với nhau (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), v.v..

Axit amin chuyển đổi (hoán đổi) trong bước (2) có thể được tiến hành trong cặp axit amin bất kỳ tạo thành liên kết axit amin-axit amin trong các vùng Fc hoặc miền CH3 và, ví dụ, trong ít nhất một cặp axit amin được chọn từ toàn bộ cặp axit amin, mỗi cặp axit amin được liên kết thông qua tương tác khác với tương tác tĩnh điện, tương tác kỵ nước, và tương tác dựa trên sự khác nhau về kích cỡ axit amin. Như vậy, hai gốc axit amin tương tác với nhau (ví dụ, liên kết với nhau) trong mỗi cặp axit amin (tức là, gốc axit amin của miền CH3 thứ nhất và axit amin khác của miền CH3 thứ hai trong cặp axit amin tương tác) có thể được trao đổi với nhau để làm giảm khả năng hình thành homodime vì sự có mặt của axit amin giống nhau tại các vị trí tương phản đối với tương tác axit amin giữa các miền CH3 có nguồn gốc đồng nhất gây khó khăn cho sự liên kết giữa chúng, do đó góp phần cải thiện tỷ lệ dimer hóa dị loại (ví dụ, khi cặp axit amin S364 và K370 trải qua đột biến S364K trong miền thứ nhất và K370S đột biến trong miền CH3 thứ hai, không có sự tương tác giữa các miền CH3 vì cả axit amin ở các vị trí 364 và 370 trở thành lysin (K) trong miền CH3 thứ nhất và serin (S) trong miền CH3 thứ hai, nhưng sự tương tác xảy ra giữa miền CH3 khác nguồn gốc để chỉ tạo thành heterodime).

Bước (3) thể bằng các axit amin khác nhau về kích thước cải thiện sự phù hợp về cấu trúc giữa axit amin lớn và axit amin nhỏ (nghĩa là, axit amin lớn được chèn vào khoảng không gian được thể hiện bằng axit amin nhỏ, do đó làm tăng hiệu quả gắn kết), do việc tăng tỷ lệ dimer hóa dị loại. Cụ thể là, cặp axit amin tương tác được gây đột biến sao cho một axit amin được thể bằng axit amin kỵ nước lớn trong khi axit amin còn lại được thể bằng axit amin kỵ nước nhỏ, nhờ đó ưu điểm được đưa ra từ khó khăn trong việc tạo ra gắn kết giữa các axit amin lớn hoặc giữa các axit amin nhỏ để tối thiểu hóa tỷ lệ homodime hóa (các axit amin lớn, nếu tồn tại tương ứng trong hai chuỗi đối nhau, làm cho hai chuỗi xa nhau để cản trở dimer hóa trong khi hai các axit amin nhỏ, nếu tồn tại ở hai chuỗi đối nhau, tương tác với nhau tại khả năng thấp vì khoảng cách xa giữa chúng và khó tương tác). Ngược lại, axit amin kỵ nước lớn trong một miền CH3 hoặc Fc và axit amin kỵ nước nhỏ trong miền CH3 hoặc Fc khác trải qua tương tác kỵ nước với nhau với khoảng cách gần hơn so với trước khi được gây đột biến các axit amin, do đó tạo điều kiện tốt để dimer hóa dị loại. Do đó, axit amin lớn và axit amin nhỏ được thể

trong bước thể bằng các axit amin khác nhau về kích thước có thể đều được chọn từ axit amin trong số các axit amin kỵ nước. Ví dụ, axit amin lớn có thể là ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm tryptophan và phenylalanin, đều kỵ nước. Ngoài ra, axit amin nhỏ có thể là ít nhất một axit amin được chọn từ nhóm bao gồm alanin, glyxin và valin, toàn bộ là kỵ nước.

Protein đặc hiệu kép bao gồm các vùng Fc hoặc các miền CH3 đột biến có thể được chọn từ một trong số loại protein bất kỳ gắn (ví dụ, nhận diện và/hoặc gắn đặc hiệu với) hai loại đích khác nhau. Để gắn đích, protein đặc hiệu kép chứa các vùng Fc hoặc các miền CH3 đột biến có thể bao gồm hai miền đích có thể gắn (nhận diện và/hoặc gắn đặc hiệu với) hai loại đích khác nhau, tương ứng (ví dụ, miền đích thứ nhất để gắn đích thứ nhất và miền đích thứ hai để gắn đích thứ hai). Các miền đích có thể tạo thành một liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị (sự liên kết) với các vùng Fc hoặc các miền CH3 đột biến, tương ứng, trong phương thức trực tiếp hoặc không trực tiếp (ví dụ, thông qua mối liên kết). Ví dụ, protein đặc hiệu kép chứa các vùng Fc hoặc các miền CH3 đột biến có thể là ít nhất một được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể đặc hiệu kép, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, (scFv-Fc)₂, v.v.), tương tự kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, nanobody, peptibody, peptit, aptit, v.v.), và protein dung hợp của polypeptit gắn kết đặc hiệu đích và vùng Fc đột biến hoặc miền CH3.

Polypeptit gắn kết đặc hiệu đích có thể là polypeptit bất kỳ liên kết đặc hiệu với hợp chất đích sinh học (bất kỳ hợp chất có trong cơ thể bao gồm protein, axit nucleic, và tương tự) và có thể là ít nhất một polypeptit được chọn từ, ví dụ, nhóm bao gồm paratop (ví dụ, ví dụ, CDR hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ), Fv chuỗi đơn (scFv), protein màng (ví dụ, các thụ thể khác nhau, v.v.), protein màng vùng ngoại bào, và phối tử (ví dụ, các nhân tố tăng trưởng khác nhau, xytokin, v.v.). Theo một phương án, protein dung hợp của polypeptit gắn kết đặc hiệu đích và vùng Fc đột biến hoặc miền CH3 có thể là ít nhất một được chọn từ nhóm bao gồm protein dung hợp của protein màng và vùng Fc đột biến hoặc miền CH3, protein dung hợp của protein màng vùng ngoại bào và vùng Fc đột biến hoặc miền CH3, protein dung hợp của phối tử và vùng Fc đột biến hoặc miền CH3, và protein dung hợp của scFv và vùng Fc đột biến hoặc miền CH3.

Khi protein đặc hiệu kép chứa vùng Fc đột biến hoặc miền CH3 là kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể, hoặc tương tự kháng thể, miền đích có thể là paratop (ví dụ, CDR hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ). Đối với protein dung hợp được đề cập nêu trên của polypeptit gắn kết đặc hiệu đích và vùng Fc đột biến hoặc miền CH3,

polypeptit gắn kết đặc hiệu đích có thể là ít nhất một được chọn từ nhóm bao gồm protein màng (ví dụ, các thụ thể khác nhau), protein màng vùng ngoại bào, phối tử (ví dụ, các yếu tố tăng trưởng khác nhau, xytokin, v.v.), và paratop (ví dụ, CDR hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ).

Hai kiểu đích khác nhau có thể đề cập đến hai loại chất sinh học khác nhau (ví dụ, protein) hoặc các vùng khác nhau trong một chất sinh học (ví dụ, một protein). Protein đặc hiệu kép chứa vùng Fc đột biến hoặc miền CH3 được đặc trưng bởi việc tăng tỷ lệ dime hóa dị loại, giảm homodime hóa, và/hoặc tính ổn định, so với protein đặc hiệu kép chứa vùng Fc đột biến (kiểu hoang) hoặc miền CH3.

Phương án khác đề xuất kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, kháng thể đặc hiệu kép chứa miền CH1 thứ nhất và miền CL thứ nhất (vùng hằng định của chuỗi nhẹ) bắt nguồn từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng của kháng thể nhận diện epitop thứ nhất và miền CH1 thứ hai và miền CL thứ hai bắt nguồn từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng của kháng thể nhận diện epitop thứ hai, trong đó miền CH1 và miền CL được gây đột biến để chứa ít nhất một trong số các đột biến nêu dưới đây:

đột biến trong đó trong số hai axit amin cấu thành mỗi cặp của một hoặc nhiều cặp axit amin thứ nhất được chọn từ các cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin tương ứng giữa miền CH1 thứ nhất và miền CL thứ nhất, một axit amin được thế bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại được thế bằng axit amin có điện tích âm; và

đột biến trong đó trong số hai axit amin cấu thành mỗi cặp của một hoặc nhiều cặp axit amin thứ hai được chọn từ các cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin tương ứng giữa miền CH1 thứ hai và miền CL thứ hai, một axit amin được thế bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại được thế bằng axit amin có điện tích âm.

Epitop thứ nhất và epitop thứ hai có thể tồn tại trong các protein khác nhau tương ứng (kháng thể) hoặc trong các vùng khác nhau (phân biệt) của một protein (kháng nguyên).

Trong kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo một phương án, axit amin được thế một cách tương ứng trong miền CH1 thứ nhất và miền CH1 thứ hai có điện tích trái dấu, axit amin được thế một cách tương ứng trong miền CL thứ nhất và miền CH1 thứ nhất có điện tích trái dấu, và axit amin được thế một cách tương ứng trong miền CL thứ hai và miền CH1 thứ hai có điện tích trái dấu.

Trong kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, ví dụ,

axit amin, được đặt trong miền CH1 thứ nhất, là một thành phần của ít nhất một cặp axit amin thứ nhất được chọn từ cặp axit amin trong số các cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin tương ứng giữa miền CH1 thứ nhất và miền CL thứ nhất có thể được thế bằng axit amin có điện tích dương trong khi thành phần khác được đặt trong miền CL thứ nhất có thể được thế bằng axit amin có điện tích khác từ axit amin được thế trong miền CH1 thứ nhất, nghĩa là, điện tích âm, và

axit amin, được đặt trong miền CH1 thứ hai, là một thành phần của ít nhất một cặp axit amin thứ hai được chọn từ cặp axit amin trong số các cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin tương ứng giữa miền CH1 thứ hai và miền CL thứ hai có thể được thế bằng axit amin có điện tích khác từ axit amin được thế trong miền CH1 thứ nhất, nghĩa là, điện tích âm trong khi thành phần khác được thế trong miền CL thứ hai có thể được thế bằng axit amin có điện tích khác từ axit amin được thế trong miền CH1 thứ hai, nghĩa là, điện tích dương.

Trong kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa miền CL CH1 đột biến, cặp axit amin thứ nhất và thứ hai được thế có thể giống hoặc khác nhau, các axit amin điện tích dương được thế trong cặp axit amin thứ nhất và thứ hai có thể giống hoặc khác nhau, và các axit amin điện tích âm được thế trong cặp axit amin thứ nhất và thứ hai có thể giống hoặc khác nhau. Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể đặc hiệu kép chứa miền CH1 đột biến và miền CL đột biến có thể là, ví dụ, mảnh $F(ab')_2$. Kháng thể đặc hiệu kép chứa miền CH1 đột biến và CL hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó gắn epitop tương tự như đối với kháng thể đặc hiệu kép chứa miền CH1 và CL không đột biến (kiểu hoang) và thể hiện tỷ lệ đime hóa chuỗi nặng (hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng-CH1)-chuỗi nhẹ và/hoặc tính ổn định cao hơn, so với kháng thể đặc hiệu kép chứa miền CH1 và CL không đột biến (kiểu hoang).

Kháng thể đặc hiệu kép chứa miền CH1 và CL đột biến có thể chứa các miền CH3 sửa đổi gồm cả miền CH3 thứ nhất có nguồn gốc từ kháng thể nhận diện epitop thứ nhất và miền CH3 thứ hai có nguồn gốc từ kháng thể nhận diện epitop thứ hai, hoặc vùng Fc chứa miền CH3 sửa đổi, trong đó miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai có ít nhất một trong số các đột biến nêu dưới đây:

(1) đột biến trong đó một thành phần của ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3 được thế bằng axit amin có điện tích dương và một thành phần khác được thế bằng axit amin

có điện tích âm;

(2) đột biến trong đó các thành phần của ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3 được chuyển đổi với nhau; và

(3) đột biến trong đó một thành phần của ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3 được thế bằng axit amin lớn (ví dụ, các axit amin kỵ nước lớn như tryptophan, phenylalanin, v.v.) và thành phần khác được thế bằng axit amin nhỏ (ví dụ, axit amin kỵ nước nhỏ như alanin, glyxin, valin, v.v.).

Protein đặc hiệu kép hoặc kháng thể đặc hiệu kép chứa miền CH1 đột biến, miền CL đột biến, và vùng Fc đột biến hoặc miền CH3 sửa đổi có thể thể hiện sự cải thiện trong tỷ lệ đime hóa dị loại, tỷ lệ đime hóa giữa chuỗi nặng (hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng-CH1) và chuỗi nhẹ, cả hai đều gắn với epitop, và/hoặc tính ổn định tương tự, so với protein đặc hiệu kép hoặc kháng thể chứa miền CH1, miền CL, và vùng Fc hoặc miền CH3, không vùng nào là đột biến.

Kháng thể đặc hiệu kép chứa miền CH1 và CL đột biến hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó gắn với epitop giống nhau như đối với kháng thể đặc hiệu kép chứa miền CH1 và CL đột biến (kiểu hoang) và thể hiện tỷ lệ đime hóa chuỗi nặng (hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng-CH1)-chuỗi nhẹ và/hoặc tính ổn định cao hơn, so với kháng thể đặc hiệu kép chứa miền CH1 và CL không đột biến (kiểu hoang).

Phương án khác đề xuất phương pháp tăng cường sự đime hóa dị loại của protein đặc hiệu kép để nhắm tới các đích khác nhau, protein đặc hiệu kép chứa các miền CH3 sửa đổi hoặc vùng Fc chứa các miền CH3 sửa đổi, phương pháp này bao gồm một trong số đột biến sau được đưa vào các bước:

(1) thế một axit amin trong số hai axit amin trong ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành các liên kết axit amin-axit amin giữa các miền CH3 bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại bằng axit amin có điện tích âm;

(2) chuyển đổi hai axit amin trong ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành các liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai với nhau; và

(3) thế một axit amin trong số hai axit amin trong ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành các liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai bằng axit amin kỵ nước lớn (ví dụ, tryptophan, phenylalanin, v.v.) và axit amin

còn lại bằng axit amin kỵ nước nhỏ (ví dụ, alanin, glyxin, valin, v.v.).

Phương án khác đề xuất phương pháp tạo thành kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc để tăng cường tỷ lệ đime hóa giữa chuỗi nặng (hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng-CH1) và chuỗi nhẹ, cả hai đều gắn với epitop giống nhau, phương pháp bao gồm các bước đột biến miền CH1 và CL sau:

thế một gốc axit amin trong hai gốc axit amin cấu thành ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất có nguồn gốc từ chuỗi nặng và miền CL thứ nhất của kháng thể nhận diện epitop thứ nhất bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại bằng axit amin có điện tích âm; và

thế một gốc axit amin trong hai gốc axit amin cấu thành ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ hai có nguồn gốc từ chuỗi nặng và miền CL thứ hai của kháng thể nhận diện epitop thứ hai bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại bằng axit amin có điện tích âm.

Phương pháp tạo thành kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc để tăng cường tỷ lệ đime hóa giữa chuỗi nặng (hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng-CH1) và chuỗi nhẹ có thể bao gồm, ngoài các bước đột biến CH1 và miền CL, ít nhất một bước đột biến miền CH3 trong số các bước sau:

(1) thế một axit amin trong số hai axit amin trong ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành các liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất có nguồn gốc từ chuỗi nặng của kháng thể nhận diện epitop thứ nhất và miền CH3 thứ hai có nguồn gốc từ chuỗi nặng của kháng thể nhận diện epitop thứ hai bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại bằng axit amin có điện tích âm;

(2) chuyển đổi hai axit amin trong ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành các liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai với nhau; và

(3) thế một axit amin trong số hai axit amin trong ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành các liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai bằng axit amin kỵ nước lớn (ví dụ, tryptophan, phenylalanin, v.v.) và axit amin còn lại bằng axit amin kỵ nước nhỏ (ví dụ, alanin, glyxin, valin, v.v.).

Phương án khác đề xuất phương pháp tạo thành kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh liên

kết kháng nguyên của nó và để tăng cường sự đime hóa dị loại của kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để gắn với các đích khác nhau, phương pháp bao gồm một trong số các bước đưa đột biến vào nêu dưới đây để đưa ít nhất một đột biến vào ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai:

(1) thế một axit amin trong số hai axit amin trong ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành các liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất có nguồn gốc từ chuỗi nặng của kháng thể nhận diện epitop thứ nhất và miền CH3 thứ hai có nguồn gốc từ chuỗi nặng của kháng thể nhận diện epitop thứ hai bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại bằng axit amin có điện tích âm;

(2) chuyển đổi hai axit amin trong ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành các liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai với nhau; và

(3) thế một axit amin trong số hai axit amin trong ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành các liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai bằng axit amin kỵ nước lớn (ví dụ, tryptophan, phenylalanin, v.v.) và axit amin còn lại bằng axit amin kỵ nước nhỏ (ví dụ, alanin, glyxin, valin, v.v.).

Phương pháp tạo thành kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cũng có thể bao gồm các bước đột biến CH1 và miền CL sau:

thế một gốc axit amin trong hai gốc axit amin cấu thành ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ nhất có nguồn gốc từ chuỗi nặng và miền CL thứ nhất của kháng thể nhận diện epitop thứ nhất bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại bằng axit amin có điện tích âm; và

thế một gốc axit amin trong hai gốc axit amin cấu thành ít nhất một cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin giữa miền CH3 thứ hai có nguồn gốc từ chuỗi nặng và miền CL thứ hai của kháng thể nhận diện epitop thứ hai bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại bằng axit amin có điện tích âm.

Phương pháp tạo thành kháng thể đặc hiệu kép hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể tăng cường sự đime hóa dị loại giữa các miền CH3 hoặc các vùng Fc có nguồn gốc từ kháng thể nhận diện epitop khác nhau cũng như giữa các miền CH1 (chuỗi nặng) và miền

CL (chuỗi nhẹ) có nguồn gốc từ kháng thể nhận diện epitop tương tự.

Phương pháp kỹ thuật

Bên dưới, sáng chế được mô tả chi tiết.

Sáng chế đề cập đến protein đặc hiệu kép chứa vùng hằng định Fc và/hoặc vùng hằng định Fab và nhắm tới các đích khác nhau và phương pháp tạo thành nó, trong đó axit amin đột biến được đưa vào vùng hằng định Fc (các miền CH3) đã liên kết (dung hợp) tương ứng với các miền đích khác nhau để tăng sự liên kết giữa vùng hằng định Fc liên kết với miền đích khác nhau, do đó tăng tỷ lệ đime hóa dị loại giữa vùng hằng định Fc liên kết với các miền đích khác và làm giảm tỷ lệ homodime hóa giữa vùng hằng định Fc liên kết với miền đích tương tự; và/hoặc

axit amin đột biến được đưa vào vùng hằng định Fab liên kết với các miền đích khác nhau để làm tăng sự liên kết giữa vùng hằng định Fab liên kết với các miền đích khác nhau, do đó tỷ lệ đime hóa giữa các miền đích tương tự và giữa vùng hằng định Fab liên kết với nó,

trong đó protein đặc hiệu kép có các miền đích khác nhau có thể được sản xuất với hiệu suất cao.

Các vị trí của axit amin trong kháng thể (chuỗi nặng và chuỗi nhẹ), miền CH1, miền CL, các vùng Fc, và miền CH3 được đề cập trong bản mô tả được đưa ra toàn bộ như được đánh số theo hệ thống đánh số EU [chỉ số EU được quy định trong “Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)”] và khác với các số được tính đối với các vị trí của các trình tự trong danh sách trình tự.

Kháng thể có thể là ít nhất một loại được chọn từ các loại trong số toàn bộ loại globulin miễn dịch có nguồn gốc từ động vật có vú hoặc chim. Ví dụ, kháng thể được sử dụng trong phần mô tả có thể là ít nhất một được chọn từ nhóm bao gồm IgG (ví dụ, IgG loại 1 (IgG1), IgG loại 2 (IgG2), IgG loại 3 (IgG3), và IgG loại 4 (IgG4)), IgA (ví dụ, IgA loại 1 (IgA1) và IgA loại 2 (IgA2)), IgD, IgE, và IgM. Kháng thể có thể là globulin miễn dịch có nguồn gốc từ động vật có vú như động vật linh trưởng bao gồm người, khỉ, v.v. và loài ngặm nhấm bao gồm chuột nhắt, chuột cống, v.v. và có thể là, ví dụ, globulin miễn dịch có nguồn gốc từ người. Theo một phương án, kháng thể có thể là ít nhất một kháng thể được chọn từ kháng thể trong số IgG1 ở người (vùng hằng định; protein: số truy cập ngân hàng gen AAC82527,1, gen: số truy cập

ngân hàng gen J00228,1), IgG2 ở người (vùng hằng định; protein: số truy cập ngân hàng gen AAB59393,1, gen: số truy cập ngân hàng gen J00230,1), IgG3 ở người (vùng hằng định; protein: số truy cập ngân hàng gen P01860, gen: số truy cập ngân hàng gen X03604,1), IgG4 ở người (vùng hằng định; protein: số truy cập ngân hàng gen AAB59394,1, gen: số truy cập ngân hàng gen K01316,1), IgA1 ở người (vùng hằng định; protein: số truy cập ngân hàng gen AAT74070,1, gen: số truy cập ngân hàng gen AY647978,1), IgA2 ở người (vùng hằng định; protein: số truy cập ngân hàng gen AAB59396,1, gen: số truy cập ngân hàng gen J00221,1), IgD ở người (vùng hằng định; protein: số truy cập ngân hàng gen AAA52771,1, AAA52770,1), IgE ở người (vùng hằng định; protein: số truy cập ngân hàng gen AAB59395,1, gen: số truy cập ngân hàng gen J00222,1), và IgM ở người (vùng hằng định; protein: số truy cập ngân hàng gen CAB37838,1, gen: số truy cập ngân hàng gen X57086,1). Theo một phương án, kháng thể có thể là ít nhất một được chọn từ nhóm bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 có nguồn gốc từ người, nhưng không bị giới hạn bởi các kháng thể này. Đột biến được đưa vào toàn bộ miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai, miền CH1 thứ nhất và miền CL thứ nhất, và miền CH1 thứ hai và miền CL thứ hai, mỗi miền độc lập được chọn từ các loại globulin miễn dịch giống hoặc khác nhau.

Như có thể được thấy trong Fig. 33a mô tả kết quả sắp xếp thẳng hàng trình tự của IgG1 ở người vùng hằng định chuỗi nặng (SEQ ID NO: 33) và vùng hằng định chuỗi nặng IgA1 ở người (SEQ ID NO: 34) và trong Fig. 33b mô tả kết quả sắp xếp thẳng hàng trình tự của vùng hằng định kappa (SEQ ID NO: 35) và vùng hằng định lambda (SEQ ID NO: 36) của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch ở người, vùng hằng định chuỗi nặng và vùng hằng định của chuỗi nhẹ thể hiện trình tự các axit amin được duy trì cao giữa các kiểu phụ.

Ngoài ra, các trình tự globulin miễn dịch được duy trì cao trong số các trình tự bắt nguồn từ các loài và kiểu phụ. Ví dụ, như được thể hiện bằng các kết quả sắp xếp thẳng hàng trình tự của vùng hằng định chuỗi nặng trong số người, chuột nhắt, và chuột cống trong Fig. 33c (sự sắp xếp thẳng hàng trình tự miền CH1) và Fig. 33d (sự sắp xếp thẳng hàng trình tự miền CH3), trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng của globulin miễn dịch là sự duy trì giữa các loài khác nhau cao.

Trong phần mô tả, do đó, tài liệu tham khảo đưa ra đối với IgG1 ở người để chỉ định các vị trí axit amin trong miền CH1 và các miền CH3 và đối với vùng hằng định kappa của người để chỉ định các vị trí axit amin trong miền CL. Các vị trí axit amin được chỉ định bằng IgG1 ở người và vùng hằng định kappa của người đóng vai trò như tài liệu tham khảo cho phép

các vị trí axit amin tương ứng trong globulin miễn dịch của các kiểu phụ và globulin miễn dịch khác của các loài không phải là người được chỉ định rõ ràng thông qua các phương tiện sắp xếp thẳng hàng trình tự (ví dụ, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (xem bảng 1).

Ngoài ra, vị trí của axit amin trong miền CH1, miền CL, và miền CH3, được đề cập trong phần mô tả, được đại diện theo hệ thống đánh số EU, và đối với các chi tiết của nó, tài liệu tham khảo có thể được thực hiện với “http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (vùng hằng định chuỗi nặng)”, “http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGLCnber.html (chuỗi nhẹ vùng lambda)” và “http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGKCnber.html (vùng kappa chuỗi nhẹ)”.

Sử dụng IgG1 ở người làm tài liệu tham khảo, hệ thống đánh số EU đánh số như sau:

(1) miền CH1 (SEQ ID NO: 1) liên tiếp, với gốc axit amin thứ nhất (Ala) tạo ra vị trí 118 (tức là, 108 gốc axit amin của miền CH1 của SEQ ID NO: 1 tương ứng lần lượt với các vị trí từ 118 đến 215 trong IgG1); và

(2) miền CH3 (SEQ ID NO: 15) liên tiếp, với gốc axit amin thứ nhất (Lys) tạo ra vị trí 340 (tức là, 108 gốc axit amin của miền CH3 của SEQ ID NO: 15 tương ứng với vị trí 340 đến 447 trong IgG1) (xem, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html).

Trong phần mô tả này, vị trí của axit amin trong miền CH1 và CH3 và các loại axit amin được mô tả tương ứng, với IgG1 ở người đóng vai trò tài liệu tham khảo.

Ngoài ra, theo cách đánh số EU,

miền CL (SEQ ID NO: 10) của vùng hằng định kappa của người (protein: số truy cập ngân hàng gen AAA58989,1 gen: số truy cập ngân hàng gen J00241,1) được đánh số liên tiếp, với gốc axit amin thứ nhất (Val) tạo ra vị trí 110 (tức là, 105 gốc axit amin của miền CL của SEQ ID NO: 10 tương ứng lần lượt với các vị trí 110 đến 214; xem http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGKCnber.html); và

miền CL (SEQ ID NO: 11 (Lambda1), SEQ ID NO: 12 (Lambda2), SEQ ID NO: 13 (Lambda3), và SEQ ID NO: 14 (Lambda7)) của vùng hằng định lambda người được đánh số liên tiếp, với gốc axit amin thứ nhất (Lys) tạo ra vị trí 110 (đối với vùng hằng định lambda, các

vị trí 169, 201, và 203 được bỏ qua từ số thứ tự được thiết lập; nghĩa là, gốc axit amin 103 của miền CL của SEQ ID NO: 11 hoặc 12 được đánh số từ vị trí 110 đến vị trí 168, từ vị trí 170 đến vị trí 200, và từ vị trí 203 đến vị trí 215; xem http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGLCnber.html). Trong phần mô tả, các vị trí axit amin trong miền CL và loại axit amin được mô tả tương ứng, với vùng hằng định kappa của người đóng vai trò làm tài liệu tham khảo.

Vùng hằng định Fab có thể chứa một vùng hằng định chuỗi nặng (tức là, miền CH1) được chọn từ nhóm bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng của các mảnh Fab của IgG (IgG1, IgG2, IgG3, và IgG 4), IgA (IgA1 và IgA2), IgD, IgE, và IgM và một vùng hằng định của chuỗi nhẹ (tức là miền CL) được chọn từ nhóm bao gồm loại kappa và loại lambda (ví dụ, loại lambda 1, loại lambda 2, loại lambda 3, và loại lambda 7) của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch.

Bằng cách lấy ví dụ, miền CH1 của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, và IgM, là mỗi miền có sẵn như vùng hằng định chuỗi nặng (miền CH1) của mảnh Fab có thể chứa trình tự các axit amin của SEQ ID NO: 1 (tương ứng với vị trí 118 đến 215 theo cách đánh số EU), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, và SEQ ID NO: 9, tương ứng. Ngoài ra, miền CL của loại kappa, loại lambda 1, loại lambda 2, loại lambda 3, và loại lambda 7 có sẵn như vùng hằng định của chuỗi nhẹ (miền CL) và có thể chứa trình tự các axit amin của SEQ ID NO: 10 (tương ứng với vị trí 110 đến 214 theo cách đánh số EU), SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 14, tương ứng. Theo một phương án, vùng hằng định Fab miền CH1 (SEQ ID NO: 1) của IgG loại 1 và vùng hằng định của chuỗi nhẹ (miền CL) (SEQ ID NO: 10) của loại kappa. Để tăng cường đime hóa giữa các phân tử gắn với đối tượng giống nhau, axit amin được thể bằng axit amin điện tích âm hoặc axit amin điện tích dương trong miền CH1 có thể là ít nhất một gốc, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) gốc được chọn từ nhóm bao gồm leuxin ở vị trí 145, lysin ở vị trí 147, phenylalanin ở vị trí 170, serin ở vị trí 183 và valin ở vị trí 185 trong IgG loại 1 (SEQ ID NO: 1) như được đánh số theo hệ thống đánh số EU. Theo phương án khác, axit amin được thể bằng axit amin điện tích âm hoặc axit amin điện tích dương trong miền CH1 có thể là ít nhất một gốc được chọn từ nhóm bao gồm các axit amin của kiểu phụ IgG khác (IgG2, IgG3, và IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE, và IgM (tương ứng SEQ ID NO: 2 đến 9) ở các vị trí tương ứng với leuxin ở vị trí 145, lysin ở vị trí 147, phenylalanin ở vị trí 170, serin ở vị trí 183 và valin ở vị trí 185 trên trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1.

Như được sử dụng ở đây, “axit amin ở vị trí tương ứng với” có thể được xác định bằng cách sắp xếp thẳng hàng trình tự đặc trưng của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 với trình tự các axit amin đích (tức là, SEQ ID NO: 2 đến 9) không có khó khăn gì (sau đây, các định nghĩa tương tự sẽ được áp dụng).

Axit amin có điện tích dương (axit amin điện tích dương) có thể được chọn từ các axit amin cơ bản và có thể là, ví dụ, lysin hoặc arginin. Khi axit amin có điện tích dương được đưa vào miền CH1, ít nhất một gốc, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều (ví dụ, bốn) gốc được chọn từ nhóm bao gồm leuxin ở vị trí 145, lysin ở vị trí 147, phenylalanin ở vị trí 170, prolin ở vị trí 171, serin ở vị trí 183 và valin ở vị trí 185 trên trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, và các axit amin ở các vị trí tương ứng trên trình tự các axit amin của mỗi SEQ ID NO: 2 đến 9 độc lập có thể được thế bằng axit amin cơ bản, ví dụ, lysin hoặc arginin.

Ví dụ, để đưa axit amin có điện tích dương vào, miền CH1 có thể chứa ít nhất một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) các đột biến sau (trên trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1; và cũng được áp dụng cho gốc axit amin ở các vị trí tương ứng trên trình tự các axit amin của SEQ ID NO: 2 đến 9):

đột biến thế leuxin ở vị trí 145 bằng lysin hoặc arginin (ví dụ, lysin);

đột biến thế serin ở vị trí 183 bằng lysin hoặc arginin (ví dụ, lysin);

đột biến thế lysin ở vị trí 147 bằng arginin;

đột biến thế phenylalanin ở vị trí 170 bằng lysin hoặc arginin (ví dụ, lysin);

đột biến thế prolin ở vị trí 171 bằng lysin hoặc arginin (ví dụ, lysin); và

đột biến thế valin ở vị trí 185 bằng lysin hoặc arginin (ví dụ, arginin).

Axit amin có điện tích âm có thể được chọn từ gốc axit amin trong số gốc axit amin có tính axit và có thể là, ví dụ, axit aspartic hoặc axit glutamic. Do đó, khi axit amin có điện tích âm được đưa vào miền CH1, ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) gốc được chọn từ nhóm bao gồm leuxin ở vị trí 145, lysin ở vị trí 147, phenylalanin ở vị trí 170, prolin ở vị trí 171, serin ở vị trí 183 và valin ở vị trí 185 trên trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, và các axit amin ở các vị trí tương ứng trên trình tự các axit amin của mỗi SEQ ID NO: 2 đến 9 độc lập có thể được thế bằng axit amin có tính axit, ví dụ, axit aspartic hoặc axit glutamic. Ví dụ, để đưa axit amin có

điện tích dương vào, miền CH1 có thể chứa ít nhất một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) của các đột biến sau (trên trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1; và cũng được áp dụng cho gốc axit amin ở các vị trí tương ứng trên trình tự các axit amin của SEQ ID NO: 2 đến 9):

đột biến thế leuxin ở vị trí 145 bằng axit aspartic hoặc axit glutamic (ví dụ, axit glutamic);

đột biến thế lysin ở vị trí 147 bằng axit aspartic hoặc axit glutamic (ví dụ, axit aspartic);

đột biến thế serin ở vị trí 183 bằng axit aspartic hoặc axit glutamic (ví dụ, axit glutamic);

đột biến thế valin ở vị trí 185 bằng axit aspartic hoặc axit glutamic (ví dụ, axit aspartic);

đột biến thế phenylalanin ở vị trí 170 bằng axit aspartic hoặc axit glutamic (ví dụ, axit aspartic); và

đột biến thế prolin ở vị trí 171 bằng axit aspartic hoặc axit glutamic (ví dụ, axit aspartic).

Để tăng cường dime hóa giữa các phân tử gắn với đối tượng giống nhau, axit amin được thế bằng axit amin điện tích âm hoặc axit amin điện tích dương trong vùng hằng định của chuỗi nhẹ (miền CL) có thể là ít nhất một gốc, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) gốc được chọn từ nhóm bao gồm serin ở vị trí 131, valin ở vị trí 133, leuxin ở vị trí 135, serin ở vị trí 162, và threonin ở vị trí 180 trong loại kappa (SEQ ID NO: 10). Theo phương án khác, axit amin được thế bằng axit amin điện tích âm hoặc axit amin điện tích dương trong miền CL có thể là ít nhất một gốc được chọn từ nhóm bao gồm axit amin của miền CL của các loại lambda (loại lambda 1, loại lambda 2, loại lambda 3, và loại lambda 7) (tương ứng SEQ ID NO: 11 đến 14) ở các vị trí tương ứng với serin ở vị trí 131, valin ở vị trí 133, leuxin ở vị trí 135, serin ở vị trí 162, và threonin ở vị trí 180 trên trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10.

Axit amin có điện tích dương (axit amin điện tích dương) có thể được chọn từ các axit amin cơ bản và có thể là, ví dụ, lysin hoặc arginin. Do đó, khi axit amin có điện tích dương được đưa vào miền CL, ít nhất một gốc, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) gốc được chọn từ nhóm bao gồm serin ở vị trí 131, valin ở vị trí 133, leuxin ở vị trí 135, serin ở vị trí 162, và threonin ở vị trí 180 trên trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, và các axit amin ở các vị trí tương ứng trên trình tự các axit amin của mỗi SEQ ID NO: 11 đến 14 độc lập được thế bằng axit amin cơ bản, ví dụ,

lysine hoặc arginine.

Bằng cách lấy ví dụ, để đưa axit amin có điện tích dương vào, miền CL có thể chứa ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) của đột biến sau (đối với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10; và cũng được áp dụng cho axit amin ở các vị trí tương ứng trên trình tự các axit amin của SEQ ID NO: 11 đến 14):

đột biến thế serine ở vị trí 131 bằng lysine hoặc arginine (ví dụ, lysine);

đột biến thế valine ở vị trí 133 bằng lysine hoặc arginine (ví dụ, lysine);

đột biến thế leucine ở vị trí 135 bằng lysine hoặc arginine (ví dụ, arginine);

đột biến thế serine ở vị trí 162 bằng lysine hoặc arginine (ví dụ, lysine); và

đột biến thế threonine ở vị trí 180 bằng lysine hoặc arginine (ví dụ, arginine).

Để tăng cường thêm homodimer hóa, miền CH1 đột biến và/hoặc miền CL đột biến có thể chứa đồng thời hai hoặc nhiều hơn đột biến.

Ví dụ, lysine ở vị trí 147 và valine ở vị trí 185 trong miền CH1 có thể được thế bằng axit amin có điện tích dương hoặc điện tích âm. Bằng cách lấy ví dụ, lysine ở vị trí 147 và valine ở vị trí 185 trong một miền của miền CH1 thứ nhất và thứ hai có thể được thế bằng axit amin có điện tích dương (ví dụ, lysine hoặc arginine) trong khi lysine ở vị trí 147 và valine ở vị trí 185 trong miền CH1 khác có thể được thế bằng axit amin có điện tích âm (axit glutamic hoặc axit aspartic). Ngoài ra, leucine ở vị trí 135 và threonine ở vị trí 180 trong miền CL có thể được thế bằng axit amin có điện tích dương hoặc điện tích âm. Bằng cách lấy ví dụ, leucine ở vị trí 135 và threonine ở vị trí 180 trong một miền của miền CH1 thứ nhất và thứ hai có thể được thế bằng axit amin có điện tích dương (ví dụ, lysine hoặc arginine) trong khi leucine ở vị trí 135 và threonine ở vị trí 180 trong miền CL khác có thể được thế bằng axit amin có điện tích âm (axit glutamic hoặc axit aspartic).

Theo phương án khác, phenylalanine ở vị trí 170 và proline ở vị trí 171 trong miền CH1 có thể được thế bằng axit amin có điện tích dương hoặc điện tích âm. Bằng cách lấy ví dụ, phenylalanine ở vị trí 170 và proline ở vị trí 171 trong một miền của miền CH1 thứ nhất và miền CH1 thứ hai có thể được thế bằng axit amin có điện tích dương (ví dụ, lysine hoặc arginine) trong khi phenylalanine ở vị trí 170 và proline ở vị trí 171 trong miền CH1 khác có thể được thế bằng axit amin có điện tích âm (axit glutamic hoặc axit aspartic). Ngoài ra, thế bằng axit amin có

điện tích dương hoặc điện tích âm có thể được thực hiện đối với leuxin ở vị trí 135 và serin ở vị trí 162 trong miền CL. Bằng cách lấy ví dụ, leuxin ở vị trí 135 và serin ở vị trí 162 trong một miền của miền CL thứ nhất và miền CL thứ hai có thể được thế bằng axit amin có điện tích dương (ví dụ, lysin hoặc arginin) trong khi leuxin ở vị trí 135 và serin ở vị trí 162 trong miền CL khác có thể được thế bằng axit amin có điện tích âm (ví dụ, axit glutamic hoặc axit aspartic).

Axit amin có điện tích âm có thể được chọn từ axit amin trong số các axit amin có tính axit và có thể là, ví dụ, axit aspartic hoặc axit glutamic. Do đó, khi axit amin có điện tích âm được đưa vào miền CL, ít nhất một gốc, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) gốc được chọn từ nhóm bao gồm serin ở vị trí 131, valin ở vị trí 133, leuxin ở vị trí 135, serin ở vị trí 162, và threonin ở vị trí 180 trên trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, và các axit amin ở các vị trí tương ứng trên trình tự các axit amin của mỗi SEQ ID NO: 11 đến 14 độc lập có thể được thế bằng axit amin cơ bản, ví dụ, axit aspartic hoặc axit glutamic. Bằng cách lấy ví dụ, để đưa axit amin có điện tích dương vào, miền CL có thể bao gồm ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) của các đột biến sau (trên trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10; và cũng được áp dụng cho gốc axit amin ở các vị trí tương ứng trên trình tự các axit amin của SEQ ID NO: 11 đến 14):

đột biến thế serin ở vị trí 131 bằng axit aspartic hoặc axit glutamic (ví dụ, axit glutamic);

đột biến thế valin ở vị trí 133 bằng axit aspartic hoặc axit glutamic (ví dụ, axit glutamic);

đột biến thế leuxin ở vị trí 135 bằng axit aspartic hoặc axit glutamic (ví dụ, axit aspartic);

đột biến thế serin ở vị trí 162 bằng axit aspartic hoặc axit glutamic (ví dụ, axit aspartic);

và

đột biến thế threonin ở vị trí 180 bằng axit aspartic hoặc axit glutamic (ví dụ, axit aspartic).

Theo một phương án, một bộ gồm hai axit amin tạo thành cặp axit amin giữa miền CH1 và miền CL được thế bằng cặp các axit amin có điện tích trái dấu có thể là ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) cặp được chọn từ nhóm bao gồm cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và serin ở vị trí 131 trong miền CL, cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL, cặp lysin ở vị trí 147 trong miền CH1 và threonin ở vị trí 180 trong miền CL, cặp

serin ở vị trí 183 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL, cặp valin ở vị trí 185 trong miền CH1 và leuxin ở vị trí 135 trong miền CL, cặp phenylalanin ở vị trí 170 trong miền CH1 và leuxin ở vị trí 135 trong miền CL, và cặp prolin ở vị trí 171 trong miền CH1 và serin ở vị trí 162 trong miền CL, như được đánh số trên cơ sở của trình tự các axit amin của SEQ ID NO: 1 (miền CH1) và SEQ ID NO: 10 (miền CL). Ví dụ, đột biến được đưa vào cặp axit amin giữa miền CH1 và CL có thể là một hoặc hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai) cặp được chọn từ nhóm bao gồm cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và serin ở vị trí 131 trong miền CL, cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL, cặp lysin ở vị trí 147 trong miền CH1 và threonin ở vị trí 180 trong miền CL, cặp serin ở vị trí 183 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL, và cặp valin ở vị trí 185 trong miền CH1 và leuxin ở vị trí 135 trong miền CL, như được đánh số trên cơ sở của trình tự các axit amin của SEQ ID NO: 1 (miền CH1) và SEQ ID NO: 10 (miền CL).

Đột biến được đưa vào các cặp axit amin giữa miền CH1 thứ nhất và miền CL thứ nhất có thể giống hoặc khác các cặp axit amin giữa miền CH1 thứ hai và miền CL thứ hai.

Theo một phương án, axit amin có điện tích dương được đưa vào miền CH1 thứ nhất (với việc đưa axit amin có điện tích âm vào miền CL thứ nhất) trong khi axit amin có điện tích âm được đưa vào miền CH1 thứ hai (với việc đưa axit amin có điện tích dương vào miền CL thứ hai).

Để tăng cường sự đime hóa dị loại, ít nhất một, ví dụ, một, hai, hoặc ba của các đột biến sau có thể được đưa vào vùng Fc của chuỗi nặng, cụ thể là, miền CH3 trong vùng Fc:

(1) đột biến trong đó một gốc axit amin của ít nhất một cặp axit amin (ít nhất một gốc axit amin trong hai gốc axit amin không kỵ nước) giữa các miền CH3 được thế bằng axit amin có điện tích dương trong khi gốc khác được thế bằng axit amin có điện tích âm (sau đây gọi tắt là “đột biến được gây ra bởi tương tác tĩnh điện”);

(2) đột biến trong đó gốc axit amin trong ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3 được trao đổi với nhau (sau đây gọi tắt là “đột biến hoán đổi”); và

(3) đột biến trong đó một gốc axit amin trong ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3 được thế bằng axit amin lớn (ví dụ, axit amin kỵ nước lớn như tryptophan, phenylalanin, v.v.) trong khi axit amin khác gốc được thế bằng axit amin nhỏ (ví dụ, axit amin kỵ nước nhỏ như alanin, glyxin, valin, v.v.) (sau đây gọi tắt là “đột biến kích cỡ”).

Như vậy, đột biến được đưa vào miền CH3 có thể được chọn từ nhóm chứa miền CH3 của IgG1 ở người (SEQ ID NO: 15; tương ứng với vị trí 340 đến 447 theo cách đánh số EU), miền CH3 của IgG2 ở người (SEQ ID NO: 16), miền CH3 của IgG3 ở người (SEQ ID NO: 17), miền CH3 của IgG4 ở người (SEQ ID NO: 18), miền CH3 của IgA1 ở người (SEQ ID NO: 19), miền CH3 của IgA2 ở người (SEQ ID NO: 20), miền CH3 của IgD ở người (SEQ ID NO: 21), miền CH3 của IgE ở người (SEQ ID NO: 22), và miền CH3 của IgM ở người (SEQ ID NO: 23).

Đột biến được đưa vào miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai có thể có nguồn gốc từ các loại globulin miễn dịch giống nhau hoặc khác nhau, mỗi loại độc lập được chọn từ nhóm bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, và IgM. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai đều có thể là miền CH3 của IgG1 ở người có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, nhưng không giới hạn ở đó.

Các cặp axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai sau được dựa trên miền CH3 của IgG1 ở người có axit amin của SEQ ID NO: 15, và cơ sở là đúng đối với các cặp axit amin tương ứng giữa các miền CH3 của IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, và IgM (tương ứng, SEQ ID NO: 16 đến 23).

Một đột biến trong số các đột biến được đưa vào cặp axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và thứ hai có thể là ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) các cặp axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các cặp axit amin giữa các miền CH3 và các cặp axit amin ở vị trí tương ứng giữa các miền CH3 của IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, và IgM (tương ứng, SEQ ID NO: 16 đến 23), được liệt kê trong bảng 1, bên dưới.

Bảng 1

Số thứ tự cặp axit amin	IgG (1-4)		IgA1		IgA2		IgE		IgM	
	Chuỗi A	Chuỗi B	Chuỗi A	Chuỗi B	Chuỗi A	Chuỗi B	Chuỗi A	Chuỗi B	Chuỗi A	Chuỗi B
1	Q347	K360	E347	L360	E347	L360	E444	R457	Q347	K360
2	Y349	S354	H349	P354	H349	P354	Y446	P451	Y349	S354
3	Y349	E357	H349	E357	H349	E357	Y446	P454	Y349	E357
4	Y349	K360	H349	L360	H349	L360	Y446	R457	Y349	K360
5	L351	L351	L351	L351	L351	L351	F448	F448	L351	L351
6	P352	P352	P352	P352	P352	P352	A449	A449	P352	P352
7	S354	Y349	P354	H349	P354	H349	P451	Y446	S354	Y349

8	D356	K439	E356	K439	E356	K439	W453	R539	D356	K439
9	E357	Y349	E357	H349	E357	H349	P454	Y446	E357	Y349
10	E357	K370	E357	R370	E357	R370	P454	Q467	E357	K370
11	K360	Q347	L360	E347	L360	E347	R457	E444	K360	Q347
12	K360	Y349	L360	H349	L360	H349	R457	Y446	K360	Y349
13	S364	L368	T364	L368	T364	L368	T461	L465	S364	L368
14	S364	K370	T364	R370	T364	R370	T461	Q467	S364	K370
15	T366	T366	T366	T366	T366	T366	A463	A463	T366	T366
16	T366	Y407	T366	T407	T366	T407	A463	F506	T366	Y407
17	L368	S364	L368	T364	L368	T364	L465	T461	L368	S364
18	L368	K409	L368	I409	L368	I409	L465	R508	L368	K409
19	K370	E357	R370	E357	R370	E357	Q467	P454	K370	E357
20	K370	S364	R370	T364	R370	T364	Q467	T461	K370	S364
21	K370	T411	R370	R411	R370	R411	Q467	E510	K370	T411
22	N390	S400	L390	S400	L390	S400	R489	K499	N390	S400
23	K392	L398	L392	Q398	L392	Q398	S491	K497	K392	L398
24	T394	T394	W394	W394	W394	W394	T493	T493	T394	T394
25	T394	V397	W394	R397	W394	R397	T493	R496	T394	V397
26	P395	P395	A395	A395	A395	A395	Q494	Q494	P395	P395
27	P395	V397	A395	R397	A395	R397	Q494	R496	P395	V397
28	V397	T394	R397	W394	R397	W394	R496	T493	V397	T394
29	V397	P395	R397	A395	R397	A395	R496	Q494	V397	P395
30	L398	K392	Q398	L392	Q398	L392	K497	S491	L398	K392
31	S400	N390	S400	K390	S400	K390	K499	R489	S400	N390
32	F405	K409	A405	I409	A405	I409	F504	R508	F405	K409
33	Y407	T366	T407	T366	T407	T366	F506	A463	Y407	T366
34	Y407	Y407	T407	T407	T407	T407	F506	F506	Y407	Y407
35	Y407	K409	T407	I409	T407	I409	F506	R508	Y407	K409
36	K409	L368	I409	L368	I409	L368	R508	L465	K409	L368
37	K409	F405	I409	A405	I409	A405	R508	F504	K409	F405
38	K409	Y407	I409	T407	I409	T407	R508	F506	K409	Y407
39	T411	K370	R411	R370	R411	R370	E510	Q467	T411	K370
40	K439	D356	K439	K439	K439	K439	R539	W453	K439	D356

(Chuỗi A: miền CH3 thứ nhất; chuỗi B: miền CH3 thứ hai)

Chi tiết hơn, cặp axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai có ít nhất một đột biến trong số các đột biến sau: (1) đột biến gây ra bởi tương tác tĩnh điện (đại diện bởi điện tích (J) trong bảng 2 và Fig. 2); (2) đột biến hoán đổi (đại diện bởi hoán đổi (O) trong bảng 2 và Fig. 2); và (3) đột biến kích cỡ (đại diện bởi kích thước (B) trong bảng 2 và Fig. 2) có thể là ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) các cặp axit amin được chọn từ các cặp axit amin giữa các miền

CH3 của IgG1 (SEQ ID NO: 15) và các cặp axit amin ở vị trí tương ứng giữa các miền CH3 của IgG2, IgG3 IgG4 IgA1 IgA2 IgD, IgE, và IgM (tương ứng, SEQ ID NO: 16 đến 23), được gọi ý trong bảng 2 và Fig. 2:

Bảng 2

Số thứ tự cặp axit amin	Điện tích (J)		Hoán đổi (O)		Kích cỡ (B)	
	Chuỗi A	Chuỗi B	Chuỗi A	Chuỗi B	Chuỗi A	Chuỗi B
1	Q347	K360	Q347	K360	Q347	K360
2	Y349	S354			Y349	S354
3	Y349	E357			Y349	E357
4	Y349	K360			Y349	K360
5	L351	L351			L351	L351
6	P352	P352			P352	P352
7	S354	Y349	S354	Y349	S354	Y349
8	D356	K439			D356	K439
9	E357	Y349	E357	Y349	E357	Y349
10	E357	K370	E357	K370	E357	K370
11	K360	Q347			K360	Q347
12	K360	Y349	K360	Y349	K360	Y349
13	S364	L368	S364	L368	S364	L368
14	S364	K370	S364	K370	S364	K370
15	T366	T366			T366	T366
16	T366	Y407			T366	Y407
17	L368	S364			L368	S364
18	L368	K409	L368	K409	L368	K409
19	K370	E357			K370	E357
20	K370	S364			K370	S364
21	K370	T411			K370	T411
22	N390	S400	N390	S400	N390	S400
23	K392	L398			K392	L398
24	T394	T394			T394	T394
25	T394	V397	T394	V397	T394	V397
26	P395	P395			P395	P395
27	P395	V397			P395	V397
28	V397	T394			V397	T394
29	V397	P395			V397	P395
30	L398	K392	L398	K392	L398	K392
31	S400	N390			S400	N390
32	F405	K409	F405	K409	F405	K409
33	Y407	T366	Y407	T366	Y407	T366
34	Y407	Y407			Y407	Y407
35	Y407	K409			Y407	K409

36	K409	L368			K409	L368
37	K409	F405			K409	F405
38	K409	Y407			K409	Y407
39	T411	K370	T411	K370	T411	K370
40					K439	D356

(Chuỗi A: miền CH3 thứ nhất; chuỗi B: miền CH3 thứ hai; các đột biến được liệt kê trong bảng 2 được đưa đến các vị trí dựa trên IgG1, nhưng được áp dụng cho các vị trí tương ứng trong miền CH3 của IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, và IgM).

Như được sử dụng ở đây, ví dụ, “Q347” dùng để chỉ glutamin ở vị trí 347 trên trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 trong miền CH3 của IgG1 ở người, và ký hiệu như vậy là đúng với gốc axit amin ở các vị trí tương ứng trong miền CH3 của IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, và IgM (tương ứng, SEQ ID NO: 16 đến 23) (sau đây, định nghĩa tương tự được áp dụng).

Sau đây, đột biến được đưa vào các cặp axit amin giữa các miền CH3 được đánh số trên cơ sở của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và trừ khi được mô tả khác, việc đánh số được hiểu là áp dụng cho các axit amin tại các vị trí được ký hiệu trong IgG1 cũng như ở các vị trí tương ứng trong miền CH3 của loại globulin miễn dịch khác (IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, và IgM).

Đột biến gây ra bởi tương tác tĩnh điện được dự định để thế axit amin điện tích dương đối với một gốc axit amin của ít nhất một cặp axit amin giữa các vùng Fc hoặc các miền CH3 (ít nhất một gốc của hai axit amin đã bắt cặp không kỵ nước) và axit amin điện tích âm đối với axit amin khác gốc để đưa tương tác tĩnh điện vào vị trí thiếu tương tác kỵ nước, do đó góp phần tăng lực liên kết gây ra bởi tương tác tĩnh điện.

Axit amin kỵ nước có thể được chọn từ nhóm bao gồm glyxin, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, prolin, phenylalanin, và tryptophan.

Axit amin có điện tích âm có thể được chọn từ axit amin trong số các axit amin có tính axit và có thể là, ví dụ, axit aspartic hoặc axit glutamic. Axit amin có điện tích dương có thể được chọn từ axit amin trong số axit amin cơ bản và có thể là, ví dụ, lysin hoặc arginin.

Cặp axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai có thể áp dụng được với đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào có thể là ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) được chọn từ axit amin trong số cặp axit amin đánh số 1 đến 39 trong bảng 2 và có thể là ít nhất một, ví dụ, một,

hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) được chọn từ nhóm bao gồm, ví dụ, cặp serin ở vị trí 364 và leuxin ở vị trí 368, cặp threonin ở vị trí 394 và threonin ở vị trí 394, cặp axit glutamic ở vị trí 357 và lysin ở vị trí 370, cặp axit glutamic ở vị trí 357 và tyrosin ở vị trí 349, cặp threonin ở vị trí 366 và tyrosin ở vị trí 407, và cặp threonin ở vị trí 394 và valin ở vị trí 397.

Nghĩa là, đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào trong miền CH3 có thể bao gồm việc thế axit amin có điện tích dương cho một gốc axit amin của mỗi axit amin trong số các cặp axit amin, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) được chọn từ axit amin trong số cặp axit amin đánh số từ 1 đến 39 trong bảng 2; và axit amin có điện tích âm cho axit amin khác gốc. Bằng cách lấy ví dụ, trong mỗi axit amin trong số các cặp axit amin, ví dụ, một hoặc nhiều hơn (ví dụ, một), hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) các cặp axit amin được chọn từ nhóm bao gồm cặp serin ở vị trí 364 và leuxin ở vị trí 368, cặp threonin ở vị trí 394 và threonin ở vị trí 394, cặp axit glutamic ở vị trí 357 và lysin ở vị trí 370, cặp axit glutamic ở vị trí 357 và tyrosin ở vị trí 349, cặp threonin ở vị trí 366 và tyrosin ở vị trí 407, và cặp threonin ở vị trí 394 và valin ở vị trí 397, một gốc axit amin được thế bằng axit amin có điện tích dương trong khi axit amin khác gốc được thế bằng axit amin có điện tích âm.

Ví dụ, đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào trong miền CH3 có thể chứa ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) đột biến sau:

đột biến thế serin ở vị trí 364 bằng axit amin có điện tích dương và leuxin ở vị trí 368 bằng axit amin có điện tích âm;

đột biến thế threonin ở vị trí 394 bằng axit amin có điện tích dương và threonin ở vị trí 394 bằng axit amin có điện tích âm;

đột biến thế axit glutamic ở vị trí 357 bằng axit amin có điện tích dương và lysin ở vị trí 370 bằng axit amin có điện tích âm;

đột biến thế axit glutamic ở vị trí 357 bằng axit amin có điện tích dương và tyrosin ở vị trí 349 bằng axit amin có điện tích âm;

đột biến thế threonin ở vị trí 366 bằng axit amin có điện tích dương và tyrosin ở vị trí 407 bằng axit amin có điện tích âm;

đột biến thế threonin ở vị trí 394 bằng axit amin có điện tích dương và valin ở vị trí 397 bằng axit amin có điện tích âm; và

đột biến thế tyrosin ở vị trí 349 bằng axit amin có điện tích dương và axit glutamic ở vị trí 357 bằng axit amin có điện tích âm.

Việc đưa tương tác tĩnh điện này vào trong miền CH3 có thể đạt được tỷ lệ đime hóa dị loại là 60% hoặc cao hơn, 65% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 73% hoặc cao hơn, 75% hoặc cao hơn, 78% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, hoặc 100%.

Đột biến hoán đổi nghĩa là đột biến trong đó hai gốc axit amin cấu thành cặp axit amin được trao đổi (hoán đổi) với nhau.

Như được mô tả trong bảng 2 và Fig. 2, đột biến hoán đổi được áp dụng cho cặp axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai có thể là ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) được chọn từ nhóm bao gồm cặp glutamin ở vị trí 347 và lysin ở vị trí 360, cặp axit glutamic ở vị trí 357 và tyrosin ở vị trí 349, cặp serin ở vị trí 354 và tyrosin ở vị trí 349, cặp axit glutamic ở vị trí 357 và lysin ở vị trí 370, cặp lysin ở vị trí 360 và tyrosin ở vị trí 349, cặp serin ở vị trí 364 và leuxin ở vị trí 368, cặp serin ở vị trí 364 và lysin ở vị trí 370, cặp leuxin ở vị trí 368 và lysin ở vị trí 409, cặp asparagin ở vị trí 390 và serin ở vị trí 400, cặp threonin ở vị trí 394 và valin ở vị trí 397, cặp leuxin ở vị trí 398 và lysin ở vị trí 392, cặp phenylalanin ở vị trí 405 và lysin ở vị trí 409, cặp tyrosin ở vị trí 407 và threonin ở vị trí 366, và cặp threonin ở vị trí 411 và lysin ở vị trí 370 và cụ thể từ nhóm bao gồm cặp serin ở vị trí 364 và lysin ở vị trí 370, cặp tyrosin ở vị trí 407 và threonin ở vị trí 366, cặp axit glutamic ở vị trí 357 và lysin ở vị trí 370, cặp phenylalanin ở vị trí 405 và lysin ở vị trí 409, và cặp axit glutamic ở vị trí 357 và tyrosin ở vị trí 349.

Nghĩa là, đột biến hoán đổi trong miền CH3 có thể bao gồm việc thế trong đó trao đổi (hoán đổi) được tạo ra giữa hai gốc axit amin được bắt cặp trong mỗi cặp axit amin của ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) các cặp axit amin được chọn từ nhóm bao gồm cặp glutamin ở vị trí 347 và lysin ở vị trí 360, cặp axit glutamic ở vị trí 357 và tyrosin ở vị trí 349, cặp serin ở vị trí 354 và tyrosin ở vị trí 349, cặp axit glutamic ở vị trí 357 và lysin ở vị trí 370, cặp lysin ở vị trí 360 và tyrosin ở vị trí 349, cặp serin ở vị trí 364 và leuxin ở vị trí 368, cặp serin ở vị trí 364 và lysin

ở vị trí 370, cặp leuxin ở vị trí 368 và lysin ở vị trí 409, cặp asparagin ở vị trí 390 và serin ở vị trí 400, cặp threonin ở vị trí 394 và valin ở vị trí 397, cặp leuxin ở vị trí 398 và lysin ở vị trí 392, cặp phenylalanin ở vị trí 405 và lysin ở vị trí 409, cặp tyrosin ở vị trí 407 và threonin ở vị trí 366, và cặp threonin ở vị trí 411 và lysin ở vị trí 370; và ví dụ, từ nhóm bao gồm cặp serin ở vị trí 364 và lysin ở vị trí 370, cặp tyrosin ở vị trí 407 và threonin ở vị trí 366, cặp axit glutamic ở vị trí 357 và lysin ở vị trí 370, cặp phenylalanin ở vị trí 405 và lysin ở vị trí 409, và cặp axit glutamic ở vị trí 357 và tyrosin ở vị trí 349.

Ví dụ, đột biến hoán đổi trong miền CH3 có thể bao gồm ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) của các đột biến sau:

đột biến thế serin ở vị trí 364 bằng lysin và lysin ở vị trí 370 bằng serin;

đột biến thế phenylalanin ở vị trí 405 bằng lysin và lysin ở vị trí 409 bằng phenylalanin;

đột biến thế tyrosin ở vị trí 407 bằng threonin và threonin ở vị trí 366 bằng tyrosin;

đột biến thế axit glutamic ở vị trí 357 bằng lysin và lysin ở vị trí 370 bằng axit glutamic;

và

đột biến thế axit glutamic ở vị trí 357 bằng tyrosin và tyrosin ở vị trí 349 bằng serin.

Đột biến hoán đổi này trong miền CH3 có thể đạt được tỷ lệ dime hóa dị loại là 60% hoặc cao hơn, 65% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 73% hoặc cao hơn, 75% hoặc cao hơn, 78% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, hoặc 100%.

Đột biến kích cỡ nghĩa là đột biến trong đó, trong số hai axit amin đã bắt cặp trong ít nhất một cặp axit amin giữa các miền CH3, một gốc được thế bằng axit amin kỵ nước lớn (ví dụ, tryptophan, phenylalanin, v.v.) và gốc còn lại được thế bằng axit amin kỵ nước nhỏ (ví dụ, alanin, glyxin, valin, v.v.) sao cho axit amin lớn được khớp vào khoảng không gian được kẹp bởi axit amin nhỏ, từ đó góp phần vào sự dime hóa dị loại.

Axit amin lớn có thể chứa gốc vòng và có thể được chọn từ nhóm bao gồm tryptophan và phenylalanin, và cụ thể là tryptophan. Axit amin nhỏ có thể được chọn từ nhóm bao gồm alanin, glyxin và valin và có thể là, ví dụ, alanin.

Đột biến kích cỡ được áp dụng cho cặp axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai có thể là ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví

dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) được chọn từ axit amin trong số cặp axit amin đánh số từ 1 đến 40 trong bảng 2 và có thể là, ví dụ, cặp lysin ở vị trí 409 và tyrosin ở vị trí 407, cặp lysin ở vị trí 409 và phenylalanin ở vị trí 405, hoặc tổ hợp của chúng.

Nghĩa là, đột biến kích cỡ có thể là đột biến thể trong đó, hai gốc axit amin được bắt cặp trong mỗi axit amin của ít nhất một, ví dụ, một, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, hai), ba hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba), hoặc bốn hoặc nhiều hơn (ví dụ, bốn) các cặp axit amin được chọn từ axit amin trong số cặp axit amin đánh số từ 1 đến 40 trong bảng 2, một axit amin được thế bằng axit amin kỵ nước lớn (ví dụ, tryptophan, phenylalanin, v.v.), ví dụ, tryptophan trong khi đó axit amin còn lại được thế bằng axit amin kỵ nước nhỏ (ví dụ, alanin, glyxin, valin, v.v.), ví dụ, alanin. Bằng cách lấy ví dụ, trong cặp lysin ở vị trí 409 và tyrosin ở vị trí 407 hoặc cặp lysin ở vị trí 409 và phenylalanin ở vị trí 405, hoặc trong mỗi cặp, một gốc có thể được thế bằng axit amin kỵ nước lớn, ví dụ, phenylalanin hoặc tryptophan trong khi gốc khác có thể được thế bằng axit amin kỵ nước nhỏ, ví dụ, alanin, glyxin, hoặc valin.

Ví dụ, đột biến kích cỡ trong miền CH3 có thể là ít nhất một trong số các đột biến nêu dưới đây:

đột biến thế lysin ở vị trí 409 bằng tryptophan và tyrosin ở vị trí 407 bằng alanin; và

đột biến thế lysin ở vị trí 409 bằng tryptophan và phenylalanin ở vị trí 405 bằng alanin.

Các miền CH3 sửa đổi có thể chứa ít nhất một, ví dụ, một hoặc hai đột biến trong số ba đột biến được mô tả ở trên, nghĩa là, đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào, đột biến hoán đổi, và đột biến kích cỡ.

Để phát huy tác dụng có lợi nhất trên đime hóa, các miền CH3 sửa đổi có thể chứa ít nhất một, ví dụ, một, hai, hoặc ba đột biến được chọn từ nhóm bao gồm việc thế một gốc trong cặp serin ở vị trí 364 và leuxin ở vị trí 368 bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại bằng axit amin có điện tích âm (đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào), trao đổi hai gốc của cặp serin ở vị trí 364 và lysin ở vị trí 370 với nhau (đột biến hoán đổi), và trao đổi hai gốc của cặp phenylalanin ở vị trí 405 và lysin ở vị trí 409 với nhau (đột biến hoán đổi).

Ví dụ, các miền CH3 sửa đổi có thể bao gồm một, hai, hoặc ba của các đột biến sau:

(a) đột biến thế serin ở vị trí 364 bằng axit amin có điện tích dương và leuxin ở vị trí 368 bằng axit amin có điện tích âm;

(b) đột biến thế serin ở vị trí 364 bằng lysin và lysin ở vị trí 370 bằng serin; và

(c) đột biến thế phenylalanin ở vị trí 405 bằng lysin và lysin ở vị trí 409 bằng phenylalanin.

Để giảm tỷ lệ monome hóa, nhưng làm tăng tỷ lệ dime hóa, sự sửa đổi axit amin bổ sung có thể được đưa vào sau ba đột biến đã chọn ((a)-(c)). Như vậy, axit amin đột biến bổ sung có thể được đưa vào axit amin có thể là serin ở vị trí 364, phenylalanin ở vị trí 405, và/hoặc lysin ở vị trí 409. Ví dụ, trong cặp serin ở vị trí 364 và leuxin ở vị trí 368 để trải qua đột biến gây ra bởi tương tác tĩnh điện, khi leuxin ở vị trí 368 có thể được thế bằng axit amin có điện tích âm (axit aspartic hoặc axit glutamic, ví dụ, axit aspartic), serin ở vị trí 364 có thể được thế bằng axit amin có điện tích dương (lysin hoặc arginin) (S364K hoặc S364R; đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào) hoặc với asparagin (S364N). Ngoài ra, trong cặp lysin ở vị trí 370 và serin ở vị trí 364, để trải qua đột biến hoán đổi, lysin ở vị trí 370 có thể được thế bằng serin và serin ở vị trí 364 có thể được thế bằng lysin (S364K; đột biến hoán đổi) hoặc bằng arginin hoặc asparagin (S364R hoặc S364N).

Ngoài ra, trong cặp lysin ở vị trí 409 và phenylalanin ở vị trí 405, để trải qua đột biến hoán đổi, lysin ở vị trí 409 có thể được thế bằng phenylalanin (đối với đột biến hoán đổi) hoặc bằng tryptophan và phenylalanin ở vị trí 405 có thể được thế bằng lysin (F405K; đối với đột biến hoán đổi) hoặc bằng arginin, glutamin hoặc asparagin (F405R, F405Q, hoặc F405N).

Theo một phương án, các miền CH3 sửa đổi có thể bao gồm ít nhất một trong số các đột biến nêu dưới đây:

đột biến thế serin ở vị trí 364 bằng lysin và leuxin ở vị trí 368 bằng axit aspartic;

đột biến thế serin ở vị trí 364 bằng lysin và lysin ở vị trí 370 bằng serin;

đột biến thế phenylalanin ở vị trí 405 bằng lysin và lysin ở vị trí 409 bằng phenylalanin;

đột biến thế phenylalanin ở vị trí 405 bằng arginin và lysin ở vị trí 409 bằng phenylalanin;

đột biến thế phenylalanin ở vị trí 405 bằng lysin và lysin ở vị trí 409 bằng tryptophan;

và

đột biến thế phenylalanin ở vị trí 405 bằng arginin và lysin ở vị trí 409 bằng tryptophan.

Theo một phương án, các miền CH3 cải biến có thể bao gồm ít nhất một đột biến kép sau:

đột biến thế serin ở vị trí 364 trong miền CH3 thứ nhất bằng lysin và leuxin ở vị trí 368 trong miền CH3 thứ hai bằng axit aspartic, và đột biến thế lysin ở vị trí 409 trong miền CH3 thứ nhất bằng phenylalanin và phenylalanin ở vị trí 405 trong miền CH3 thứ hai bằng lysin;

đột biến thế serin ở vị trí 364 trong miền CH3 thứ nhất bằng lysin và leuxin ở vị trí 368 trong miền CH3 thứ hai bằng axit aspartic, và đột biến thế lysin ở vị trí 409 trong miền CH3 thứ nhất bằng phenylalanin và phenylalanin ở vị trí 405 trong miền CH3 thứ hai bằng arginin;

đột biến thế serin ở vị trí 364 trong miền CH3 thứ nhất bằng lysin và lysin ở vị trí 370 trong miền CH3 thứ hai bằng serin, và đột biến thế lysin ở vị trí 409 trong miền CH3 thứ nhất bằng phenylalanin và phenylalanin ở vị trí 405 trong miền CH3 thứ hai bằng lysin;

đột biến thế serin ở vị trí 364 trong miền CH3 thứ nhất bằng lysin và lysin ở vị trí 370 trong miền CH3 thứ hai bằng serin, và đột biến thế lysin ở vị trí 409 trong miền CH3 thứ nhất bằng phenylalanin và phenylalanin ở vị trí 405 trong miền CH3 thứ hai bằng arginin;

đột biến thế serin ở vị trí 364 trong miền CH3 thứ nhất bằng lysin và leuxin ở vị trí 368 trong miền CH3 thứ hai bằng axit aspartic, và đột biến thế lysin ở vị trí 409 trong miền CH3 thứ nhất bằng tryptophan và phenylalanin ở vị trí 405 trong miền CH3 thứ hai bằng lysin;

đột biến thế serin ở vị trí 364 trong miền CH3 thứ nhất bằng lysin và leuxin ở vị trí 368 trong miền CH3 thứ hai bằng axit aspartic, và đột biến thế lysin ở vị trí 409 trong miền CH3 thứ nhất bằng tryptophan và phenylalanin ở vị trí 405 trong miền CH3 thứ hai bằng arginin;

đột biến thế serin ở vị trí 364 trong miền CH3 thứ nhất bằng lysin và lysin ở vị trí 370 trong miền CH3 thứ hai bằng serin, và đột biến thế lysin ở vị trí 409 trong miền CH3 thứ nhất bằng tryptophan và phenylalanin ở vị trí 405 trong miền CH3 thứ hai bằng lysin; hoặc

đột biến thế serin ở vị trí 364 trong miền CH3 thứ nhất bằng lysin và lysin ở vị trí 370 trong miền CH3 thứ hai bằng serin, và đột biến thế lysin ở vị trí 409 trong miền CH3 thứ nhất bằng tryptophan và phenylalanin ở vị trí 405 trong miền CH3 thứ hai bằng arginin.

Đột biến kép này trong miền CH3 có thể dẫn đến tỷ lệ đime hóa là 70% hoặc cao hơn, 75% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, 92% hoặc cao hơn, 93% hoặc cao hơn, 94% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, hoặc 96% hoặc cao hơn.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất kháng thể kháng cúm B bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Khía

cạnh khác của sáng chế đề xuất kháng thể kháng cúm A bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất kháng thể kháng cúm A/kháng cúm B đặc hiệu kép bao gồm kháng thể kháng cúm B bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31, và kháng thể kháng cúm A bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Kháng thể kháng cúm A/ kháng cúm B đặc hiệu kép có thể bao gồm (1) miền CH3 sửa đổi (như được đề cập ở trên, cặp đột biến của CH3-CH3 đã đưa vào); (2) miền CH1 đột biến và miền CL đột biến (như được đề cập ở trên, cặp đột biến của CH1-CL đã đưa vào); hoặc (3) cả miền CH3 sửa đổi, và miền CH1 đột biến và miền CL đột biến.

Protein đặc hiệu kép hoặc kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế là chất đặc hiệu kép được tạo thành theo phương pháp đột biến mặt phân cách tương quan và hài hòa giữa các tiểu đơn vị protein (**Correlated và Harmonious Interfacial Mutation between Protein Subunits**) (sau đây gọi tắt là “Chimps”).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể” đề cập đến lớp glycoprotein có liên quan về mặt cấu trúc bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit, một cặp chuỗi nhẹ (L) có khối lượng phân tử thấp và một cặp chuỗi nặng (H), toàn bộ bốn chuỗi được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua. Cấu trúc của các kháng thể đã được mô tả rõ ràng (xem, ví dụ, [Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., xuất bản lần thứ hai. Raven Press, N. Y. (1989))]. Nói ngắn gọn, mỗi chuỗi nặng thường bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (viết tắt là VH) và vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng thường bao gồm ba miền chức năng, CH1, CH2 và CH3. Các chuỗi nặng được liên kết với nhau qua các liên kết disulfua trong vùng gọi là “vùng bản lề”. Mỗi chuỗi nhẹ thường bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt là VL) và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Vùng hằng định chuỗi nhẹ thường bao gồm một miền chức năng, CL. Thông thường, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng hằng định được thực hiện theo chỉ số EU như được mô tả trong tài liệu [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, xuất bản lần thứ 5 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]. Các vùng VH và VL có thể được chia thêm thành các vùng có khả năng siêu biến (hoặc vùng siêu biến mà có thể siêu biến về trình tự và/hoặc dạng của các vùng được xác định

về mặt cấu trúc), còn được gọi là vùng quyết định bổ sung (CDR), được đặt rải rác với các vùng được bảo tồn nhiều hơn, được gọi là vùng khung (FR). Mỗi VH và VL thường bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy theo trật tự sau đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (cũng xem tài liệu [Chothia và Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)]).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nhánh Fab” đề cập đến một cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ.

Thuật ngữ “vùng Fc”, như được sử dụng ở đây, đề cập đến vùng kháng thể chứa miền CH2 và miền CH3 và có thể tùy ý chứa thêm vùng bản lề.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu kép” đề cập đến kháng thể có tính đặc hiệu kép với ít nhất hai epitop khác nhau, thường là các epitop không chồng lấp.

Thuật ngữ “kháng thể có độ dài đầy đủ”, như được sử dụng ở đây, đề cập đến kháng thể chứa tất cả các miền biến đổi và hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng với các miền thường được tìm thấy trong kháng thể thuộc isotyp đó. Trong một phương án, kháng thể có độ dài đầy đủ chứa hai chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và hai chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ. Như được sử dụng ở đây, “isotyp” đề cập đến lớp kháng thể (ví dụ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, hoặc IgM) được mã hóa bởi các gen vùng hằng định chuỗi nặng.

Thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên” được dự định có nghĩa là phần kháng thể chứa miền biến đổi của kháng thể này và có thể được chọn từ Fab, F(ab')₂, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, (scFv-Fc), v.v. nhưng không bị giới hạn vào đó.

Thuật ngữ “epitop” có nghĩa là quyết định protein có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng thể. Các epitop thường bao gồm các nhóm bề mặt của các phân tử như amino axit hoặc chuỗi bên của đường và thường có các đặc điểm cấu trúc ba chiều đặc hiệu cũng như các đặc điểm điện tích đặc hiệu.

Thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu kép” là chung đối với kháng thể nhận diện và/hoặc liên kết với hai kháng nguyên khác nhau hoặc hai epitop khác nhau (không chồng lên nhau) lên một kháng nguyên. Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép có thể bao gồm một vị trí liên kết kháng nguyên chống lại trực tiếp kháng nguyên tế bào u và vị trí liên kết kháng nguyên khác chống lại trực tiếp phân tử gây ra độc hại tế bào. Bằng cách lấy ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép có thể được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể kháng FcγRI/kháng CD15, kháng thể kháng p185HER2/kháng FcγRIII (CD16), kháng thể kháng CD3/kháng tế bào ung thư B (1D10), kháng thể kháng CD 3/kháng p185HER2, kháng thể kháng CD3/kháng p97, kháng

CD3/kháng thể kháng caxinom tế bào thận, kháng thể kháng CD3/kháng OVCA-3, kháng thể kháng CD3/kháng L-D1 (chống lại ung thư ruột già), kháng thể kháng CD3/kháng hormone tương tự kích thích melanin bào, kháng thể kháng EGF thụ thể/kháng CD3, kháng thể kháng CD3/kháng CAMA1, kháng thể kháng CD3/kháng CD19, kháng thể kháng CD3/MoV18, kháng thể kháng phân tử bám dính tế bào dây thần kinh (NCAM)/kháng CD3, kháng thể kháng folat gắn kết protein (FBP)/kháng CD3, kháng thể kháng caxinom pan liên quan tới kháng nguyên (AMOC-31)/kháng CD3, nhưng không giới hạn ở đó. Theo phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép với một vị trí liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với kháng nguyên u và vị trí liên kết kháng nguyên khác liên kết với độc tố có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể kháng saporin/kháng Id-1, kháng thể kháng CD22/kháng saporin, kháng thể kháng CD7/kháng saporin, kháng thể kháng CD38/kháng saporin, kháng thể kháng CEA/kháng chuỗi rixin A, kháng thể kháng interferon- α (IFN- α)/kháng hybridoma idiotyp, và kháng thể kháng CEA/kháng vinca alkaloid. Theo phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể được chọn từ kháng thể trong số kháng thể để chuyển hóa tiền dược chất hoạt hóa enzym như kháng CD30/kháng alkaline phosphatase (xúc tác chuyển đổi tiền dược chất mitomycin phosphate thành rượu mitomycin), nhưng không giới hạn ở đó. Theo phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể được chọn từ kháng thể trong số các kháng thể có thể được sử dụng làm chất phân hủy fibrin như kháng fibrin/kháng chất kích hoạt plasminogen ở mô (tPA), kháng fibrin/kháng chất kích hoạt plasminogen loại urokinase (uPA), v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Theo phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể được chọn từ kháng thể trong số các kháng thể để gắn phức hợp miễn dịch với các thụ thể bề mặt tế bào như kháng thụ thể lipoprotein với mật độ thấp (LDL)/kháng Fc (ví dụ. Fc γ RI, Fc γ RII hoặc Fc γ RIII), nhưng không giới hạn ở đó. Theo phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể được chọn từ kháng thể để sử dụng điều trị các bệnh lây nhiễm (ví dụ, bệnh nhiễm virus) như kháng cúm A/kháng cúm B, kháng CD3/kháng virus Epstein-Barr (EBV), kháng thụ thể tế bào T : phức hợp CD3/kháng cúm, kháng Fc γ R/kháng HIV, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Theo phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể được chọn từ kháng thể để phát hiện *in vitro* hoặc *in vivo* như kháng CEA/kháng EOTUBE, kháng CEA/kháng DPTA, kháng p185 HER2/kháng hapten, v.v., nhưng không giới hạn ở đó. Theo phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép có thể được chọn từ kháng thể để sử dụng như công cụ chẩn đoán như kháng IgG ở thỏ/kháng ferritin, kháng peroxidase từ cải ngựa (HRP)/kháng hormone, kháng somatostatin/kháng chất P, kháng HRP/kháng FITC, kháng CEA/kháng β -galactosidase, v.v. Theo phương án khác, các ví dụ về kháng thể đặc hiệu kép

bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể gồm cả vị trí liên kết kháng nguyên thứ nhất chống lại trực tiếp CD30 và vị trí liên kết kháng nguyên chống lại trực tiếp erbB2; kháng thể gồm cả vị trí liên kết kháng nguyên thứ nhất chống lại trực tiếp CD30 và vị trí liên kết kháng nguyên thứ hai chống lại trực tiếp *Pseudomonas* exotoxin (PE); kháng thể gồm cả vị trí liên kết kháng nguyên thứ nhất chống lại trực tiếp CD30 và vị trí liên kết kháng nguyên thứ hai chống lại trực tiếp streptavidin.

Theo phương án khác, miền đích của protein đặc hiệu kép có thể bao gồm ít nhất một polypeptit liên kết đặc hiệu đích được chọn từ nhóm bao gồm các protein màng khác nhau, ví dụ, các thụ thể khác nhau (ví dụ, thụ thể tyrosin kinaza (RTK), v.v.), vùng ngoại bào (miền ngoại bào) của các thụ thể, và các phối tử khác nhau (ví dụ, các nhân tố tăng trưởng khác nhau, xytokin, v.v.). Các ví dụ về thụ thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thụ thể của yếu tố hoại tử khối u (TNFR) (ví dụ, TNFR1, TNFR2, v.v.), thụ thể của yếu tố tăng trưởng thượng bì (EGFR) (ví dụ, Her1 (thụ thể của yếu tố tăng trưởng thượng bì 1), Her2 (thụ thể của yếu tố tăng trưởng thượng bì 2 ở người), Her3 (thụ thể của yếu tố tăng trưởng thượng bì 3 ở người), v.v.), thụ thể angiopoietin (ví dụ, Tie1, Tie2, v.v.), thụ thể của yếu tố tăng trưởng chuyển hóa (ví dụ, TGFbR1, TGFbR2, TGFbR3, TGFaR1, v.v.), thụ thể của protein hình thái xương (ví dụ, BMPR1b), thụ thể interleukin (ví dụ, cấu trúc siêu phân tử của thụ thể interleukin 12 beta 1 (IL-12R-b1)), IL-4Ra, IL-12A, IL-4, IL-1R1L, IL-17RA, IL-17A, IL-12R-b2, IL-13Ra1, IL-12B, IL-13, IL-1RAP, IL-17RC, IL-17F, v.v.), integrin (ví dụ, integrin alpha 4 (ITGA4), cấu trúc siêu phân tử integrin alpha 2b (ITGA2B), ITGB1, ITGB3, v.v.), thụ thể interferon (ví dụ, thụ thể interferon-alpha/beta 1 (IFNAR1), IFNAR2, IFNGR, v.v.), Fas (thành viên của siêu họ thụ thể của yếu tố hoại tử khối u 6; TNFRSF6), thụ thể VEGF (ví dụ, Flt1 (fms liên quan đến tyrosin kinaza 1), v.v.), thụ thể của yếu tố tăng trưởng tế bào gan (ví dụ, Met, v.v.), và thụ thể interferon gamma (IFNGR). Phối tử có thể là ít nhất một được chọn từ nhóm bao gồm yếu tố hoại tử khối u (TNF), yếu tố tăng trưởng thượng bì (EGF), yếu tố tăng trưởng tế bào nội mạc mạch máu (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, v.v.), angiopoietin (ví dụ, Ang1, Ang2, v.v.), yếu tố tăng trưởng chuyển đổi (TGF), yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF), protein hình thái xương (ví dụ, BMP2, BMP7, v.v.), interleukin, và interferon, nhưng không giới hạn ở đó.

Thuật ngữ “tế bào chủ”, như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ một tế bào trong đó một vector biểu hiện đã được đưa vào, ví dụ. vector biểu hiện mã hóa kháng thể của sáng chế. Tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm, ví dụ, transfectomas, như tế bào CHO, tế bào HEK293, tế bào NS/0, và tế bào mạch huyết.

Miền CL, miền CH1, và các vùng Fc (ví dụ, các miền CH3) trong kháng thể theo sáng chế có thể được thu từ kháng thể bất kỳ như IgG1, IgG2, IgG3, hoặc kiểu phụ IgG4, IgA, IgE, IgD, hoặc IgM. Kháng thể có thể có nguồn gốc từ động vật có vú bao gồm động vật linh trưởng như người, khỉ, v.v. và loài ngặm nhấm như chuột nhắt, chuột cống, v.v.. Vì kháng thể có nguồn gốc từ động vật có vú thể hiện tính tương đồng về trình tự và tính tương đồng về cấu trúc cao giữa các loài, một lời giải thích đưa ra về miền CL, miền CH1, và miền CH3 trong phần mô tả thường áp dụng cho kháng thể có nguồn gốc từ động vật có vú. Theo một phương án, miền CL, miền CH1, và miền CH3 có thể có nguồn gốc từ IgG (ví dụ, IgG1), nhưng không giới hạn ở đó. Như được đề cập ở trên, vùng Fc trong kháng thể được mô tả trong sáng chế bao gồm hai chuỗi nặng khác nhau (ví dụ, sự khác nhau trong trình tự của miền biến đổi). Ít nhất một axit amin trải qua đột biến để tăng khả năng ổn định hình thành heterodime giữa hai chuỗi nặng khác nhau, nhưng làm giảm khả năng ổn định hình thành homodime giữa hai chuỗi nặng giống nhau của hai chuỗi nặng khác nhau.

Protein đặc hiệu kép, kháng thể đặc hiệu kép, và mảnh liên kết kháng nguyên của nó đề cập trong phần mô tả có thể được tạo thành bằng cách sử dụng các phương tiện và, ví dụ, bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc phương pháp tái tổ hợp. Protein, kháng thể, và các mảnh có thể không có trong tự nhiên.

Vị trí đột biến cần để dimer hóa Fc theo sáng chế được mô tả trong Fig. 2. Đích lên đến 39 vị trí đối với đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào và 14 vị trí đối với đột biến hoán đổi, và 40 vị trí đối với đột biến kích cỡ. Trong Fig. 2, gốc axit amin được thể hiện dưới dạng chữ in hoa theo phương pháp điển hình. Việc đánh số gốc axit amin trong vùng hằng định được thực hiện theo chỉ số EU như được mô tả trong tài liệu [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)].

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất được phạm bao gồm protein đặc hiệu kép hoặc kháng thể đặc hiệu kép đã nói trên và chất mang được dụng tùy ý. Khía cạnh khác đề cập đến việc sử dụng protein đặc hiệu kép hoặc kháng thể đặc hiệu kép đã nói trên trong quá trình bào chế dược phẩm. Khía cạnh khác đề cập đến phương pháp bào chế dược phẩm bao gồm protein đặc hiệu kép hoặc kháng thể đặc hiệu kép đã nói trên.

Kháng thể và chế phẩm chứa nó (ví dụ, dược phẩm) có thể được áp dụng để chẩn đoán và điều trị, và như vậy, có thể được bao gồm trong bộ kit điều trị hoặc chẩn đoán.

Như được sử dụng ở đây, “chất mang được dụng” bao gồm bất kỳ và toàn bộ dung môi thích hợp về mặt sinh lý học, môi trường phân tán, lớp phủ ngoài, chất kháng khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương, chất trì hoãn hấp thụ, chất mang điển hình được sử dụng để bào chế các loại thuốc, tá dược, và chất phụ gia khác. Tốt hơn là, chất mang có thể thích hợp cho sử dụng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, ngoài đường tiêu hóa, trong cột sống, hoặc ở biểu bì (ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền).

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng bằng các phương pháp đã biết khác nhau trong lĩnh vực kỹ thuật này. Như sẽ được đánh giá cao bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, con đường và/hoặc cách thức sử dụng sẽ thay đổi phụ thuộc vào các kết quả mong muốn. Để sử dụng hợp chất theo sáng chế bằng các đường sử dụng nhất định, có thể cần phù hợp chất bằng, hoặc đồng sử dụng hợp chất bằng, vật liệu để ngăn chặn sự bất hoạt của nó. Ví dụ, hợp chất có thể được sử dụng cho đối tượng trong chất mang thích hợp, ví dụ, liposom, hoặc chất pha loãng. Chất pha loãng được dụng bao gồm dung dịch nước muối và dung dịch đệm chứa nước. Chất mang được bao gồm dung dịch chứa nước vô trùng hoặc phân tán và bột vô trùng để sản xuất ngay tức thì dung dịch có thể tiêm được vô trùng hoặc phân tán. Việc sử dụng môi trường và chất này đối với chất có hoạt tính được được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Cụm từ “sử dụng ngoài đường tiêu hóa” và “được sử dụng ngoài đường tiêu hóa”, như được sử dụng ở đây, có nghĩa là các cách thức sử dụng không phải là sử dụng trong ruột và tại chỗ, thường bằng cách tiêm, và bao gồm trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, nội tủy mạch, trong vỏ, trong ổ mắt, trong tim, trong da, trong màng bụng, qua khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới bao, dưới màng nhện, trong cột sống, trên màng cứng và tiêm và truyền trong xương ức.

Các chế phẩm này cũng có thể bao gồm chất phụ như chất bảo quản, chất làm ướt, chất nhũ hóa và chất phân tán. Quá trình ngăn chặn sự có mặt của vi sinh vật có thể được đảm bảo cả bằng các quy trình khử trùng, *supra*, và bằng cách bao gồm các chất kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví dụ, paraben, clobutanol, phenol, axit sorbic, và chất tương tự. Cũng có thể được mong muốn bao gồm các chất đẳng trương, như đường, natri clorua, và chất tương tự vào chế phẩm. Ngoài ra, sự hấp thụ kéo dài của dạng thuốc tiêm có thể được đưa vào bằng cách bao gồm chất trì hoãn hấp thụ như nhôm monostearat và gelatin. Liên quan đến đường sử dụng được chọn, hợp chất theo sáng chế, có thể được sử dụng ở dạng hydrat hóa phù hợp, và/hoặc được phẩm theo sáng chế, được bào chế vào dạng liều dụng bằng các phương pháp thông

thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Liều lượng thực tế của các thành phần hoạt chất trong dược phẩm theo sáng chế có thể được thay đổi để thu được một lượng thành phần hoạt chất có hiệu quả để đạt được đáp ứng điều trị mong muốn cho bệnh nhân cụ thể, chế phẩm và cách thức sử dụng, mà không gây độc cho bệnh nhân. Mức liều lượng được lựa chọn phụ thuộc vào các yếu tố dược động học bao gồm hoạt tính của các chế phẩm cụ thể theo sáng chế được sử dụng, đường sử dụng, thời gian sử dụng, tốc độ bài tiết của hợp chất cụ thể đang được sử dụng, thời gian điều trị, các thuốc, hợp chất và/hoặc vật liệu khác được sử dụng trong tổ hợp với các chế phẩm cụ thể được sử dụng, độ tuổi, giới tính, cân nặng, tình trạng, sức khỏe chung và lịch sử bệnh trước đó của bệnh nhân được điều trị, và như các yếu tố đã biết rõ trong lĩnh vực y tế.

Đối tượng sử dụng có thể được chọn từ among động vật có vú bao gồm động vật linh trưởng như người, người, v.v., loài ngặm nhấm như chuột nhắt, chuột cống, v.v., và loài tương tự, phân lập từ bao gồm tế bào, mô, và dịch cơ thể (ví dụ, máu, v.v.), và sản phẩm được nuôi cấy của chúng.

Tác động có lợi

Sáng chế đề cập đến protein heterodime có độ tinh khiết cao như protein Chimps (ví dụ, kháng thể), không có chất ô nhiễm như homodime hoặc monome, và kỹ thuật tạo ra nó. Ưu điểm khác của sáng chế là để làm tăng độ tinh khiết của kháng thể đặc hiệu kép và để đưa một số lượng tối thiểu các đột biến vào kháng thể tự nhiên, do đó không gây ra thay đổi đáng kể về cấu trúc của kháng thể tự nhiên và làm giảm nguy cơ tạo ra kháng thể dễ trải qua quá trình mất chức năng hoặc tính bất thường và/hoặc dễ suy ra việc loại bỏ miễn dịch.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là một sơ đồ chỉ hiển thị một kháng thể đặc hiệu kép dị dimer hoàn chỉnh (đường tròn đánh dấu chấm) trong số rất nhiều dạng kháng thể có thể cấu thành của kháng thể đặc hiệu kép (10 trong tổng số). A và B đại diện cho các chuỗi nặng tương ứng khác nhau và a và b đại diện cho các chuỗi nhẹ khác nhau.

Fig. 2 thể hiện các vị trí gốc của kháng thể được sử dụng trong tương tác tĩnh điện, hoán đổi, và phương pháp kích thước để tạo ra sự dimer hóa dị loại trong vùng hằng định Fc theo một phương án, và các vị trí gốc liên quan.

Fig. 3 là profil SDS-PAGE thể hiện các kết quả dimer hóa dị loại từ đột biến gây ra bởi

tương tác tĩnh điện được liệt kê trong bảng 4.

Fig. 4 là profil SDS-PAGE thể hiện các kết quả đime hóa dị loại từ đột biến liên quan đến hoán đổi được liệt kê trong bảng 5.

Fig. 5 là profil SDS-PAGE thể hiện các kết quả đime hóa dị loại từ các đột biến liên quan đến kích thước được liệt kê trong bảng 6.

Fig. 6a thể hiện sự so sánh của 12 đột biến cho phép sự đime hóa dị loại nổi bật trong số các đột biến đơn được liệt kê trong bảng 7.

Fig. 6b thể hiện các kết quả đime hóa dị loại sau S364K của hai đột biến chìa khoá được thể bằng các axit amin khác theo một phương án.

Fig. 6c thể hiện các đime hóa dị loại sau F405K của hai đột biến chìa khoá được thể bằng các axit amin khác theo một phương án.

Fig. 6d thể hiện các đime hóa dị loại sau additional đột biến bổ sung được đưa vào ba cặp đột biến chìa khoá-ổ khoá được chọn S364K-L368D, S364K-K370S, và F405K-K409F theo một phương án, trong đó trục x là khối lượng phân tử (kD).

Fig. 7 thể hiện hiệu quả đime hóa dị loại của các đột biến đơn S364K-L368D, S364K-K370S, và F405K-K409F so với các kỹ thuật thông thường (đối chứng KiH, CPC, và AzS). Khi gốc axit amin tương ứng với mỗi đột biến chìa khoá được thay đổi thành các axit amin khác nhau khác, K là tốt nhất cho S364 và K và R (arginin) cho thấy hiệu quả gần như tương tự đối với F405. Các vị trí tại các đột biến đơn được thực hiện trên các chuỗi A và B được chỉ ra và số lượng đime hóa dị loại được thể hiện bằng số.

Fig. 8 thể hiện hiệu quả đime hóa dị loại của toàn bộ bốn cặp đột biến kép so với các kỹ thuật thông thường (đối chứng KiH, CPC, AzS), trong đó bốn đột biến kép được thu bằng cách chọn hai cặp đột biến kép từ tổ hợp của ba cặp đột biến S364K-L368D, S364K-K370S, và F405K-K409F và biến đổi F405 thành hai loại K và R cho mỗi cặp.

Fig. 9a đến 9c là profil SDS-PAGE sau L368, K370, và K409 tương ứng với đột biến chìa khoá trong các cặp đột biến kép được thể bằng các axit amin khác như được chỉ ra trong bảng 6 để xác định hiệu quả tốt hơn khi gốc axit amin tương ứng với đột biến chìa khoá được thay đổi thành các đột biến khác.

Fig. 10 thể hiện các vị trí của các đột biến liên quan đến tương tác tĩnh điện, đột biến liên quan đến kích cỡ, và đột biến liên quan đến hoán đổi trong Fab của kháng thể.

Fig. 11 là một sơ đồ của quy trình thử nghiệm bắt cặp cạnh tranh (CPP).

Fig. 12 thể hiện cách thức bắt cặp được thiết lập thông qua quy trình của Fig. 11 giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và được nhìn trên SDS-PAGE sau 4D9 và 2B9 có các cặp đột biến thông thường C1, DuetMab, và V23 giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tách dòng và đồng biểu hiện.

Fig. 13 là profil SDS-PAGE thể hiện các cách thức bắt cặp khi đột biến liên quan đến tương tác tĩnh điện giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thiết lập bằng cách thế K(lysin) đối với các axit amin đích trên chuỗi A (chuỗi nặng 2B9) và D (axit aspartic) đối với các axit amin đích trên chuỗi B (chuỗi nặng 4D9).

Fig. 14 thể hiện cách thức bắt cặp của đột biến ở vị trí 30 do việc thế chuỗi nặng L145 và chuỗi nhẹ V133 bằng K và D, tương ứng, thể hiện độ chính xác khá cao khi bắt cặp với đột biến trong số các cặp đột biến như kháng thể 4D9 và 2B9 được so sánh trên SDS-PAGE.

Fig. 15 và 16 thể hiện cách thức bắt cặp sau đột biến ở vị trí 29 S131D và/hoặc S131K được đưa vào chuỗi nhẹ của kháng thể trong đó chuỗi nặng L145 được thế bằng E hoặc D và chuỗi nhẹ V133 được thế bằng R, như được phân tích bằng SDS-PAGE.

Fig. 17 thể hiện cách thức bắt cặp của các cặp đột biến ở vị trí 48 (chuỗi nặng S183 và chuỗi nhẹ V133 được thế bằng K(R) và D(E), tương ứng), như được phân tích bằng SDS-PAGE.

Fig. 18 thể hiện cách thức bắt cặp được phân tích bằng SDS-PAGE sau cặp đột biến c29c30c48FΦ29f30f48 thể hiện trong bảng 19 và các biến thể của chúng được đưa vào.

Fig. 19 thể hiện cách thức bắt cặp được phân tích bằng SDS-PAGE sau các cặp đột biến của bảng 20 được đưa vào.

Fig. 20 thể hiện cách thức bắt cặp được phân tích bằng SDS-PAGE sau các cặp đột biến của bảng 21 được đưa vào.

Fig. 21 thể hiện tỷ lệ bắt cặp của các chuỗi sau tổ hợp của các cặp đột biến ở vị trí 34 và 51 được chọn từ các cặp đột biến trong số các cặp đột biến chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đưa vào theo một phương án.

Fig. 22 thể hiện tỷ lệ bắt cặp của các chuỗi sau cặp đột biến c34Φf51 được chọn từ cặp đột biến trong số các cặp đột biến chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đưa vào theo một phương án.

Fig. 23 thể hiện tỷ lệ bất cặp của các chuỗi sau cặp đột biến c40Φf44 được chọn từ cặp đột biến trong số các cặp đột biến chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đưa vào theo một phương án.

Fig. 24 là sơ đồ của kháng thể đặc hiệu kép trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được gây đột biến theo một phương án.

Fig. 25 là một biểu đồ thể hiện độ bền nhiệt của chuỗi A và chuỗi B đối với chuỗi nặng và chuỗi a và chuỗi b đối với chuỗi nhẹ trong kháng thể được tạo thành theo một phương án.

Fig. 26 là một bản đồ phân cắt của pcADN3.

Fig. 27 là biểu đồ thể hiện các kết quả sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) của kháng thể đặc hiệu kép Trabev và Adabev được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c'29c'30c48Φf'29f'30f'48 và cặp đột biến AWBB được đưa vào.

Fig. 28 là biểu đồ thể hiện các kết quả phân tích sắc ký rây phân tử (SEC) của kháng thể đặc hiệu kép Trabev, được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c'29c'30c48Φf'29f'30f'48 và cặp đột biến AWBB được đưa vào.

Fig. 29 là biểu đồ thể hiện các kết quả phân tích sắc ký rây phân tử (SEC) của kháng thể đặc hiệu kép Trabev và Adabev được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c'29c'30c48Φf'29f'30f'48 và cặp đột biến AWBB đột biến được đưa vào.

Fig. 30 thể hiện cách thức dime hóa của kháng thể đặc hiệu kép Trabev và Adabev được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c'29c'30c48Φf'29f'30f'48 và cặp đột biến AWBB được đưa vào.

Fig. 31 là biểu đồ thể hiện ái lực đối với kháng nguyên (Her2 và VEGF) của kháng thể đặc hiệu kép Trabev, được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c'29c'30c48Φf'29f'30f'48 và cặp đột biến AWBB được đưa vào.

Fig. 32 là biểu đồ thể hiện ái lực đối với kháng nguyên (TNF-alpha và VEGF) của kháng thể đặc hiệu kép Adabev, được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c'29c'30c48Φf'29f'30f'48 và cặp đột biến AWBB được đưa vào.

Fig. 33a thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng trình tự giữa vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 ở người và vùng hằng định chuỗi nặng IgA1 ở người (vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 ở người: SEQ ID NO: 33; vùng hằng định chuỗi nặng IgA1 ở người: SEQ ID NO: 34).

Fig. 33b thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng trình tự giữa vùng hằng định kappa và vùng

hằng định lambda của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch ở người (vùng hằng định kappa của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch ở người: SEQ ID NO: 35; và vùng hằng định lambda của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch ở người: SEQ ID NO: 36).

Fig. 33c và 33d thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng trình tự của vùng hằng định chuỗi nặng trong số các kiểu phụ IgG ở người, chuột nhắt, và chuột cống (trình tự miền CH1 trong Fig. 33c và trình tự miền CH3 trong Fig. 33d) (IgG1 ở người: SEQ ID NO: 1, IgG2 ở người: SEQ ID NO: 2, IgG3 ở người: SEQ ID NO: 3, IgG4 ở người: SEQ ID NO: 4, IgG1 ở chuột nhắt: SEQ ID NO: 37, IgG2a^b ở chuột nhắt: SEQ ID NO: 38, IgG2a^a ở chuột nhắt: SEQ ID NO: 39, IgG2b ở chuột nhắt: SEQ ID NO: 40, IgG3 ở chuột nhắt: SEQ ID NO: 41, IgG1 ở chuột cống: SEQ ID NO: 42, IgG2a ở chuột cống: SEQ ID NO: 43, IgG2b ở chuột cống: SEQ ID NO: 44, IgG2c ở chuột cống: SEQ ID NO: 45 trong Fig. 33c (miền CH1); và IgG1 ở người: SEQ ID NO: 15, IgG2 ở người: SEQ ID NO: 16, IgG3 ở người: SEQ ID NO: 17, IgG4 ở người: SEQ ID NO: 18, IgG1 ở chuột nhắt: SEQ ID NO: 46, IgG2a^b ở chuột nhắt : SEQ ID NO: 47, IgG2a^a ở chuột nhắt: SEQ ID NO: 48, IgG2b ở chuột nhắt: SEQ ID NO: 49, IgG3 ở chuột nhắt: SEQ ID NO: 50, IgG1 ở chuột cống: SEQ ID NO: 51, IgG2a ở chuột cống: SEQ ID NO: 52, IgG2b ở chuột cống: SEQ ID NO: 53, và IgG2c ở chuột cống: SEQ ID NO: 54 trong Fig. 33d (miền CH3)).

Fig. 34 thể hiện mức độ bắt cặp giữa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong kháng thể, được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c34Φf51 được đưa vào.

Fig. 35 là biểu đồ thể hiện kết quả HIC của kháng thể đặc hiệu kép Trabev, được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c34Φf51 và cặp đột biến AWBB.

Fig. 36 thể hiện biểu đồ kết quả của HIC của kháng thể đặc hiệu kép Adabev, được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c34Φf51 và cặp đột biến AWBB.

Fig. 37 thể hiện cách thức đime hóa của kháng thể đặc hiệu kép Trabev và Adabev, được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c34Φf51 và cặp đột biến AWBB được đưa vào.

Fig. 38 thể hiện mức độ bắt cặp giữa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong kháng thể, được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c40Φf44 được đưa vào.

Fig. 39 thể hiện biểu đồ kết quả của HIC của kháng thể đặc hiệu kép Trabev, được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c40Φf44 và cặp đột biến AWBB.

Fig. 40 thể hiện biểu đồ kết quả của HIC của kháng thể đặc hiệu kép Adabev, được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c40Φf44 và cặp đột biến AWBB.

Fig. 41 thể hiện cách thức dimer hóa của kháng thể đặc hiệu kép Trabev và Adabev, được tạo thành theo một phương án, có cặp đột biến c40Φf44 và cặp đột biến AWBB được đưa vào.

Fig. 42 là profil SDS-PAGE thể hiện mức độ homodimer hóa khi chuyển nhiễm đơn lẻ Enb-Fc và Fas-Fc, riêng rẽ, theo ví dụ thử nghiệm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng cách tham chiếu tới các ví dụ. Tuy nhiên, được hiểu rằng các ví dụ này chỉ có mục đích mô tả và không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Đối với thực tiễn của sáng chế, toàn bộ mẫu được chuẩn bị theo quy trình sau.

Sự biểu hiện protein

1. Gen đích được tách dòng vào vector biểu hiện (pcADN3 (Invitrogen)).
2. Tế bào HEK293E (ATCC) được nuôi cấy trong DMEM có mức glucoza cao (môi trường Eagle sửa đổi của Dulbecco) được bổ sung bằng 5% FBS (huyết thanh thai bò) trong tủ áp CO₂ được làm ẩm.
3. ADN plasmid đã chuẩn bị được đưa vào bằng cách chuyển nhiễm nhất thời vào tế bào HEK393E phát triển để hợp dòng hoàn toàn. Trước khi chuyển nhiễm, tế bào được rửa bằng PBS (nước muối được đệm phosphat) và, sau đó là trao đổi môi trường nuôi cấy với DMEM có mức glucoza cao không có huyết thanh.
4. Sau khi ủ trong 1 tuần, môi trường đã quy định được sử dụng để thu được protein được lọc sau đó. Protein dung hợp Fc và kháng thể được phân lập bằng sắc ký protein A.
5. Protein đã phân lập được xác định định lượng như được phân tích tại 280nm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Lựa chọn đột biến cho quá trình dimer hóa dị loại của hai vùng Fc

Các vị trí đột biến để dimer hóa dị loại hai vùng Fc (miền CH3; SEQ ID NO: 15) (dựa trên cơ sở IgG1) được mô tả trong Fig. 2. Một phần được tạo ra từ 39 vị trí đối với đột biến liên quan tới tương tác tĩnh điện (đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào) (đại diện bởi “điện tích

J”), 14 vị trí cho đột biến liên quan tới hoán đổi (đột biến hoán đổi) (đại diện bởi “hoán đổi O”), và 40 vị trí cho đột biến liên quan tới kích cỡ (đột biến kích cỡ) (đại diện bởi “kích cỡ B”). Vị trí được lựa chọn cuối cùng trong miền CH3 và các axit amin được gây đột biến tại đó được tóm tắt trong bảng 3. Mỗi đột biến trong số các cặp đột biến được áp dụng cho hai vùng Fc (tương ứng đại diện bởi chuỗi A và chuỗi B) có nguồn gốc từ kháng thể khác nhau, sau đó tách dòng để đồng biểu hiện. Đối với đột biến liên quan đến tương tác tĩnh điện, đột biến được thực hiện để thế các axit amin tương ứng lên chuỗi A bằng K (lysine) đại diện cho các axit amin có điện tích dương và lên B chuỗi bằng D (axit aspartic) đại diện cho các axit amin có điện tích âm. Đột biến liên quan đến hoán đổi được thực hiện để trao đổi các axit amin tương ứng lên chuỗi A và chuỗi B với nhau. Đối với đột biến liên quan đến kích cỡ, các axit amin tương ứng được thế bằng W (tryptophan) lên chuỗi A và với axit amin A có kích cỡ nhỏ (alanine) lên chuỗi B.

Bảng 3

Số thứ tự cặp axit amin	Điện tích (J)		Hoán đổi (O)		Kích cỡ (B)	
	Chuỗi A	Chuỗi B	Chuỗi A	Chuỗi B	Chuỗi A	Chuỗi B
1	Q347K	K360D	Q347K	K360Q	Q347W	K360A
2	Y349K	S354D			Y349W	S354A
3	Y349K	E357			Y349W	E357A
4	Y349K	K360D			Y349W	K360D
5	L351K	L351D			L351W	L351A
6	P352K	P352D			P352W	P352A
7	S354K	Y349D	S354Y	Y349S	S354W	Y349A
8	D356K	K439D			D356W	K439A
9	E357K	Y349D	E357Y	Y349E	E357W	Y349A
10	E357K	K370D	E357K	K370E	E357W	K370A
11	K360K	Q347D			K360W	Q347A
12	K360K	Y349D	K360Y	Y349K	K360W	Y349A
13	S364K	L368D	S364L	L368S	S364W	L368A
14	S364K	K370D	S364K	K370S	S364W	K370A
15	T366K	T366D			T366W	T366A
16	T366K	Y407D			T366W	Y407A
17	L368K	S364D			L368W	S364A
18	L368K	K409D	L368K	K409L	L368W	K409A
19	K370	E357D			K370W	E357A
20	K370	S364D			K370W	S364A
21	K370	T411D			K370W	T411A
22	N390K	S400D	N390S	S400N	N390W	S400A
23	K392	L398D			K392W	L398A

24	T394K	T394D			T394W	T394A
25	T394K	V397D	T394V	V397T	T394W	V397A
26	P395K	P395D			P395W	P395A
27	P395K	V397D			P395W	V397A
28	V397K	T394D			V397W	T394A
29	V397K	P395D			V397W	P395A
30	L398K	K392D	L398K	K392L	L398W	K392A
31	S400K	N390D			S400W	N390A
32	F405K	K409D	F405K	K409F	F405W	K409A
33	Y407K	T366D	Y407T	T366Y	Y407W	T366A
34	Y407K	Y407D			Y407W	Y407A
35	Y407K	K409D			Y407W	K409A
36	K409	L368D			K409W	L368A
37	K409	F405D			K409W	F405A
38	K409	Y407D			K409W	Y407A
39	T411K	K370D	T411K	K370T	T411W	K370A
40					K439W	D356A

Để xác định một cách dễ dàng homodime hoặc heterodime của protein dung hợp Fc thông qua SDS-PAGE, việc dung hợp được tạo ra từ vùng ngoại bào (trình tự mã hóa của vùng 1-771 của SEQ ID NO: 24) của thụ thể TNF-alpha (TNFRSF1B: NP_001057,1 (gen mã hóa: CDS của NM_001066,2; SEQ ID NO: 24)) đối với Fc (gen mã hóa: SEQ ID NO: 26) lên một chuỗi (chuỗi A: Enbrel) và vùng ngoại bào (trình tự mã hóa của vùng 1-519 của SEQ ID NO: 25) của thụ thể Fas (NP_000034.1 (gen mã hóa: CDS của NM_000043,5; SEQ ID NO: 25)) đối với Fc (gen mã hóa: SEQ ID NO: 26) lên chuỗi khác (chuỗi B: Fas), sử dụng vector pcADN3 (xem Fig. 26; Invitrogen) như một trục chính. Monome của chuỗi A có kích cỡ là 53 kD trong khi monome của chuỗi B có kích cỡ là khoảng 44 kD. Vì các chuỗi A và B, mỗi chuỗi có dung hợp vùng ngoại bào Fc, khác nhau về kích cỡ, hai homodime (AA và BB) và một heterodime (AB) có thể được phân biệt một cách dễ dàng trên SDS-PAGE.

Phần trăm (%) dime hóa giữa chuỗi A và giữa chuỗi B (homodime hóa) được biểu hiện là S_{AA} và S_{BB} , tương ứng trong đó S_{AB} chiếm phần trăm (%) của dime hóa giữa các chuỗi A và B (sự dime hóa dị loại).

Khi các cách thức của dime hóa được quan sát bằng SDS-PAGE, tỷ lệ (%) của homodime hóa (AA và BB) và sự dime hóa dị loại (AB) giữa các chuỗi A và B có đột biến của bảng 3 đưa vào được so với tỷ lệ giữa các chuỗi A và B mà không được gây đột biến (đại diện bởi WT). Các kết quả được ra trong bảng 4 và Fig. 3 đối với đột biến gây ra bởi tương tác tĩnh điện, bảng 5 và Fig. 4 đối với đột biến kích cỡ, và bảng 6 và Fig. 5 đối với đột biến liên quan

đến hoán đổi.

Bảng 4

A	W T	Y349 K	Y349 K	S354K	E356K	E357 K	E357K	S364K	T366 K	T394 K	T394 K	T411K
B	W T	E357D	K360 D	Y349 D	K439 D	Y349 D	K370 D	L368 D	Y407 D	T394D	V397 D	K370 D
S_A	28	11	5	27	10	15	12	0	0	11	10	15
S_{AB}	46	70	60	63	64	75	78	100	75	79	73	67
S_{BB}	26	19	35	10	26	10	10	0	25	10	17	18

Bảng 5

A	E357Y	E357K	S364L	S364K	F405K	Y407T	T411K
B	Y349E	K370E	L368S	K370S	K409F	T366Y	K370T
S_{AA}	8	4	8	0	0	10	13
S_{AB}	71	80	61	90	70	83	60
S_{BB}	21	16	31	10	30	7	27

Bảng 6

A	W T	K409W	K409W
B	W T	F405A	Y407A
S_{AA}	22	3	2
S_{AB}	56	60	85
S_{BB}	23	37	13

Trong bảng từ 4 đến 6, đột biến chiếm tỷ lệ dime hóa dị loại (%) là 70% hoặc cao hơn được thể hiện bằng chữ in đậm. Như được hiểu từ số liệu của các bảng từ 4 đến 6, các cặp đột biến đã thử nghiệm thể hiện tỷ lệ dime hóa dị loại là 60% hoặc cao hơn.

Thông qua kết quả, việc lựa chọn được thực hiện từ 12 cặp đột biến đã đưa ra tỷ lệ dime hóa dị loại cao hơn homodime hóa, với tỷ lệ dime hóa dị loại là 70% hoặc cao hơn (đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào: Y349K-E357D, E357K-Y349D, E357K-K370D, S364K-L368D, T366K-Y407D, T394K-T394D, T394K-V397D; và đột biến hoán đổi: E357Y-Y349E, E357K-K370E, S364K-K370S, F405K-K409F, Y407T-T366Y) (được thể hiện bằng chữ in đậm trong bảng 4 và 5).

Mỗi đột biến trong số 12 đột biến gốc axit amin bao gồm trong 12 cặp axit amin đã chọn được đưa vào protein dung hợp Fas-Fc để biểu hiện protein dung hợp Fas-Fc đột biến mà

bao gồm đột biến đơn ở vị trí axit amin, tương ứng. Ở điều kiện tương tự, tỷ lệ sống sót của homodime và monome (S_{sm} ; 1=100%) được so sánh, và các kết quả được mô tả trong bảng 7 và Fig. 6a.

Bảng 7

SM	S_{SM}
E357Y	0,03
Y349D	0,03
K370D	0,06
L368D	0,06
S364K	0,77
K370S	0,05
S400N	0,05
T394D	0,11
F405K	0,67
K409F	0,05
T366A	0,09
T366Y	0,46

Trong bảng 7 và Fig. 6a, hai đột biến S364K và F405K, có tỷ lệ homodime hóa thấp nhưng tỷ lệ sống sót monome cao (50% hoặc cao hơn), được lựa chọn.

Được cho rằng hai đột biến đã chọn đóng vai trò là đột biến “chìa khóa” trong khi các vị trí miền CH3 tương tác với chúng trên chuỗi khác là đột biến “ổ khóa”. Như tổ hợp giữa chúng, ba cặp chìa khóa-ổ khóa S364K-L368D, S364K-K370S, và F405K-K409F được chọn. Các cặp đột biến này được đưa vào chuỗi A (đột biến chìa khóa) và chuỗi B (đột biến ổ khóa) để tạo ra ba cặp đột biến đơn khác nhau (xem bảng 8).

Bảng 8

Đột biến loại	Mẫu	Đột biến đơn chìa khóa	Đột biến đơn ổ khóa
Đưa tương tác tĩnh điện vào	J13	S364K	L368D
Hoán đổi	O14	S364K	K370S
Hoán đổi	O32	F405K	K409F

Axit amin tại các vị trí đột biến chìa khóa tương ứng được thế bằng gốc axit amin khác nhau và thử nghiệm đối với hiệu quả dimer hóa dị loại gây ra bởi đột biến đơn, như được mô tả ở trên, để xác định hiệu quả của các loại đột biến cho sự dimer hóa dị loại tại các vị trí. Đối với S364, việc thế bằng K (lysine) được quan sát để mang lại hiệu quả dimer hóa dị loại cao nhất. Hiệu quả nổi bật được phát hiện khi thế bằng N (asparagine) và R (arginine) (xem Fig. 6b). F405

thể hiện hiệu quả đime hóa dị loại tương tự xuất sắc khi thể bằng K và R và hiệu quả đime hóa dị loại nổi bật khi thể bằng N và Q (glutamin) (xem Fig. 6c).

Các đột biến bổ sung S364N, S364R, F405R, F405N, và F405Q, được xác định trong FIG. 6b và 6c, được áp dụng cho ba cặp đột biến ổ khóa-chìa khóa S364K-L368D, S364K-K370S, và F405K-K409F, để đưa đột biến ổ khóa vào chuỗi A (TNFR2-Fc) và đột biến chìa khóa vào chuỗi B (Fas-Fc), sau đó phân tích hiệu quả đime hóa dị loại trên SDS-PAGE.

Do đó, các kết quả thu được được mô tả trong bảng 9 và Fig. 6d:

Bảng 9

Mẫu	A (TNFR2)	B (Fas)	S _{AA}	S _{AB}	S _{BB}
	Đột biến đơn chìa khóa	Đột biến đơn ổ khóa			
J13(K:D)	S364K	L368D	8	92	0
J13(N:D)	S364N	L368D	8	82	9
J13(R:D)	S364R	L368D	20	79	1
O14(K:S)	S364K	K370S	25	65	9
O14(N:S)	S364N	K370S	13	84	3
O14(R:S)	S364R	K370S	23	76	1
O32(K:F)	F405K	K409F	0	75	25
O32(N:F)	F405N	K409F	21	62	17
O32(Q:F)	F405Q	K409F	5	68	27
O32(R:F)	F405R	K409F	5	89	6

(S_{AA}: tỷ lệ homodime hóa AA (%);

S_{AB}: tỷ lệ đime hóa dị loại AB (%);

S_{BB}: tỷ lệ homodime hóa BB (%))

Ví dụ 2: Thử nghiệm cho sự đime hóa dị loại của vùng Fc bằng đột biến đơn

Ba cặp đột biến chìa khóa-ổ khóa S364K-L368D, S364K-K370S, và F405K-K409F, được chọn trong ví dụ 1, và cặp đột biến F405R-K409F, do việc thay thế F405 bằng R ngoại trừ K, được thử nghiệm cho sự đime hóa dị loại trên SDS-PAGE. Hiệu quả đime hóa dị loại được so với chúng thu được bằng các cặp đột biến Fc heterodime thông thường KiH, CPC, và AzS được sử dụng làm đối chứng.

Số liệu SDS-PAGE trong ví dụ này và toàn bộ các ví dụ sau được thu bằng cách định lượng cường độ dải băng với sự trợ giúp của phần mềm GelQuant.NET.

Các kết quả được mô tả trong bảng 10 và Fig. 7:

Bảng 10

Mẫu	Chuỗi A (eTNFR2)	Chuỗi B (eFas)	S_{AB}	S_A	S_B	S_M	T_m
J13	S364K	L368D	0,93	0,86	0,10	0,48	66,8
O14	S364K	K370S	0,87	0,86	0,07	0,47	67,6
O32	F405K	K409F	0,72	0,91	0,08	0,49	65,2
O32'	F405R	K409F	0,72	0,91	0,08	0,49	65,2
KiH	T366S/L368A/Y407V	T366W	0,90	0,68	0,64	0,66	67,4
CPC	K392D/K409D	E356K/D399K	0,74	0,85	0,30	0,58	66,4
AzS	T350V/T366L/K392L/T394W	T350V/L351Y/F405A/Y407V	0,84	0,84	0,64	0,74	69,2

(S_{AB} : tỷ lệ dime hóa dị loại AB (%); S_A : tỷ lệ homodime hóa AA (%);

S_B : tỷ lệ homodime hóa BB (%); S_M : tỷ lệ sống sót monome (%))

T_m được đo như sau:

Chất thử: Bộ kit nhuộm Invitrogen 4461146 "Protein Thermal Shift™"

Công cụ: Chromo4-PTC200 (MJ Research)

Hỗn hợp phản ứng: 20 μ l trong tổng số

Protein 10 μ l

DW 3 μ l

Đệm Protein Thermal Shift™ 5 μ l

Thuốc nhuộm Protein Thermal Shift™

được pha loãng với tỷ lệ 1/100 2 μ l

Quy trình:

1. Ủ tại nhiệt độ 50,0°C trong 30 giây;
2. Đường cong nóng chảy nằm trong khoảng từ 50,0°C đến 90,0°C, đọc tại mỗi 0,2°C, giữ trong 2 giây;
3. Ủ tại nhiệt độ 90,0°C trong 2 phút

4. Ủ tại nhiệt độ 10,0°C suốt

5. Kết thúc

Như được thể hiện trong bảng 10 và Fig. 7, khi mỗi chuỗi A và chuỗi B được biểu hiện riêng lẻ, chuỗi A giữ lại đột biến chìa khóa không tạo thành homodime, nhưng được biểu hiện như monome. Mẫu do việc đồng biểu hiện được quan sát để bao gồm không có homodime, nhưng chủ yếu là heterodime (xem Fig. 7).

Ví dụ 3: Sự dime hóa dị loại của vùng Fc bởi đột biến kép

Homodime hóa do sự tồn tại của các đột biến chìa khóa trên cả hai chuỗi A và B có độ tin cậy ít hơn trên mỗi chuỗi. Hai cặp đột biến kép được tạo ra từ tổ hợp của ba cặp đột biến được chọn trong ví dụ 1. Đối với mỗi cặp đột biến kép, F405 bị biến đổi thành hai loại K và R. Do đó, toàn bộ bốn cặp đột biến kép được thu. Cặp đột biến kép đã tìm thấy này được phân tích để dime hóa dị loại trên SDS-PAGE và hiệu quả dime hóa được so với hiệu quả dime hóa của đối chứng KiH, CPC, và AzS.

Các kết quả được đưa ra trong bảng 11 và Fig. 8:

Bảng 11

DMP	Chuỗi A (eTNFR2)	Chuỗi B (eFas)	S_{AB}	S_A	S_B	S_M	T_m
J13/O32	S364K/K409F	L368D/F405K	0,96	1,00	0,74	0,87	58,2
J13/O32'	S364K/K409F	L368D/F405R	0,95	1,00	0,73	0,87	61,5
O14PO32	S364K/K409F	K370S/F405K	0,95	1,00	0,72	0,86	64,1
O14/O32'	S364K/K409F	K370S/F405R	0,93	1,00	0,71	0,86	64,4
KiH	T366S/L368A/Y407V	T366W	0,91	0,64	0,61	0,63	67,4
CPC	K392D/K409D	E356K/D399K	0,73	0,81	0,30	0,58	66,4
AzS	T350V/T366L/K392L/T394W	T350V/L351Y/F405A/Y407V	0,84	0,82	0,62	0,72	69,2

Như được thể hiện trong bảng 11 và Fig. 8, các đột biến chìa khóa có trong các chuỗi

cho phép homodimer hóa các chuỗi không xảy ra đối với bốn cặp đột biến khi biểu hiện riêng rẽ. Toàn bộ protein trong một mẫu do việc đồng biểu hiện được quan sát là heterodimer (xem Fig. 8). Ngoài ra, độ bền nhiệt được đo trong cặp đột biến kép có F405R được đưa vào cao hơn F405K được đưa vào (bảng 11).

Để kiểm tra xem có đạt được hiệu quả tốt hơn không khi các axit amin tương ứng với đột biến ở khóa được thế bằng các gốc khác, L368, K370, và K409, là đột biến ở khóa trong các cặp đột biến kép, được thế bằng gốc axit amin khác. Tổ hợp đột biến thu được bằng cách biến đổi khác nhau L368, K370, và K409 được tóm tắt trong bảng 12. Tổ hợp đột biến được kiểm tra để dimer hóa dị loại trên SDS-PAGE (NR: 8% gel SDS-PAGE; mẫu: 24ul lượng nạp), và các kết quả được mô tả trong Fig. 9a đến 9c.

Bảng 12

Biến thể ở khóa

X	Chuỗi A	Chuỗi B	Y	Chuỗi A	Chuỗi B	Z	Chuỗi A	Chuỗi B
UA	S364K/ K409F	L368A/ F405R	XA	S364K/ K409F	K370A/ F405R	ZA	S364K/ K409A	K370S/ F405R
UC	S364K/ K409F	L368C/ F405R	XC	S364K/ K409F	K370C/ F405R	ZC	S364K/ K409C	K370S/ F405R
UD	S364K/ K409F	L368D/ F405R	XD	S364K/ K409F	K370D/ F405R	ZD	S364K/ K409D	K370S/ F405R
UE	S364K/ K409F	L368E/ F405R	XE	S364K/ K409F	K370E/ F405R	ZE	S364K/ K409E	K370S/ F405R
UF	S364K/ K409F	L368F/ F405R	XF	S364K/ K409F	K370F/ F405R	ZF	S364K/ K409F	K370S/ F405R
UG	S364K/ K409F	L368G/ F405R	XG	S364K/ K409F	K370G/ F405R	ZG	S364K/ K409G	K370S/ F405R
UH	S364K/ K409F	L368H/ F405R	XH	S364K/ K409F	K370H/ F405R	ZH	S364K/ K409H	K370S/ F405R
UI	S364K/ K409F	L368I/ F405R	XI	S364K/ K409F	K370I/ F405R	ZI	S364K/ K409I	K370S/ F405R
UK	S364K/ K409F	L368K/ F405R	XK	S364K/ K409F	K370/ F405R	ZK	S364K/ K409K	K370S/ F405R
UL	S364K/ K409F	L368/ F405R	XL	S364K/ K409F	K370L/ F405R	ZL	S364K/ K409L	K370S/ F405R
UM	S364K/	L368M/	XM	S364K/	K370M/	ZM	S364K/	K370S/

	K409F	F405R		K409F	F405R		K409M	F405R
UN	S364K/ K409F	L368N/ F405R	XN	S364K/ K409F	K370N/ F405R	ZN	S364K/ K409N	K370S/ F405R
UQ	S364K/ K409F	L368Q/ F405R	XQ	S364K/ K409F	K370Q/ F405R	ZQ	S364K/ K409Q	K370S/ F405R
UR	S364K/ K409F	L368R/ F405R	XR	S364K/ K409F	K370R/ F405R	ZR	S364K/ K409R	K370S/ F405R
US	S364K/ K409F	L368S/ F405R	XS	S364K/ K409F	K370S/ F405R	ZS	S364K/ K409S	K370S/ F405R
UT	S364K/ K409F	L368T/ F405R	XT	S364K/ K409F	K370T/ F405R	ZT	S364K/ K409T	K370S/ F405R
UV	S364K/ K409F	L368V/ F405R	XV	S364K/ K409F	K370V/ F405R	ZV	S364K/ K409V	K370S/ F405R
UW	S364K/ K409F	L368W/ F405R	XW	S364K/ K409F	K370W/ F405R	ZW	S364K/ K409W	K370S/ F405R
UY	S364K/ K409F	L368Y/ F405R	XY	S364K/ K409F	K370Y/ F405R	ZY	S364K/ K409Y	K370S/ F405R

Các tổ hợp được đo đối với độ bền nhiệt (xem ví dụ 2) và các kết quả được đưa ra trong bảng 13.

Bảng 13

	Chuỗi A	Chuỗi B	Tm
UC	S364K/K409F	L368C/F405R	63,8
UD	S364K/K409F	L368D/F405R	60,8
UL	S364K/K409F	L368/F405R	63,0
UW	S364K/K409F	L368W/F405R	61,2
UY	S364K/K409F	L368Y/F405R	61,2
ZF	S364K/K409F	K370S/F405R	65,6
ZH	S364K/K409H	K370S/F405R	64,4
ZI	S364K/K409I	K370S/F405R	62,4
ZN	S364K/K409N	K370S/F405R	61,0
ZR	S364K/K409R	K370S/F405R	62,8
ZT	S364K/K409T	K370S/F405R	65,4

ZV	S364K/K409V	K370S/F405R	66,0
ZW	S364K/K409W	K370S/F405R	67,0
ZY	S364K/K409Y	K370S/F405R	63,8

Phân tích cho thấy độ bền nhiệt của K409W (tryptophan) cao hơn K409F.

Dựa trên số liệu thu được ở trên, các đột biến được tạo ra từ S364K và K409W vào chuỗi A và K370S và F405R vào chuỗi B để sản xuất cặp đột biến kép, cặp đột biến AWBB đã chỉ định, để sử dụng trong thử nghiệm đime hóa dị loại Fc sau của miền CH3.

Ví dụ 4: Lựa chọn đột biến cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong kháng thể Fab

Để lựa chọn đột biến trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể, đột biến liên quan đến tương tác tĩnh điện, đột biến liên quan đến kích cỡ, và đột biến liên quan đến hoán đổi được thực hiện. Các vị trí tương tác tại chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mô tả trong Fig. 10.

Để xác định một cách dễ dàng các đột biến trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, kháng thể có chuỗi nhẹ giống nhau được tách dòng. Kháng thể 4D9 (kháng thể kháng cúm A) và kháng thể 2B9 (kháng thể kháng cúm B), đều là kháng thể kháng cúm, có cùng chuỗi nhẹ (chuỗi nhẹ thông thường: CLC). Vì chúng có cùng chuỗi nhẹ, phân tích SDS-PAGE cho phép sự tương tác giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ để hiểu được một cách dễ dàng. Mặc dù đồng nhất trong trình tự axit amin của chuỗi nhẹ, hai kháng thể 4D9 và 2B9 khác nhau về trình tự và kích cỡ của chuỗi nặng (chuỗi nặng của 2B9 có nhiều gốc axit amin gấp 6 lần so với 4D9 và kích cỡ (50130,62 Daltons) lớn hơn 4D9 (49499,98 Daltons): chúng có thể được phân biệt một cách rõ ràng trên SDS-PAGE). Do đó, phân tích kích cỡ trên SDS-PAGE giúp cho việc hiểu được chuỗi nào trong hai chuỗi này tương tác với chuỗi nhẹ.

Trình tự các axit amin và trình tự axit nucleic mã hóa của nó trong vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của hai kháng thể 4D9 và 2B9 được liệt kê trong bảng 14, bên dưới.

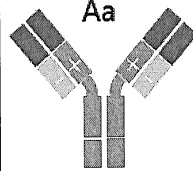
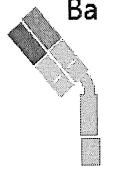
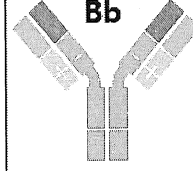
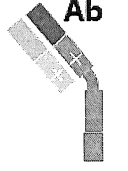
Bảng 14

	Trình tự axit amin	Trình tự axit nucleic
Vùng biến đổi chuỗi nặng 2B9	EVQLVESGGGLVQPGK SLRLSCAATGFTFDDYA MHWVRQAPGKGLEW VSSLNWKGNVDYADS VRGRFTMSRDNAKKLV YLQMNGLRGDDTAVY	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCT GGGGGAGGCTTGGTACAGCCT GGCAAGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCACTGGATTACATT TGACGATTACGCCATGCACTG GGTCCGCCAAGCTCCAGGGAA

	FCAKDNKADASMDYY YHHGMDVWGQGTTVT VSS (SEQ ID NO: 27)	GGGCCTGGAGTGGGTCTCAAG TCTTAATTGGAAGGGAAATAG TGTAGACTACGCGGACTCTGTG AGGGGCCGATTACCATGTCC AGAGACAACGCCAAGAACTA GTGTATCTGCAAATGAACGGT CTGAGAGGTGACGACACGGCC GTCTATTTTTGTGCAAAAGATA ATAAAGCGGATGCATCTATGG ACTACTACTACCACCACGGTAT GGACGTCTGGGGCCAAGGGAC CACGGTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO: 28)
Vùng biến đổi chuỗi nặng 4D9	QVTLRESGPGLVKPSET LSLTCTISGASINTDYW SWIRQPPGKGLEWIGYI YYRGRTNYPNPSLRSRV TISVDTSKNQFSL QMTSMTAADTAVYYC ARDVTGISRENAFDIWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 29)	CAGGTCACCTTGAGGGAGTCG GGCCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCTGTCCCTCACCT GCACTATCTCCGGTGCCTCCAT CAATACTGACTACTGGAGCTG GATCCGGCAGCCCCCAGGGAA GGGACTGGAGTGGATTGGCTA TATCTATTACAGAGGGCGCAC CAACTACAACCCCTCCCTCAGG AGCCGAGTCACCATATCAGTA GACACGTCCAAGAATCAATTC TCCCTG CAGATGACGTCTATGACCGCT GCTGACACGGCCGTATATTACT GTGCGAGAGATGTGACTGGCA TCAGTCGAGAAAATGCTTTTGA TATCTGGGGCCAAGGCACCCT GGTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO: 30)
Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CLC)	AIRMTQSPSSLASVGD RVTITCRASQSIGYLN WYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQSYSIPTTFGQGT RLEIK (SEQ ID NO: 31)	GCCATCCGGATGACCCAGTCTC CATCCTCCCTGTCTGCATCTGT AGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCAAGTCAGAGCAT TAGCGGCTATTAAATTGGTAT CAGCAGAAACCAGGGAAAGCC CCTAAGCTCTTGATCTATGCTG CATCCAGTTTGCAGAGTGGGG TCCCATCAAGGTTTCAGTGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCA CTCTCACCATCAGCAGTCTGCA ACCTGAAGATTTTGCAACTTAC TACTGTCAACAGAGCTACAGT ATCCCCACCACCTTCGGCCAAG GGACACGACTGGAGATTAAA (SEQ ID NO: 32)

Hai kháng thể 4D9 và 2B9 sử dụng vùng hằng định của IgG1 làm vùng hằng định chuỗi nặng và vùng hằng định kappa làm vùng hằng định của chuỗi nhẹ.

Việc kiểm tra đã được thực hiện để xem liệu chuỗi nhẹ có đột biến được đưa vào các cặp chỉ với chuỗi nặng có đột biến tương tác với đột biến của chuỗi nhẹ. Về vấn đề này, chuỗi nhẹ, chuỗi nặng bắt cặp với chuỗi nhẹ, và chuỗi nặng tạo thành sự bắt cặp nhầm với chuỗi nhẹ được đồng biểu hiện để tạo ra kháng thể. Phân tích SDS-PAGE của kháng thể trong tình trạng giảm có thể xác định mức độ mà các cặp được tạo thành chính xác. Để thuận tiện, chuỗi nặng 4D9 được gọi là chuỗi A và chuỗi nhẹ bắt cặp với nó là chuỗi a, và chuỗi nặng 2B9 được gọi là chuỗi B và chuỗi nhẹ bắt cặp với nó là chuỗi b (xem hình minh họa dưới đây).

Chuỗi nặng A (+)		B(-)	
Chuỗi nhẹ a (-)		b(+)	
Chuỗi nặng B (-)		A(+)	
Sản phẩm	Aa  bắt cặp Ba  bắt cặp nhầm	Sản phẩm	Bb  bắt cặp Ab  bắt cặp nhầm

Đầu tiên, 4D9 và 2B9 có các cặp đột biến thông thường giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, đã được biết là có hiệu quả, được tách dòng và đồng biểu hiện. Cách thức bắt cặp được thực hiện thông qua việc cạnh tranh giữa chuỗi đột biến thu được, do đó, hai chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ được kiểm tra trên SDS-PAGE. (Thử nghiệm bắt cặp cạnh tranh (CPP)). Quá trình thực hiện thử nghiệm bắt cặp cạnh tranh (CPP) được minh họa bằng sơ đồ trong Fig. 11, và do đó kết quả thu được được mô tả trong Fig. 12. Như được thể hiện trong Fig. 12, tất cả các cặp đột biến đã biết đều đồng thời trải qua việc bắt cặp bình thường và bắt cặp nhầm bất thường.

Đối với đột biến liên quan đến tương tác tĩnh điện giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, kháng thể trong đó các cặp đột biến khác nhau được đưa vào bằng cách thế các axit amin tương ứng

trong chuỗi B (chuỗi nặng 2B9) với K (lysin) và trong chuỗi A (chuỗi nặng 4D9) với D (axit aspartic) được đưa vào thử nghiệm CPP trên SDS-PAGE (xem Fig. 11).

Kết quả là, bảy cặp đột biến ứng viên được xác định để trải qua sự bắt cặp chính xác một cách tương đối được sàng lọc trong nhóm đột biến liên quan đến tương tác tĩnh điện. Các kết quả thử nghiệm CPP trên SDS-PAGE của kháng thể mà bảy cặp đột biến đã sàng lọc được đưa vào đó được đưa ra trong bảng 15 và được mô tả trong Fig. 13.

Bảng 15

Số thứ tự	SOP (Các cặp trực giao đối xứng)	A (4D9)	B (2B9)	a	b	a^{CPP}	b^{CPP}	S^{CPP}
c	cΦf	L145	L145	S131	S131			
1	c29Φf29	L145D	L145K	S131K	S131D	58	50	54
2	c30Φf30	L145D	L145K	V133K	V133D	50	79	65
3	c34Φf34	K147D	K147K	T180K	T180D	49	87	68
4	c40Φf40	F170D	F170K	L135K	L135D	59	61	60
5	c44Φf44	P171D	P171K	S162K	S162D	59	51	55
6	c48Φf48	S183D	S183K	V133K	V133D	62	80	72
7	c51Φf51	V185D	V185K	L135K	L135D	67	73	70

$$(\text{Số điểm CPP } (S^{CPP}) = \frac{1}{2}(a^{CPP} + b^{CPP}))$$

$$a^{CPP} = 100(C_{aA})/(C_{aA} + C_{aB}) = 100(C_A)/(C_A + C_B)$$

$$b^{CPP} = 100(C_{bB})/(C_{bB} + C_{bA}) = 100(C_B)/(C_A + C_B)$$

So sánh trên SDS-PAGE đã tìm thấy một vài cặp đột biến trải qua sự bắt cặp chính xác một cách tương đối trong danh sách của các cặp đột biến sử dụng kháng thể 4D9 (chuỗi A) và 2B9 (chuỗi B) (được thể hiện bằng chữ in đậm trong bảng 15). Để nghiên cứu thêm, đột biến ở vị trí 30 (biểu hiện là c30Φf30) được sửa đổi như trong bảng 16.

Bảng 16

Đột biến c30Φf30			
	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	Độ chính xác khi bắt cặp
Aa (4D9)	L145D	V133R	75%
Bb (2B9)	L145R	V133D	60%

Đột biến ở vị trí 30 do việc thế chuỗi nặng L145 và chuỗi nhẹ V133 với K và D, tương ứng. Như được hiểu từ số liệu của bảng 16, hiệu quả (độ chính xác khi bắt cặp: tỷ lệ bắt cặp Aa hoặc tỷ lệ bắt cặp Bb) được quan sát là tốt (độ chính xác khi bắt cặp Aa 75%, độ chính xác khi bắt cặp Bb: 60%) đối với các biến thể trong đó chuỗi nặng L145 và chuỗi nhẹ V133 được thế

bằng R và D, tương ứng (xem Fig. 14).

Bổ sung đột biến S131D trên chuỗi nhẹ (đột biến ở vị trí 29 đã chỉ định) vào đột biến ở vị trí 30 hoặc các biến thể của nó (chuỗi nặng L145 và chuỗi nhẹ V133 được thế bằng K hoặc R, và D hoặc E, tương ứng) cải thiện độ chính xác khi bắt cặp (xem bảng 17 và Fig. 15 (kết quả $c^{29}c^{R30}\Phi f^{R30}$; độ chính xác khi bắt cặp Aa: 80% và độ chính xác khi bắt cặp Bb: 70%) và Fig. 16 (kết quả $c^{R29}c^{RE30}\Phi f^{R29}f^{RE30}$; độ chính xác khi bắt cặp Aa: 90% và độ chính xác khi bắt cặp Bb: 80%)).

Bảng 17

	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	Độ chính xác khi bắt cặp
$c^{29}c^{R30}\Phi f^{R30}$			
Aa (4D9)	L145D	V133R	80%
Bb (2B9)	L145R	S131D/V133D	70%
$c^{R29}c^{RE30}\Phi f^{R29}f^{RE30}$			
Aa (4D9)	L145E	S131K/V133R	90%
Bb (2B9)	L145R	S131D/V133E	80%

Như có thể được thấy trong Fig. 14 và 15, độ chính xác nổi bật khi bắt cặp được phát hiện trong các trường hợp mà trong đó chuỗi nặng L145 và chuỗi nhẹ V133 được thế bằng R và D, tương ứng và trong đó việc thế các chuỗi nhẹ S131 và V133 được tạo ra tương ứng bởi K và R, hoặc D và E cũng như trong đột biến ở vị trí 30 trong đó chuỗi nặng L145 và chuỗi nhẹ V133 được thế bằng K và D, tương ứng.

Ngoài ra, cặp đột biến trong đó chuỗi nặng S183 và chuỗi nhẹ V133 được thế một cách tương ứng bằng K (hoặc R) và D (hoặc E) (đột biến ở vị trí 48 đã chỉ định) cũng được quan sát là có hiệu quả (bảng 18 và Fig. 17 (độ chính xác khi bắt cặp Aa (dải dưới): 45%, độ chính xác khi bắt cặp Bb (dải trên): 95%)).

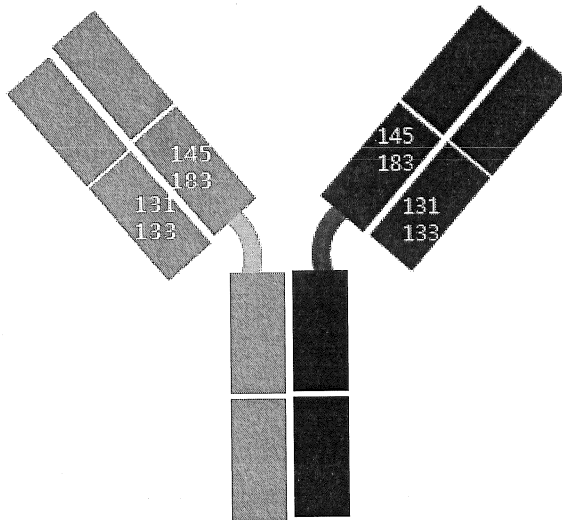
Bảng 18

LC	V133K (a)	V133D (b)
Chuỗi nặng 2B9 (B)	S183K	
Chuỗi nặng 4D9 (A)	S183D	
mg/L	2,6	2,4

Kháng thể bao gồm tổ hợp của đột biến ở vị trí 29, đột biến ở vị trí 30, và đột biến ở vị trí 48 đã nói trên ($c^{29}c^{30}c^{48}F\Phi^{29}f^{30}f^{48}$) hoặc các biến thể của chúng được tạo thành (xem bảng 19) và sau đó kiểm tra đối với độ chính xác khi bắt cặp. Các kết quả được mô tả trong Fig. 18 (dải dưới: bắt cặp Aa; và dải trên: bắt cặp Bb):

Bảng 19

	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ	Độ chính xác khi bắt cặp
$c^R29c^{RE}30c48\Phi f^R29f^{RE}30f48$			
Aa (4D9)	L145E/S183D	S131K/V133R	100%
Bb (2B9)	L145R/S183K	S131D/V133E	90%
Đột biến 1			
Aa (4D9)	L145D/S183D	S131K/V133K	85%
Bb (2B9)	L145K/S183K	S131D/V133D	90%
Đột biến 2			
Aa (4D9)	L145D/S183D	S131D/V133K	95%
Bb (2B9)	L145K/S183K	S131K/V133D	95%



Ngoài ra, kháng thể bao gồm cặp đột biến khác nhau của ít nhất một đột biến ở vị trí 29, đột biến ở vị trí 30, và đột biến ở vị trí 48 (xem bảng 20) được kiểm tra đối với độ chính xác khi bắt cặp và các kết quả được mô tả trong Fig. 19 (dải dưới: bắt cặp Aa; và dải trên: bắt cặp Bb):

Bảng 20

Số thứ tự	1	2	3	4	5
C	$c30\Phi f30$	$c^R30\Phi f^R30$	$c29c^R30\Phi f^R30$	$c^R29c^{RE}30\Phi f^R29f^{RE}30$	$c^R29c^{RE}30f48\Phi f^R29f^{RE}30f48$
LC	V133 K (a)	V133 D (b)	V133 R	V133R	S131D/ V133D
4D9 (A)	L145D	L145D	L145D	L145E	L145E/S183D
2B9 (B)	L145K	L145R	L145R	L145R	L145R/S183K
Aa	79%	67%	80%	90%	100%

Bb	50%	62%	70%	80%	90%
----	-----	-----	-----	-----	-----

(Aa: độ chính xác khi bắt cặp Aa; Bb: độ chính xác khi bắt cặp Bb)

Ngoài ra, tổ hợp của đột biến ở vị trí 29, đột biến ở vị trí 30, và đột biến ở vị trí 48 được hoán đổi giữa D và E để tìm kiếm các tổ hợp cho phép bắt cặp chính xác một cách tương đối (bảng 21 và Fig. 20).

Bảng 21

Số thứ tự	A	B	a	b	Aa	Bb
0	L145K/S183K	L145D/S183D	S131D/V133D	S131K/V133K	65%	100%
ab	L145K/S183K	L145E/S183E	S131D/V133D	S131K/V133K	95%	95%
gh	L145K/S183K	L145D/S183D	S131E/V133E	S131K/V133K	100%	100%
abgh	L145K/S183K	L145E/S183E	S131E/V133E	S131K/V133K	100%	100%

(Aa: độ chính xác khi bắt cặp Aa; Bb: độ chính xác khi bắt cặp Bb)

Như có thể thấy được trong bảng 21 và Fig. 20, toàn bộ các cặp đột biến đã thử nghiệm ab, gh, và abgh thể hiện độ chính xác khi bắt cặp là 65% hoặc cao hơn, hoặc 95% hoặc cao hơn. Trong số chúng, abgh được chọn và chỉ định là cặp đột biến c'29c'30c48Φf 29f 30f 48.

Các tổ hợp của các cặp đột biến ở vị trí 34 và 51 được chọn từ cặp đột biến trong số các cặp đột biến đột biến được nhận dạng trong bảng 15 được đưa vào các chuỗi được thử nghiệm để bắt cặp và các kết quả được đưa ra trong bảng 22 và Fig. 21.

Bảng 22

LC	L135K/T180K (a)	L135D/T180D (b)
Chuỗi nặng 4D9 (A)	K147D/V185D	
Chuỗi nặng 2B9 (B)	K147/V185K	
Aa (%)	95%	
Bb (%)	62%	

Ngoài ra, đột biến ở vị trí 34 và đột biến ở vị trí 51 của cặp 15 được đưa vào để thay đổi từ K sang R và từ D sang E, sau đó thử nghiệm bắt cặp để phát hiện tổ hợp có độ chính xác khi bắt cặp được cải thiện. Do vậy, tổ hợp trong đó mỗi L135 và T180 trên chuỗi nhẹ được thế bằng E có độ chính xác khi bắt cặp được cải thiện và chỉ định là cặp đột biến c34Φf51 (xem bảng 23 và Fig. 22).

Bảng 23

LC	L135K/T180K (a)	L135E/T180E (b)
Chuỗi nặng 4D9 (A)	K147D/V185D	
Chuỗi nặng 2B9 (B)	K147/V185K	
Aa(%)	95%	
Bb(%)	86%	

Tìm thấy nhiều cặp đột biến khác nhau trong bảng 15, tổ hợp của đột biến ở vị trí 40 và đột biến ở vị trí 44 cũng được đưa ra để cải thiện độ chính xác khi bắt cặp.

Ngoài ra, toàn bộ các cặp đột biến được đưa vào để trao đổi giữa K và R và giữa D và E để tìm kiếm tổ hợp cho phép ghép đôi chính xác nhất. Tổ hợp là cặp đột biến trong đó chuỗi nhẹ L135 được thế bằng R và E, và được gọi là cặp đột biến c40Φf44 (xem bảng 24 và Fig. 23):

Bảng 24

LC	L135R/S162K (a)	L135E/S162D (b)
Chuỗi nặng 4D9 (A)	F170D/P171D	
Chuỗi nặng 2B9 (B)	F170K/P171K	
Aa(%)	95%	
Bb(%)	84%	

Ví dụ 5: Sự hình thành kháng thể đặc hiệu kép bằng cách liên kết giữa chuỗi nặng và giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

5.1. Kháng thể đặc hiệu kép có cặp đột biến c`29c`30c48Φf`29f`30f`48 được đưa vào

5.1.1. Kiểm tra sự liên kết giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bằng cách sử dụng kháng thể 4D9/2B9

Kháng thể được tạo ra bằng cách liên kết chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm cặp đột biến c`29c`30c48Φf`29f`30f`48 (xem bảng 25):

Bảng 25

Kháng thể	Vùng hằng định chuỗi nặng (HC: CH1)	Vùng hằng định chuỗi nhẹ (LC)
4D9 (Aa)	L145E/S183E	S131K/V133K
2B9 (Bb)	L145K/S183K	S131E/V133E

Để kiểm tra tính chính xác của việc ghép đôi giữa chuỗi A, chuỗi B, chuỗi a, và chuỗi b trong kháng thể đặc hiệu kép, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ riêng lẻ được đồng biểu hiện trong toàn bộ tổ hợp có thể có của các cặp bình thường và các lỗi sai bất thường. Mức độ biểu hiện được đo bằng SDS-PAGE được thu trong bảng 26, bên dưới. Độ bền nhiệt (T_m) của các tổ hợp được đo và các kết quả được đưa ra trong bảng 27 và Fig. 25:

Bảng 26

HC	A		B	
LC	a	b	a	b
Lượng biểu hiện	89,8mg/l	18,8 mg/l	24,5 mg/l	68,5 mg/l

Bảng 27

Các cặp	Tm
4D9 WT	69,9 ±2,00
2B9 WT	69,1 ±1,50
Aa	70,3 ±1,70
Ab	58,5 ±11,96
Bb	68,7 ±0,92
Ba	58,6 ±0,53

Độ bền nhiệt (Tm) được đo bằng cách tham chiếu đến phương pháp được giải thích trong ví dụ 2.

Như được thể hiện trong các bảng 26 và 27 và Fig. 25, kháng thể đặc hiệu kép có cặp đột biến c`29c`30c48Φf`29f`30f`48 đã đưa vào được tìm thấy ở mức độ biểu hiện và độ bền nhiệt đối với việc ghép đôi bình thường (Aa/Bb) cao hơn so với việc ghép đôi bất thường (Ab/Ba).

5.1.2. Kháng thể đặc hiệu kép Trastuzumab/Bevacizumab hoặc kháng thể đặc hiệu kép Adalimumab/Bevacizumab

Trastuzumab (Herceptin®; Roche), Bevacizumab (Avastin™, Roche), và Adalimumab (Humira®; AbbVie) được mua và đưa vào sắp xếp theo chuỗi axit amin (Viện khoa học cơ bản Hàn Quốc, Hàn Quốc). cADN tương ứng với trình tự các axit amin được tổng hợp và sử dụng để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép mà cặp đột biến c`29c`30c48Φf`29f`30f`48 và cặp đột biến AWBB của miền CH3 được chọn trong ví dụ 3 được đưa vào trong các tổ hợp thể hiện trong bảng 28, bên dưới (vectơ pcADN3 (xem Fig. 26) đã sử dụng).

Bảng 28

Kháng thể	Vùng hằng định chuỗi nặng (HC)		Vùng hằng định của chuỗi nhẹ (LC)
	CH1	CH3	
Trabev			
Trastuzumab (Aa)	L145E/S183E	S364K/K409W	S131K/V133K
Bevacizumab (Bb)	L145K/S183K	K370S/F405R	S131E/V133E

Adabev			
Adalimumab (Aa)	L145E/S183E	S364K/K409W	S131K/V133K
Bevacizumab (Bb)	L145K/S183K	K370S/F405R	S131E/V133E

Kháng thể đặc hiệu kép Trabev và Adabev được đưa vào sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) trong điều kiện sau đây và các kết quả được mô tả trong Fig. 27 (trục y: giá trị (mAU); và trục x: thời gian (phút)):

Dụng cụ: HPLC-U3000

Cột: MAbPac Hic-20

Tốc độ chảy: 0,2mL/phút

Quá trình dò: UV, 280nm

Pha động: amoni axetat 0,10 M, độ pH = 7,0

Đường dẫn của protein thu được thông qua cột HIC tạo thành các đỉnh ở các điểm thời gian khác nhau phụ thuộc vào tính kỵ nước của protein, trong đó việc tạo ra kháng thể đặc hiệu kép chính xác có thể được tính. Như có thể được thấy trong Fig. 27, các đỉnh đối với kháng thể đặc hiệu kép được heterodime hóa (Trabev và Adabev) được quan sát rõ ràng giữa các đỉnh của kháng thể homodime khác nhau (Trastuzumab và Bevacizumab, hoặc Adalimumab và Bevacizumab), chỉ ra việc tạo thành tốt kháng thể đặc hiệu kép, mỗi kháng thể bao gồm một nửa từ hai kháng thể khác nhau.

Ngoài ra, kháng thể đặc hiệu kép Trabev và Adabev do đo thu được được đưa vào phân tích sắc ký rây phân tử (SEC), và các kết quả được đưa ra trong bảng 29 và Fig. 28 và 29 (trục x: thời gian (phút)):

Dụng cụ: HPLC-U3000

Cột: sắc ký rây phân tử T SKgel G3000SWXL Tosoh Bioscience

Tốc độ chảy: 1,0mL/phút

Quá trình dò: UV, 280nm

Pha động: Tris-HCl 25mM (độ pH = 8,5), NaCl 150 mM

Bảng 29

WT (Kháng thể đặc hiệu đơn)	BsAb (Kháng thể đặc hiệu kép)
1A.Trastuzumab 8,007 phút	1" Trabev 7,847 phút
1B.Bevacizumab 7,743 phút	2" Adabev 7,833 phút
2A.Adalimumab 7,987 phút	

Trong phân tích SEC, các đỉnh được phát hiện theo kích thước protein và có thể làm sáng tỏ sự kết cụm protein. Như được thể hiện trong bảng 29 và Fig. 28 và 29, các đỉnh đối với kháng thể đặc hiệu kép có mặt giữa các đỉnh của hai kháng thể tương ứng trên trục thời gian, chỉ ra sự hình thành tốt của kháng thể đặc hiệu kép.

Ngoài ra, cách thức heterodime hóa kháng thể đặc hiệu kép Trabev và Adabev trên SDS-PAGE được mô tả trong Fig. 30. Như có thể được thấy trong Fig. 30, kháng thể đặc hiệu kép Trabev và Adabev, là heterodime, được phát hiện dưới dạng các dải đơn kích cỡ trung gian giữa Trastuzumab và Bevacizumab và giữa Adalimumab và Bevacizumab, tương ứng. Các kết quả này có nghĩa là kháng thể đặc hiệu kép không phải là homodime, nhưng được tạo ra chỉ như kết quả của việc bắt cặp bình thường.

Thông qua ELISA, thử nghiệm được thực hiện để kiểm tra xem BsAb có liên kết hiệu quả với các kháng nguyên tương ứng (Trastuzumab: Her2), Bevacizumab (VEGF), và Adalimumab (TNF-alpha).

Ái lực đối với kháng nguyên được đo như sau:

Chất thử

Phát hiện kháng thể: kappa-HRP của dê kháng người (southern biotech, 2060-05)

Dung dịch đơn TMB (LIFE TECHNOLOGY, 002023)

Công cụ

Máy đọc khay vi thể chính xác Emax (thiết bị phân tử)

Quy trình

Đệm phủ: đệm cacbonat, độ pH = 9,6

Đệm phong bế: đệm phong bế không có protein (TBS) (Thermo scientific)

Đệm rửa: 0,05%(khối lượng/thể tích) Tween20 trong TBS, độ pH = 7,4 (TBST)

Pha loãng: 0,05%(khối lượng/thể tích) Tween20 trong TBS, độ pH = 7,4

Đệm dừng: dung dịch axit clohydric 1N (HCl)

Quy trình

Lớp phủ: pha loãng kháng nguyên trong đệm phủ, nạp 100 ul pha loãng cho mỗi giếng, và ủ tại nhiệt độ 4°C qua đêm (Her2, VEGF: 50ng/giếng, TNF-alpha: 100ng/giếng);

Rửa 3 lần bằng đệm rửa;

Phong bế: nạp 300 ul đệm phong bế, ủ tại nhiệt độ trong phòng (RT) trong 1 giờ;

Rửa 3 lần bằng đệm rửa;

Gắn kết: nạp kháng thể tại phân ước của 100ng/giếng, và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ;

Rửa 3 lần bằng đệm rửa;

Phát hiện kháng thể: pha loãng kappa-HRP của dê kháng người trong TBST tại tỷ lệ là 1:4000 và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ;

Rửa 3 lần bằng đệm rửa

Detection: tải 100 ul dung dịch TMB mỗi giếng, ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 3 phút trong bóng tối;

Dung dịch dừng: tải 100 ul HCl 1N mỗi giếng;

Đọc: đọc ở mật độ quang là 450nm

Do đó, các kết quả thu được được đưa ra trong bảng 30 và Fig. 31 (đối với Trabev) và trong bảng 31 và Fig. 32 (đối với Adabev):

Bảng 30

Kháng nguyên	Her2			VEGF		
Kháng thể	Trastuzumab	Bevacizumab	Tra-bev	Trastuzumab	Bevacizumab	Tra-bev
O.D	2,50	0,05	2,54	0,65	2,89	2,04
	2,96	0,05	2,60	0,70	2,88	2,25
	2,58	0,04	2,49	0,60	3,12	2,36
Trung bình	2,68	0,05	2,54	0,65	2,96	2,22
Trống	0,05			0,05		

Bảng 31

Kháng nguyên	TNF-alpha			VEGF		
Kháng thể	Adalimumab	Bevacizumab	Ada-bev	Adalimumab	Bevacizumab	Ada-bev
O.D	1,24	0,23	0,93	0,07	2,24	2,37
	1,26	0,22	1,16	0,06	2,27	2,28
	1,19	0,27	1,09	0,07	2,60	2,47
Trung bình	1,23	0,24	1,06	0,07	2,37	2,37
Trống	0,06			0,06		

Như được thể hiện trong bảng 29 và Fig. 31, kháng thể đặc hiệu kép Trabev được tìm thấy để gắn kết với cả Her2 và VEGF, là các kháng nguyên tương ứng của Trastuzumab và Bevacizumab. Tương tự, số liệu trong bảng 30 và Fig. 32 chứng minh rằng kháng thể đặc hiệu kép Adabev gắn kết với TNF-alpha và VEGF, là các kháng nguyên tương ứng của Adalimumab và Bevacizumab. Các kết quả này xác nhận rằng hai kháng thể đặc hiệu kép sử dụng các chức năng mong muốn thông thường được tạo ra thành công.

5.2. Kháng thể đặc hiệu kép có cặp đột biến c34Φf51 được đưa vào

Tham chiếu tới ví dụ 5.1.1, kháng thể có cặp đột biến c34Φf51 (xem bảng 23) đưa vào 4D9 (Aa) và 2B9 (Bb) của nó được tạo ra. Đối với mỗi chuỗi nặng, các chuỗi nhẹ a và b được đồng biểu hiện, và tỷ lệ bắt cặp giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đo trên SDS-PAGE (tiền hành đối với mỗi chuỗi nặng A và B). Tm được đo như trong ví dụ 2, và các kết quả được đưa ra trong bảng 32, bên dưới và Fig. 34.

Bảng 32

	Thử nghiệm 1		Thử nghiệm 2	
HC	A (K147D/V185D)		B (K147/V185K)	
LC	a (L135K/T180K)	b (L135E/T180E)	b (L135E/T180E)	a (L135K/T180K)
q	90%	10%	89%	11%
Tm	65,8	N/A	65,8	N/A

(q: tỷ lệ bắt cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng (%); N/A: không có sẵn)

Như được thể hiện trong bảng 32 và Fig. 34, các cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ bình thường (Aa và Bb) được tạo thành tại tỷ lệ là cao bằng 90% và 89%, tương ứng, và thể hiện độ bền nhiệt cao.

Ngoài ra, kháng thể đặc hiệu kép Trabev (Aa: Trastuzumab; Bb: Bevacizumab) và

Adabev (Aa: Adalimumab; Bb: Bevacizumab) mà mỗi cặp đột biến c34Φf51 và cặp đột biến AWBB miền CH3 (Aa: S364K/K409W; Bb: K370S/F405R) được chọn trong ví dụ 3 được đưa vào đó, được tạo ra bằng cách sử dụng Trastuzumab (Herceptin®; Roche), Bevacizumab (Avastin™; Roche), và Adalimumab (Humira®; AbbVie) theo cách tương tự như quy trình cấu thành kháng thể đặc hiệu kép của ví dụ 5.1.2.

Kháng thể đặc hiệu kép Trabev và Adabev đã tạo thành, mỗi kháng thể có cặp đột biến c34Φf51 và cặp đột biến AWBB được đưa vào đó được phân tích sử dụng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) bằng cách tham chiếu tới phương pháp của ví dụ 5.1.2.

Số liệu phân tích thu được được đưa ra trong bảng 33 và Fig. 35 (đối với Trabev) và trong bảng 34 và Fig. 36 (đối với Adabev).

Bảng 33

# Bộ 1	Kháng thể	Thời gian (phút)
Aa	Trastuzumab	23,41
Bb	Bevacizumab	38,05
1AB	Trabev	29,13

Bảng 34

# Bộ 2	Kháng thể	Thời gian (phút)
Aa	Adalimumab	22,07
Bb	Bevacizumab	38,05
2AB	Adabev	30,21

Như có thể thấy được trong bảng 33 và Fig. 35 và trong bảng 34 và Fig. 36, đỉnh của mỗi kháng thể đặc hiệu kép dị dimer (Trabev và Adabev) được quan sát rõ rệt giữa các đỉnh của hai kháng thể đặc hiệu đơn tương ứng (Trastuzumab và Bevacizumab, hoặc Adalimumab và Bevacizumab). Các kết quả ngụ ý việc tạo thành tốt của kháng thể đặc hiệu kép có cặp đột biến c34Φf51 và cặp đột biến AWBB được đưa vào, mỗi kháng thể bao gồm các nửa từ hai kháng thể khác nhau.

Ngoài ra, cách thức heterodimer hóa của kháng thể đặc hiệu kép có cặp đột biến c34Φf51 và cặp đột biến AWBB được đưa vào được mô tả trong Fig. 37 (SDS-PAGE gel 6%, điều kiện không giảm). Như có thể được thấy trong Fig. 37, đưa đồng thời cặp đột biến c34Φf51 và cặp đột biến AWBB vào kháng thể đã biết được tìm thấy để tạo ra heterodimer tinh khiết như được

phân tích bằng SDS-PAGE.

5.3. Kháng thể đặc hiệu kép có cặp đột biến c40Φf44 được đưa vào

Tham chiếu tới ví dụ 5.1.1, kháng thể có cặp đột biến c40Φf44 (xem bảng 24) đưa vào 4D9 (Aa) và 2B9 (Bb) của nó được tạo thành. Đối với mỗi chuỗi nặng, chuỗi nhẹ a và b được đồng đồng biểu hiện, và tỷ lệ bất cặp giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đo trên SDS-PAGE (thực hiện đối với mỗi chuỗi nặng A và B). T_m được đo như trong ví dụ 2, và các kết quả được đưa ra trong bảng 35, bên dưới và Fig. 38.

Bảng 35

HC	A (F170D/P171D)		B (F170K/P171K)	
LC	a (L135R/S162K)	b (L135E/S162D)	b (L135E/S162D)	a (L135R/S162K)
q	99%	1%	99%	1%
T _m	65,0	N/A	63,4	N/A

(q: tỷ lệ bất cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng (%); N/A: không có sẵn)

Như được thể hiện trong bảng 35 và Fig. 38, các cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ bình thường (Aa và Bb) đều được tạo thành tại tỷ lệ là cao bằng 99%, và thể hiện độ bền nhiệt cao.

Ngoài ra, kháng thể đặc hiệu kép Trabev (Aa: Trastuzumab; Bb: Bevacizumab) và Adabev (Aa: Adalimumab; Bb: Bevacizumab) được đưa vào cặp đột biến c40Φf44 và cặp đột biến AWBB (A: S364K/K409W; B: K370S/F405R) được tạo thành sử dụng Trastuzumab (Herceptin®; Roche), Bevacizumab (Avastin™; Roche), và Adalimumab (Humira®; AbbVie) theo cách tương tự như quy trình tạo thành kháng thể đặc hiệu kép của ví dụ 5.1.2.

Kháng thể đặc hiệu kép Trabev và Adabev đã tạo thành, mỗi kháng thể có cặp đột biến c40Φf44 và cặp đột biến AWBB đưa vào đó, được phân tích sử dụng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) bằng cách tham chiếu tới phương pháp của ví dụ 5.1.2.

Số liệu phân tích thu được được đưa ra trong bảng 36 và Fig. 39 (đối với Trabev) và trong bảng 37 và Fig. 40 (đối với Adabev).

Bảng 36

# Bộ 1	Kháng thể	Thời gian (phút)
Aa	Trastuzumab	23,41
Bb	Bevacizumab	38,05

1AB	Trabev	26,11
------------	---------------	--------------

Bảng 37

# Bộ 2	Kháng thể	Thời gian (phút)
Aa	Adalimumab	22,07
Bb	Bevacizumab	38,05
2AB	Adabev	31,97

Như có thể thấy được trong bảng 36 và Fig. 39 và trong bảng 37 và Fig. 40, đỉnh của mỗi kháng thể đặc hiệu kép dị đime (Trabev và Adabev) được quan sát rõ rệt giữa các đỉnh của hai kháng thể đặc hiệu đơn tương ứng (Trastuzumab và Bevacizumab, hoặc Adalimumab và Bevacizumab). Các kết quả ngụ ý việc tạo thành tốt của kháng thể đặc hiệu kép có cặp đột biến c40Φf44 và cặp đột biến AWBB được đưa vào, mỗi kháng thể bao gồm các nửa từ hai kháng thể khác nhau. Ngoài ra, chỉ một đỉnh xuất hiện rõ rệt giữa hai kháng thể đặc hiệu đơn chỉ ra rằng chỉ có một loại bất cặp bình thường được thực hiện mà không có sự nhầm lẫn giữa hai chuỗi nặng và giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Ngoài ra, cách thức heterodime hóa kháng thể đặc hiệu kép có cặp đột biến c40Φf44 và cặp đột biến AWBB được đưa vào được mô tả trong Fig. 41 (SDS-PAGE gel 6%, điều kiện không giảm. Như có thể được thấy trong Fig. 41, việc đưa đồng thời cặp đột biến c40Φf44 và cặp đột biến AWBB vào kháng thể đã biết được tìm thấy để tạo thành heterodime tinh khiết như được phân tích bằng SDS-PAGE.

Ví dụ thử nghiệm 1

Tỷ lệ đime hóa dị loại được kiểm tra đối với các trường hợp trong đó các đột biến của miền CH3 được đề xuất ở đây, khác với các đột biến được gợi ý trong các ví dụ từ 1 đến 3 mặc dù các cặp axit amin đồng nhất, được đưa vào.

Để so sánh, các đột biến của bảng 38 được đưa vào protein dung hợp TNFRSF1B-Fc (Enbrel; Enb) và protein dung hợp Fas-Fc (Fas) được tạo thành bằng cách tham chiếu tới ví dụ 1 (thể hiện như BEAT-A và BEAT-B).

Bảng 38

	Enb	Fas
AW/BB	AW (S364K/K409W)	BB (K370S/F405R)

BEAT-A	S364K/K409W	K370T/F405A
BEAT-B	S364T/K409R	K370T/F405S

Protein dung hợp TNFRSF1B-Fc (chuỗi A) và protein dung hợp Fas-Fc có đột biến miền CH3 được chọn trong ví dụ 3, đại diện cho các đột biến miền CH3 được đề xuất trong phần mô tả (ví dụ, chuỗi A có S364K và K409W được đưa vào và chuỗi B có K370S và F405R được đưa vào) (thể hiện như AW/BB trong bảng 38) được tạo ra.

Khi Enb-Fc và Fas-Fc có các cặp đột biến được liệt kê trong bảng 38 được đưa vào quá trình chuyển nhiễm đơn, cách thức homodimer hóa được quan sát trên SDS-PAGE. Các kết quả được đưa ra trong Fig. 42.

Như có thể được thấy trong Fig. 42, AW/BB thể hiện phần trăm homodimer cao hơn monome được phát hiện trong BEAT-A và BEAT-B. Trên cơ sở của kết quả, BEAT-A và BEAT-B có nhiều khả năng hình thành homodimer hơn AW/BB khi có sự khác biệt về mức độ biểu hiện giữa chuỗi A và chuỗi B. Nếu một lượng lớn homodimer được tạo ra khi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được kết hợp để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép, heterodimer chính xác khó tách khỏi homodimer vì hầu như không khác biệt về tính chất vật lý giữa heterodimer và homodimer. Do đó, tối thiểu hóa homodimer hóa rất quan trọng để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép có độ tinh khiết cao. Tổ hợp của các đột biến cho phép sự dimer hóa dị loại càng ít càng tốt là ưu điểm để tạo ra của kháng thể đặc hiệu kép.

Số liệu thể hiện rằng BEAT-A và BEAT-B có khả năng dimer hóa dị loại thấp do tỷ lệ homodimer hóa cao so với AW/BB và gây khó khăn cho việc phân lập heterodimer một cách chính xác.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein đặc hiệu kép để nhắm tới hai loại đích khác nhau, trong đó protein đặc hiệu kép này chứa miền CH3 thứ nhất hoặc vùng Fc thứ nhất chứa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai hoặc vùng Fc thứ hai chứa miền CH3 thứ hai, trong đó

miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai được gây đột biến sao cho cặp axit amin tạo thành liên kết axit amin-axit amin tương ứng giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai được cải biến như nêu dưới đây;

mỗi miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai độc lập có nguồn gốc từ globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4; và

miền CH3 đột biến bao gồm:

(1) lysin ở vị trí 405 và phenylalanin ở vị trí 409; hoặc

(2) lysin ở vị trí 364 và serin ở vị trí 370, và phenylalanin hoặc tryptophan ở vị trí 409 và lysin hoặc arginin ở vị trí 405,

trong đó vị trí dựa trên cơ sở miền CH3 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 (đánh số EU).

2. Protein đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó miền CH3 bao gồm:

lysin ở vị trí 364 và serin ở vị trí 370; và

phenylalanin ở vị trí 409 và lysin hoặc arginin ở vị trí 405, hoặc tryptophan ở vị trí 409 và arginin ở vị trí 405,

trong đó vị trí dựa trên cơ sở miền CH3 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 (đánh số EU).

3. Protein đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó miền CH3 bao gồm:

phenylalanin ở vị trí 409 và lysin ở vị trí 405,

trong đó vị trí dựa trên cơ sở miền CH3 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 (đánh số EU).

4. Protein đặc hiệu kép theo điểm 3, trong đó

miền CH3 cũng bao gồm đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào, và

đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào là đột biến trong đó, cặp axit amin của serin ở vị trí 364 và leuxin ở vị trí 368 dựa trên cơ sở miền CH3 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 (đánh số EU), một axit amin được thế bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại

được thế bằng axit amin có điện tích âm.

5. Protein đặc hiệu kép theo điểm 4, trong đó axit amin có điện tích âm là axit aspartic hoặc axit glutamic, và axit amin có điện tích dương là lysin hoặc arginin.

6. Protein đặc hiệu kép theo điểm 3, trong đó đột biến có đưa tương tác tĩnh điện vào là đột biến trong đó, dựa trên cơ sở miền CH3 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 (đánh số EU), serin ở vị trí 364 được thế bằng axit amin có điện tích dương được chọn từ lysin và arginin, và leuxin ở vị trí 368r được thế bằng axit amin có điện tích âm được chọn từ axit aspartic và axit glutamic.

7. Protein đặc hiệu kép theo điểm 6, trong đó axit amin có điện tích âm là axit aspartic hoặc axit glutamic, và axit amin có điện tích dương là lysin hoặc arginin.

8. Protein đặc hiệu kép theo điểm 2, trong đó miền CH3 bao gồm:

lysine ở vị trí 364 và serin ở vị trí 370; và

tryptophan ở vị trí 409 và arginin ở vị trí 405,

dựa trên cơ sở miền CH3 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 (đánh số EU).

9. Protein đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 và 8, trong đó protein đặc hiệu kép là ít nhất một được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể đặc hiệu; mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể đặc hiệu, chất tương tự kháng thể đặc hiệu, và protein dung hợp của polypeptit liên kết đặc hiệu đích và vùng Fc hoặc miền CH3.

10. Protein đặc hiệu kép theo điểm 9, trong đó polypeptit liên kết đặc hiệu đích được chọn từ nhóm bao gồm thụ thể, vùng ngoại bào, và phối tử.

11. Protein đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 và 8, trong đó

protein đặc hiệu kép là kháng thể đặc hiệu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa miền CH1 thứ nhất và miền CL thứ nhất (vùng hằng định chuỗi nhẹ) có nguồn gốc tương ứng từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể nhận diện epitop thứ nhất và miền CH1 thứ hai và miền CL thứ hai có nguồn gốc tương ứng từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể nhận diện epitop thứ hai, và

kháng thể đặc hiệu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cũng bao gồm đột biến trong đó, trong đó hai axit amin cấu thành cặp axit amin như sau, một axit amin được thế bằng axit amin có điện tích dương và axit amin còn lại được thế bằng axit amin có điện tích âm, dựa trên cơ sở miền CH1 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, và miền CL của loại kappa (đánh số EU):

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và serin ở vị trí 131 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp serin ở vị trí 183 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp lysin ở vị trí 147 trong miền CH1 và threonin ở vị trí 180 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp valin ở vị trí 185 trong miền CH1 và leuxin ở vị trí 135 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp phenylalanin ở vị trí 170 trong miền CH1 và leuxin ở vị trí 135 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp prolin ở vị trí 171 trong miền CH1 và serin ở vị trí 162 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và serin ở vị trí 131 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda, và cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và serin ở vị trí 131 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda, và cặp serin ở vị trí 183 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda, hoặc

cặp phenylalanin ở vị trí 170 trong miền CH1 và leuxin ở vị trí 135 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda, và cặp prolin ở vị trí 171 trong miền CH1 và serin ở vị trí 162 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

trong đó axit amin có điện tích dương là lysin hoặc arginin, và axit amin có điện tích âm là axit aspartic hoặc axit glutamic.

12. Protein đặc hiệu kép theo điểm 11, trong đó:

các axit amin được thể một cách tương ứng trong miền CH1 thứ nhất và miền CH1 thứ hai có điện tích trái dấu,

các axit amin được thể một cách tương ứng trong miền CL thứ nhất và miền CH1 thứ nhất có điện tích trái dấu, và

các axit amin được thể một cách tương ứng trong miền CL thứ hai và miền CH1 thứ

hai có điện tích trái dấu.

13. Protein đặc hiệu kép theo điểm 11, chứa miền CH1 được cải biến và miền CL được cải biến, trong đó, hai axit amin cấu thành cặp axit amin như sau, một axit amin được thế bằng axit amin có điện tích dương được chọn từ lysin và arginin và axit amin còn lại được thế bằng axit amin có điện tích âm được chọn từ axit aspartic và axit glutamic, dựa trên cơ sở miền CH1 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, và miền CL của loại kappa (đánh số EU):

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và serin ở vị trí 131 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda, hoặc

cặp serin ở vị trí 183 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda.

14. Protein đặc hiệu kép theo điểm 11, chứa miền CH1 được cải biến và miền CL được cải biến, trong đó, hai axit amin cấu thành cặp axit amin như sau, một axit amin được thế bằng axit amin có điện tích dương được chọn từ lysin và arginin và axit amin còn lại được thế bằng axit amin có điện tích âm được chọn từ axit aspartic và axit glutamic, dựa trên cơ sở miền CH1 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, và miền CL của loại kappa (đánh số EU):

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và serin ở vị trí 131 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda, và

cặp serin ở vị trí 183 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda.

15. Protein đặc hiệu kép theo điểm 11, chứa:

miền CH3 được cải biến chứa lysin ở vị trí 364 và serin ở vị trí 370; và tryptophan ở vị trí 409 và lysin hoặc arginin ở vị trí 405, dựa trên cơ sở miền CH3 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 (đánh số EU); và

miền CH1 được cải biến và miền CL được cải biến, trong đó, hai axit amin cấu thành cặp axit amin như sau, một axit amin được thế bằng axit amin có điện tích dương được chọn từ lysin và arginin và axit amin còn lại được thế bằng axit amin có điện tích âm được chọn từ axit aspartic và axit glutamic, dựa trên cơ sở miền CH1 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, và miền CL của loại kappa (đánh số EU):

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và serin ở vị trí 131 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda, và

cặp serin ở vị trí 183 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda.

16. Phương pháp tạo ra protein đặc hiệu kép chứa miền CH3 được cải biến hoặc vùng Fc được cải biến chứa miền CH3 được cải biến và các đích khác nhau nhằm tới, phương pháp bao gồm bước đưa đột biến vào cặp axit amin nêu dưới đây tạo thành liên kết axit amin – axit amin giữa miền CH3 thứ nhất và miền CH3 thứ hai:

(1) thế axit amin ở vị trí 405 bằng lysin và axit amin ở vị trí 409 bằng phenylalanin;

(2) thế axit amin ở vị trí 364 bằng lysin và axit amin ở vị trí 370 bằng serin, và thế axit amin ở vị trí 409 bằng phenylalanin hoặc tryptophan và axit amin ở vị trí 405 bằng lysin hoặc arginin; hoặc

(3) thế axit amin ở vị trí 409 bằng phenylalanin và axit amin ở vị trí 405 bằng lysin, và thế một axit amin của serin ở vị trí 364 và leuxin ở vị trí 368 bằng axit amin có điện tích dương được chọn từ lysin và arginin và axit amin còn lại bằng axit amin có điện tích âm được chọn từ axit aspartic và axit glutamic,

dựa trên cơ sở miền CH3 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 (đánh số EU).

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó

protein đặc hiệu kép là kháng thể đặc hiệu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa miền CH1 thứ nhất và miền CL thứ nhất (vùng hằng định chuỗi nhẹ) có nguồn gốc tương ứng từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể nhận diện epitop thứ nhất và miền CH1 thứ hai và miền CL thứ hai có nguồn gốc tương ứng từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể nhận diện epitop thứ hai, và

phương pháp cũng bao gồm cấu thành đột biến trong đó, hai axit amin tạo thành cặp axit amin nêu sau đây, một axit amin được thế bằng axit amin có điện tích dương được chọn từ lysin và arginin và axit amin còn lại được thế bằng axit amin có điện tích âm được chọn từ axit aspartic và axit glutamic, dựa trên cơ sở miền CH1 của IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4, và miền CL của loại kappa (đánh số EU):

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và serin ở vị trí 131 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp serin ở vị trí 183 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambda,

cặp lysin ở vị trí 147 trong miền CH1 và threonin ở vị trí 180 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambdađ,đ,

cặp valin ở vị trí 185 trong miền CH1 và leuxin ở vị trí 135 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambdađ,đ,

cặp phenylalanin ở vị trí 170 trong miền CH1 và leuxin ở vị trí 135 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambdađ,đ,

cặp prolin ở vị trí 171 trong miền CH1 và serin ở vị trí 162 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambdađ,đ,

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và serin ở vị trí 131 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambdađ,đ, và cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambdađ,đ,

cặp leuxin ở vị trí 145 trong miền CH1 và serin ở vị trí 131 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambdađ,đ, và cặp serin ở vị trí 183 trong miền CH1 và valin ở vị trí 133 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambdađ,đ, hoặc

cặp phenylalanin ở vị trí 170 trong miền CH1 và leuxin ở vị trí 135 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambdađ,đ, và cặp prolin ở vị trí 171 trong miền CH1 và serin ở vị trí 162 trong miền CL hoặc axit amin tương ứng của nó của miền CL của loại lambdađ,đ.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó:

các axit amin được thể một cách tương ứng trong miền CH1 thứ nhất và miền CH1 thứ hai có điện tích trái dấu,

các axit amin được thể một cách tương ứng trong miền CL thứ nhất và miền CH1 thứ nhất có điện tích trái dấu, và

các axit amin được thể một cách tương ứng trong miền CL thứ hai và miền CH1 thứ hai có điện tích trái dấu.

19. Protein đặc hiệu kép theo điểm 11, trong đó

kháng thể nhận diện epitop thứ nhất là kháng thể kháng cúm B chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 31; và

kháng thể nhận diện epitop thứ hai là kháng thể kháng cúm A chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 29 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 31.

20. Protein đặc hiệu kép theo điểm 15, trong đó

kháng thể nhận diện epitop thứ nhất là kháng thể kháng cúm B chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 31; và

kháng thể nhận diện epitop thứ hai là kháng thể kháng cúm A chứa vùng biến đổi chuỗi nặng SEQ ID NO: 29 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 31.

FIG. 1

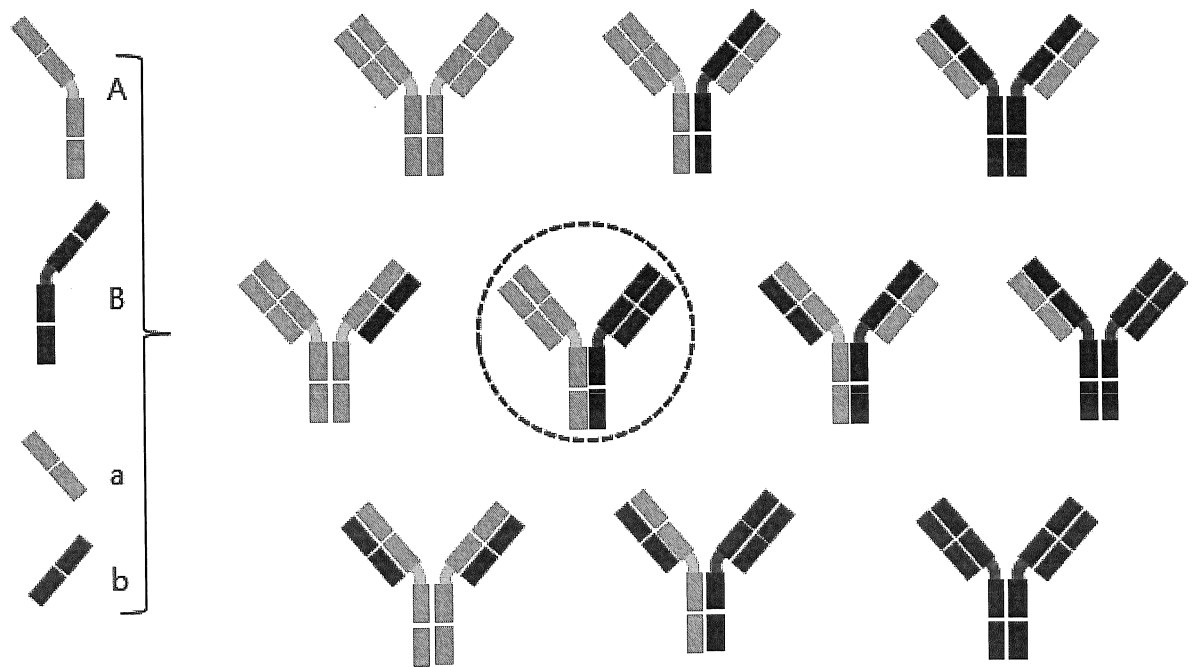


FIG. 2

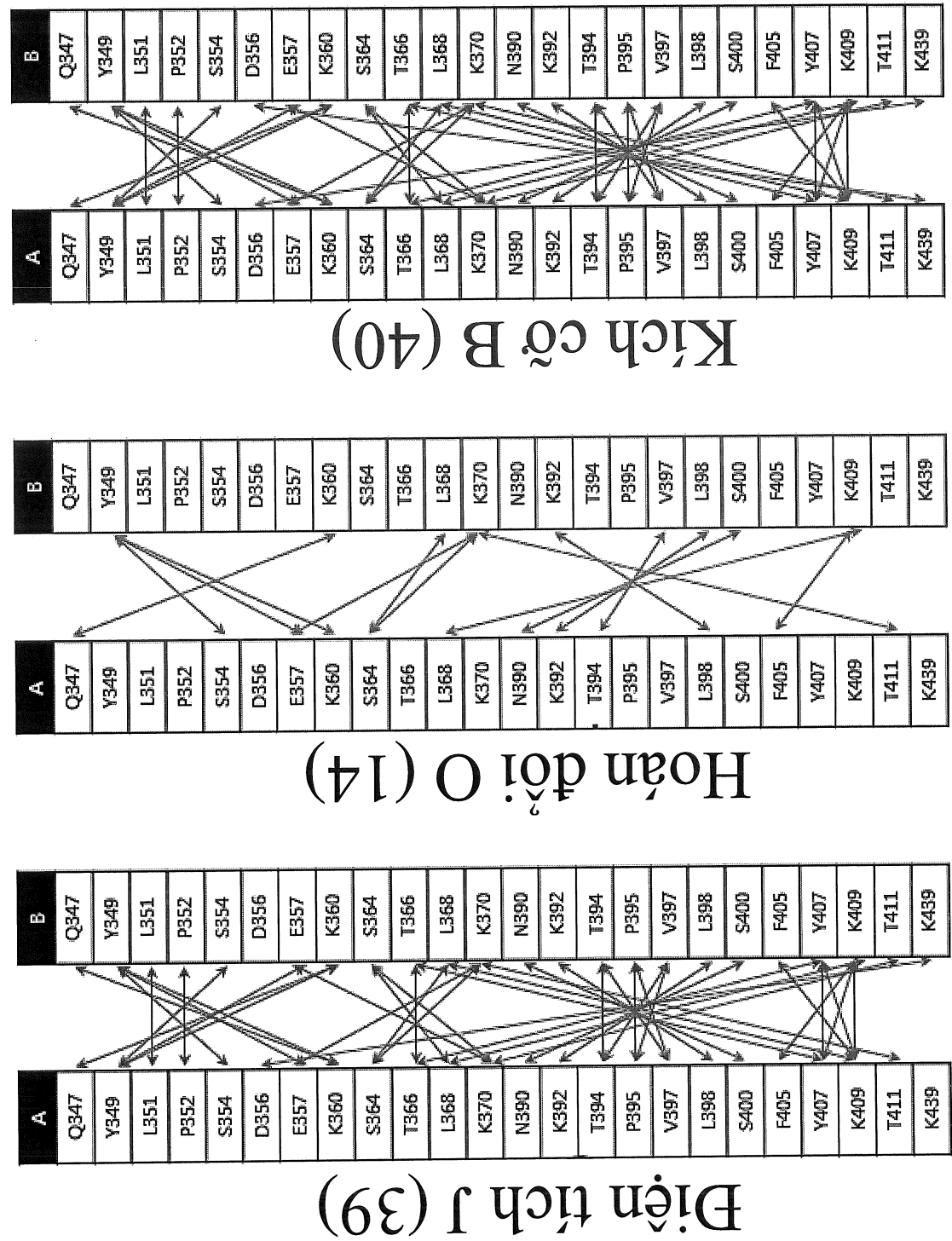


FIG. 3

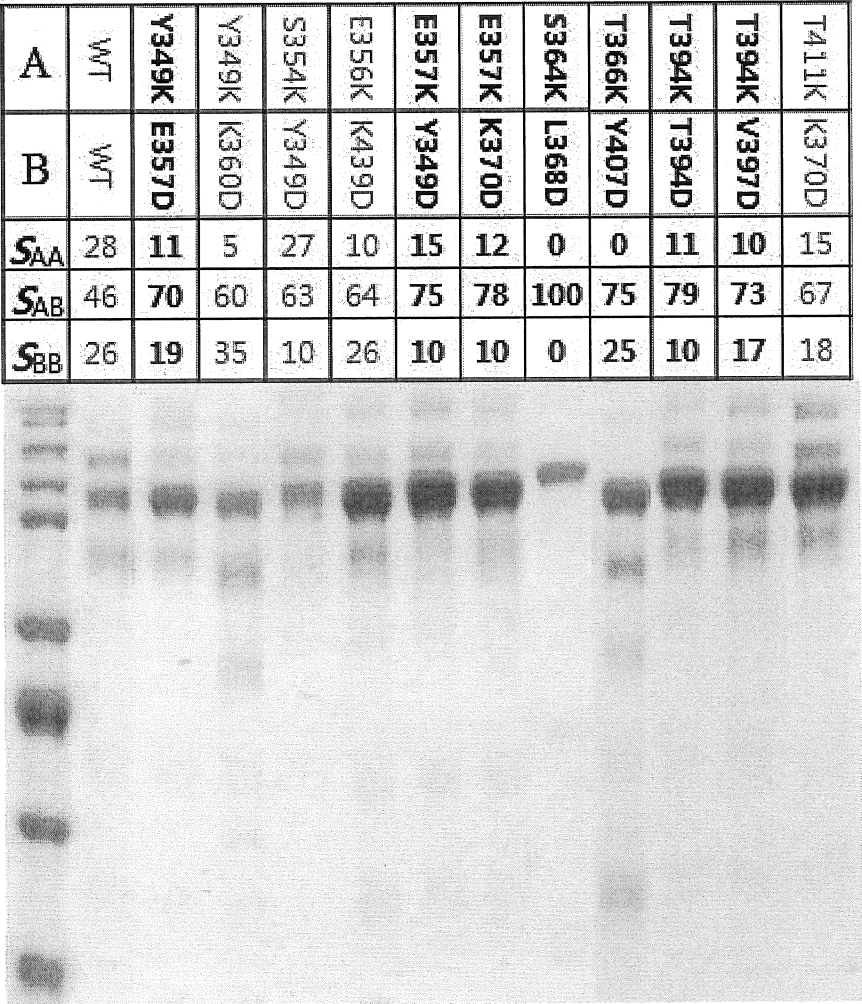


FIG. 4

A	T411K	K370T	S_{AA}	S_{AB}	S_{BB}
E357Y <td>T366Y<td>10<td>83<td>7<td></td></td></td></td></td>	T366Y <td>10<td>83<td>7<td></td></td></td></td>	10 <td>83<td>7<td></td></td></td>	83 <td>7<td></td></td>	7 <td></td>	
E357K <td>K409F<td>0<td>70<td>30<td></td></td></td></td></td>	K409F <td>0<td>70<td>30<td></td></td></td></td>	0 <td>70<td>30<td></td></td></td>	70 <td>30<td></td></td>	30 <td></td>	
S364L <td>K370S<td>0<td>90<td>10<td></td></td></td></td></td>	K370S <td>0<td>90<td>10<td></td></td></td></td>	0 <td>90<td>10<td></td></td></td>	90 <td>10<td></td></td>	10 <td></td>	
E357K <td>K370E<td>4<td>80<td>16<td></td></td></td></td></td>	K370E <td>4<td>80<td>16<td></td></td></td></td>	4 <td>80<td>16<td></td></td></td>	80 <td>16<td></td></td>	16 <td></td>	
E357Y <td>Y349E<td>8<td>71<td>21<td></td></td></td></td></td>	Y349E <td>8<td>71<td>21<td></td></td></td></td>	8 <td>71<td>21<td></td></td></td>	71 <td>21<td></td></td>	21 <td></td>	

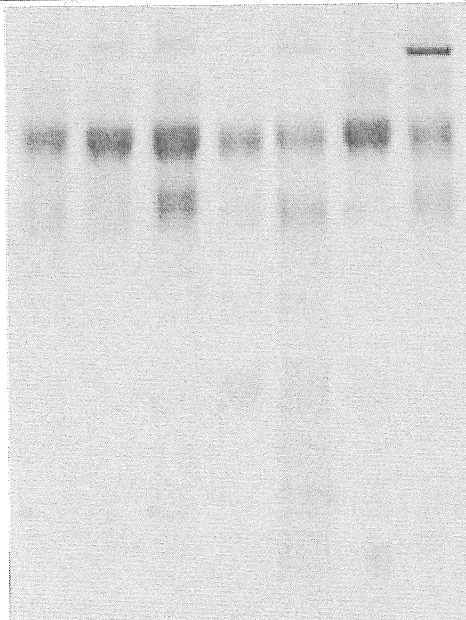


FIG. 5

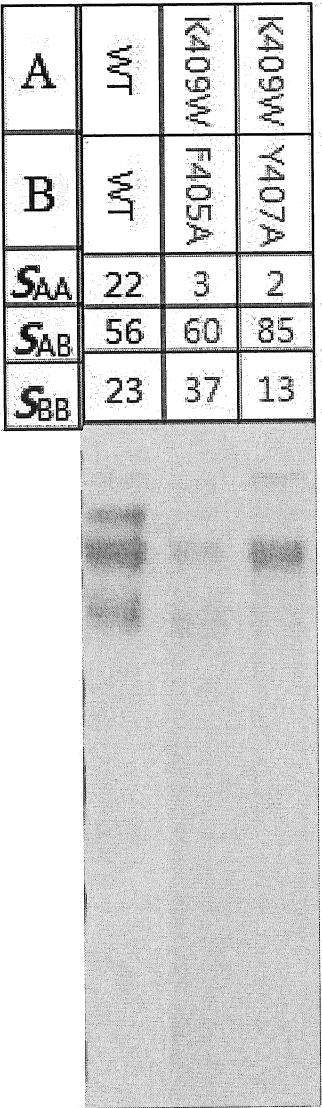


FIG. 6a

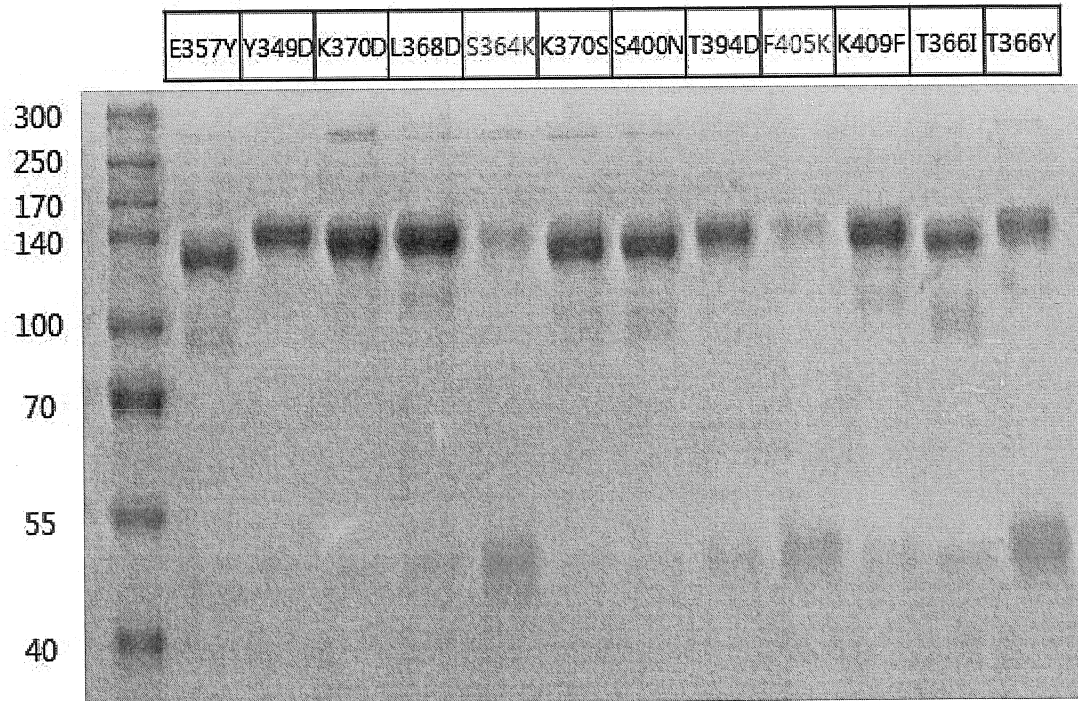


FIG. 6b

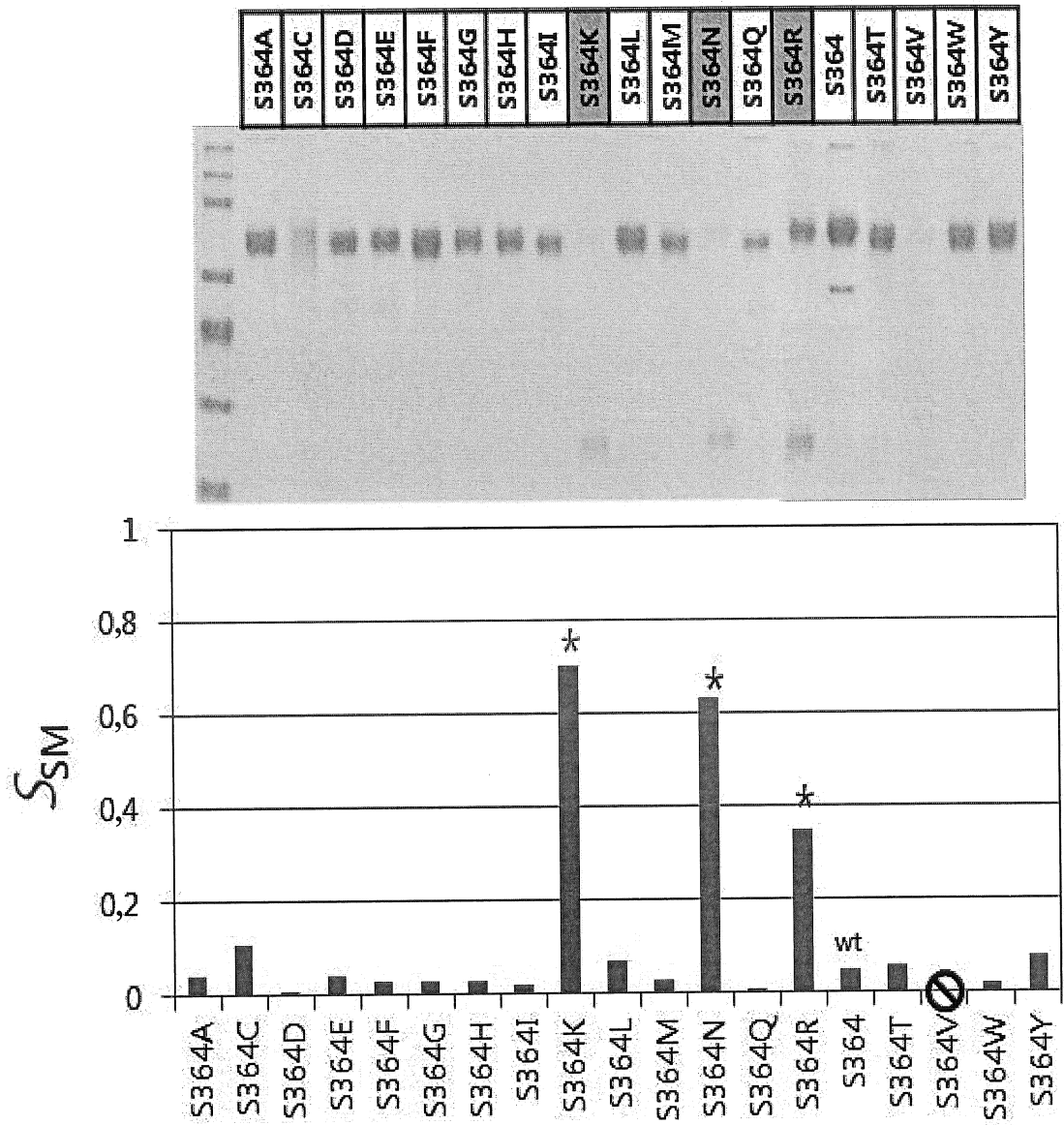


FIG. 6c

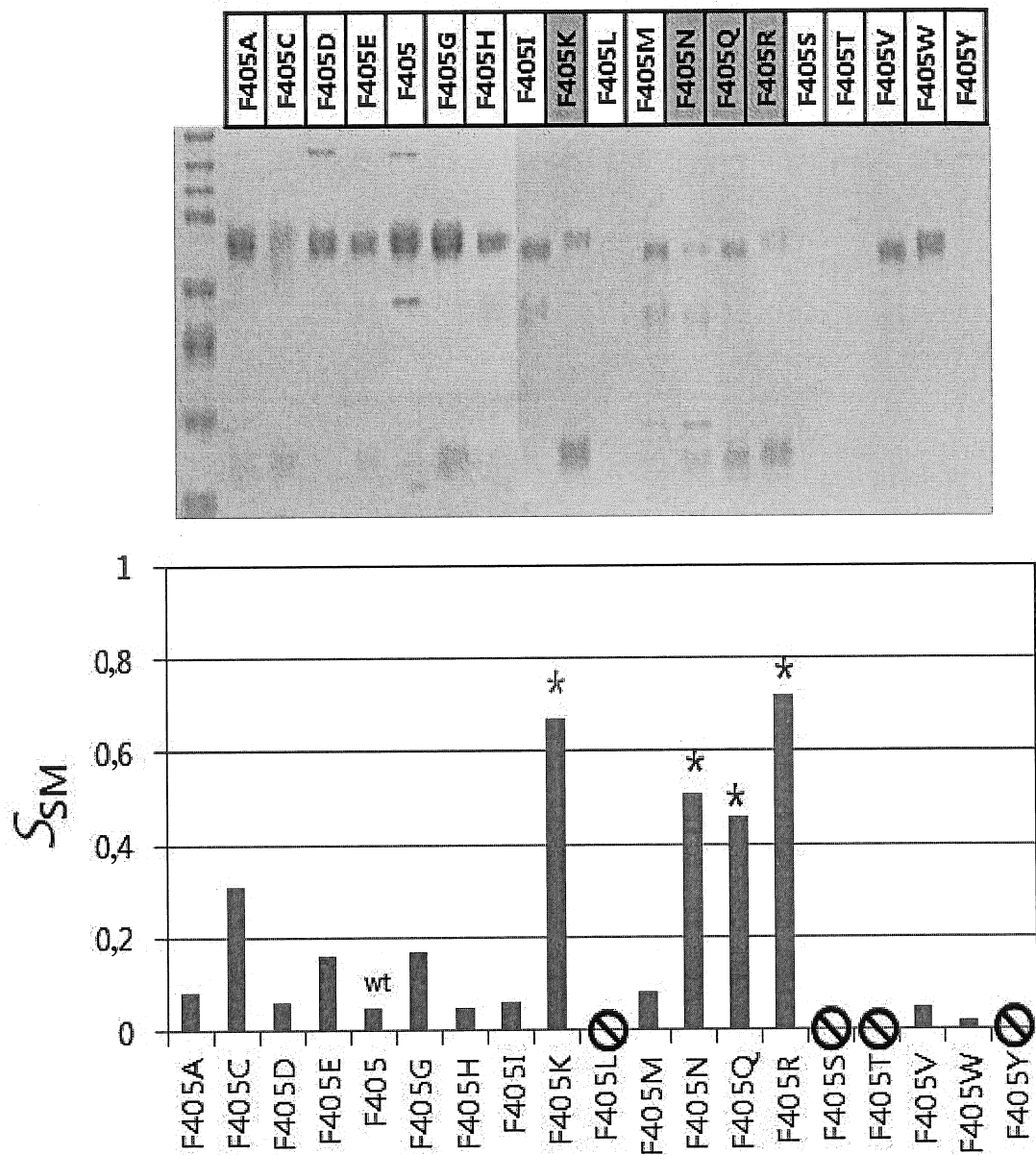


FIG. 6d

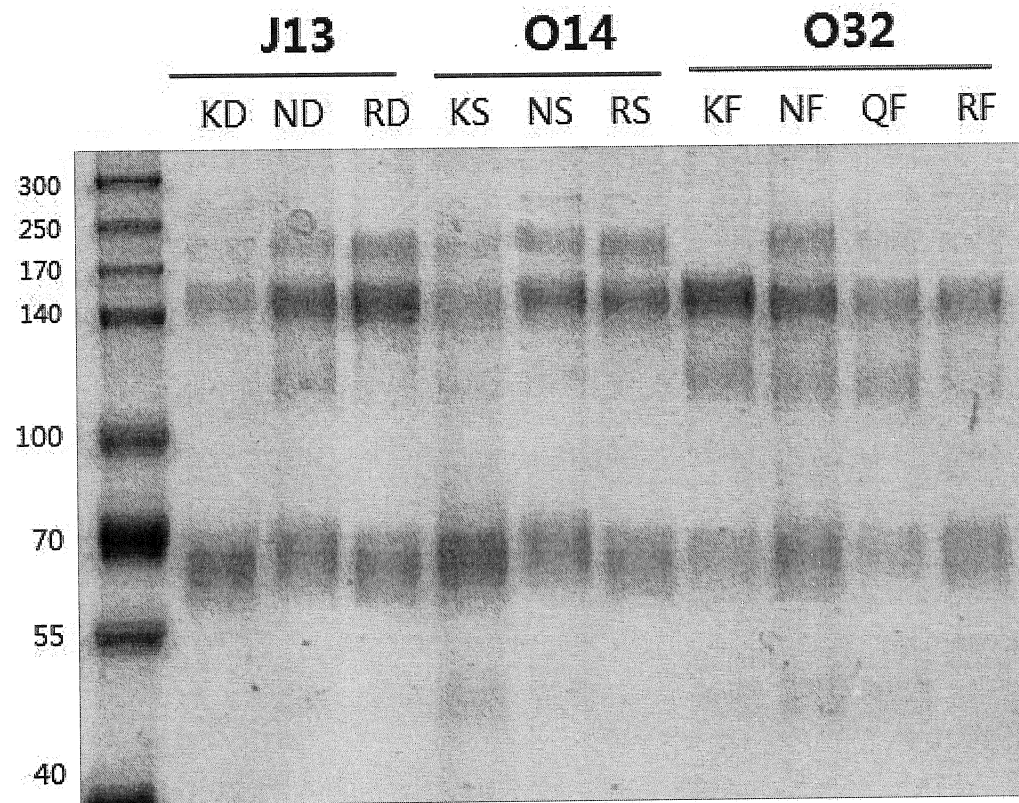


FIG. 7

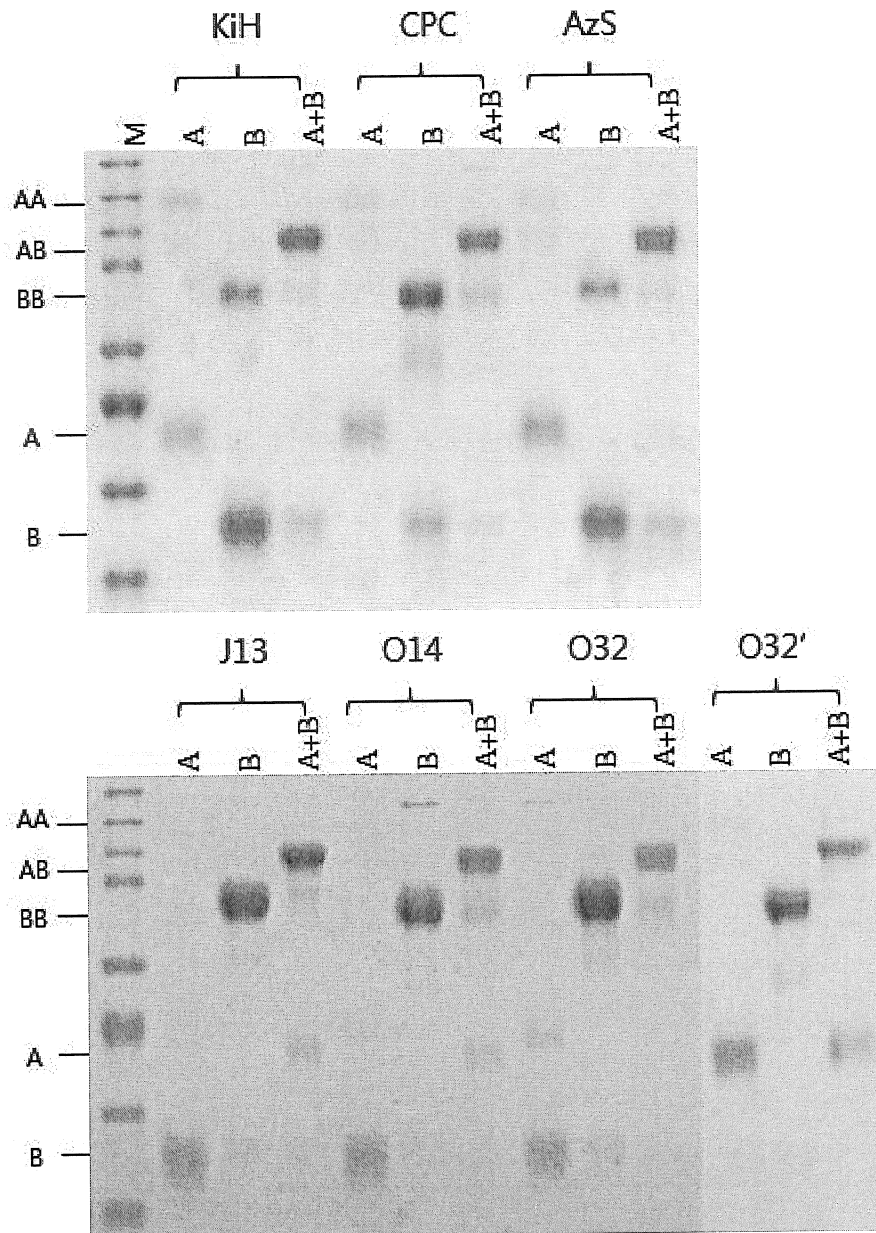


FIG. 8

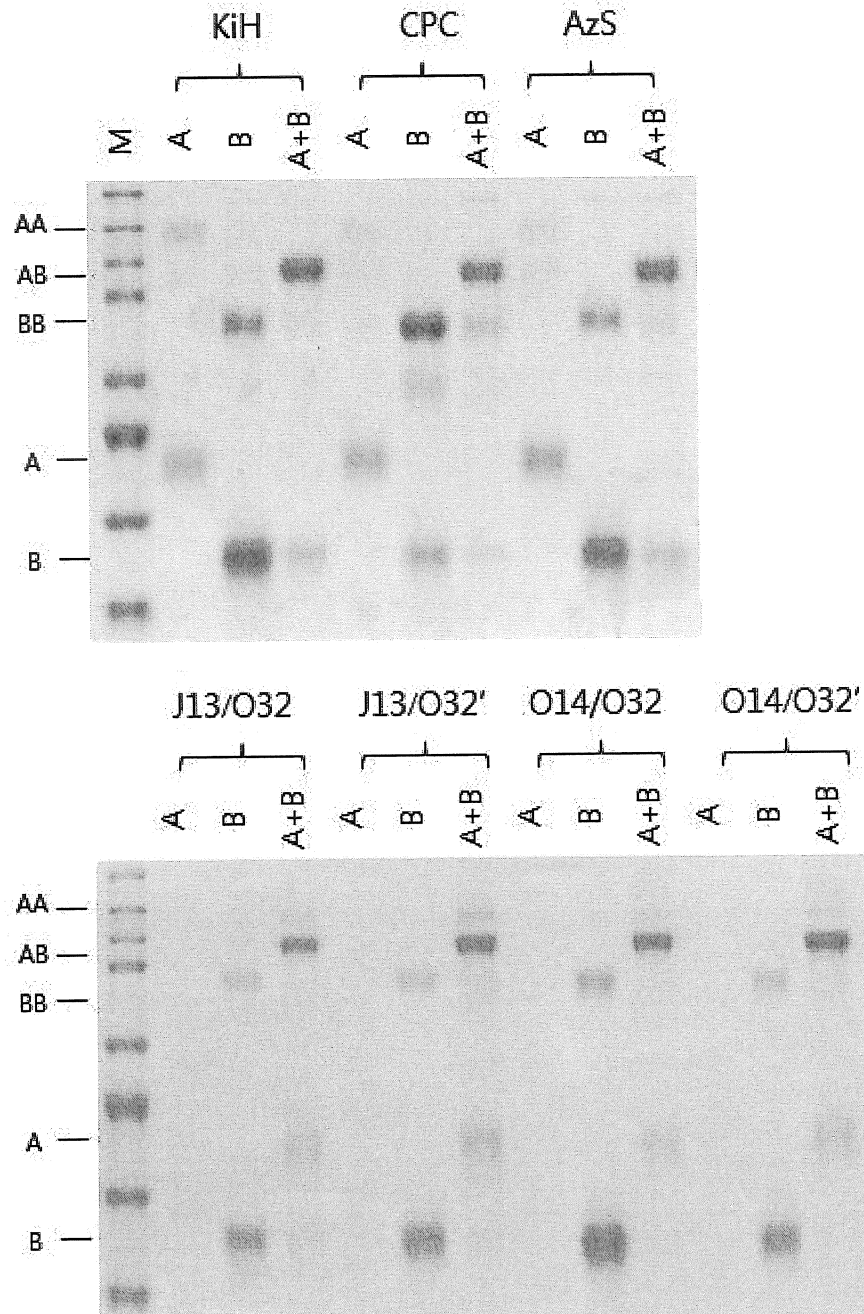


FIG. 9a

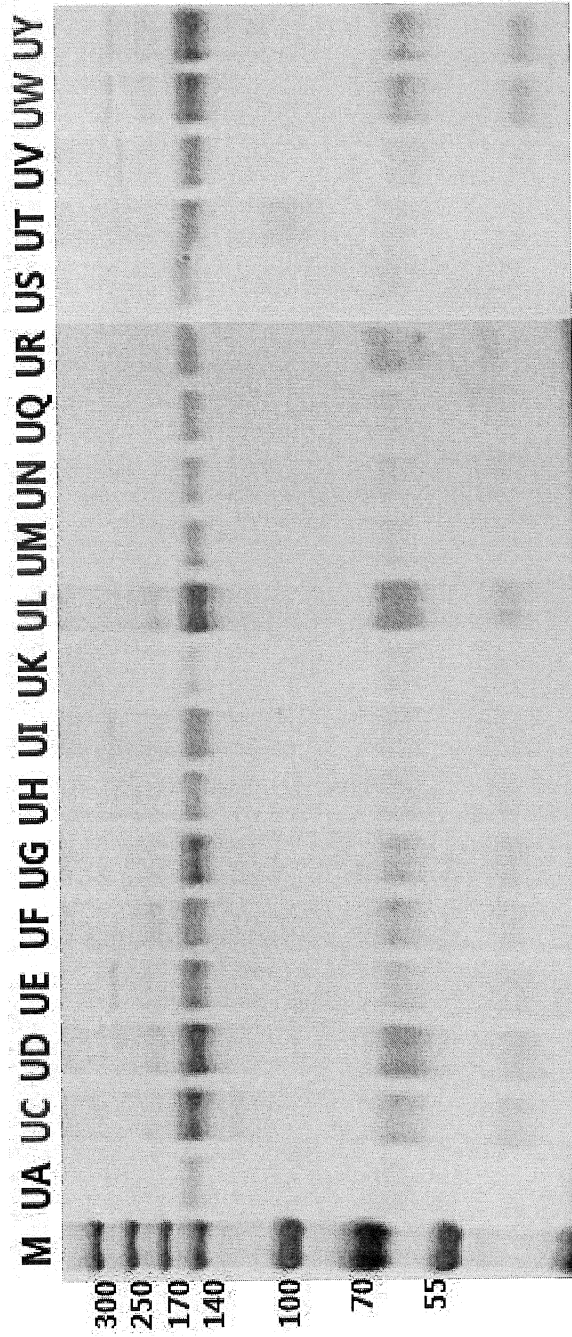


FIG. 9b

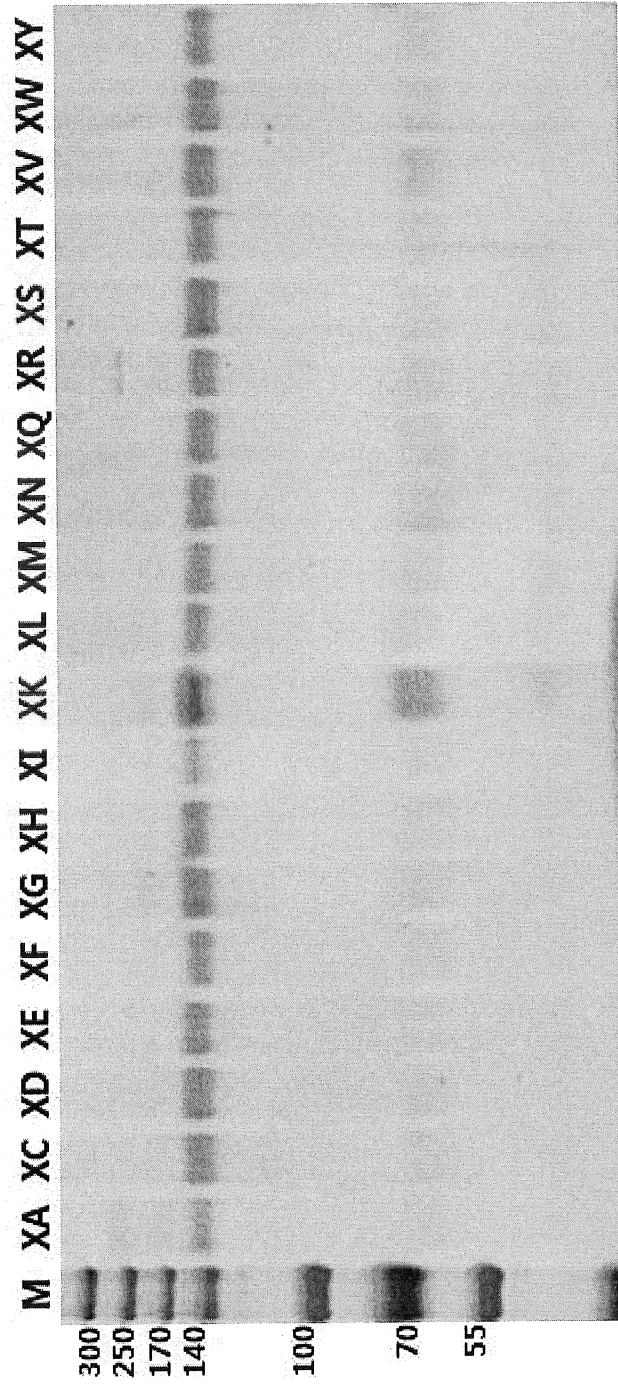


FIG. 9c

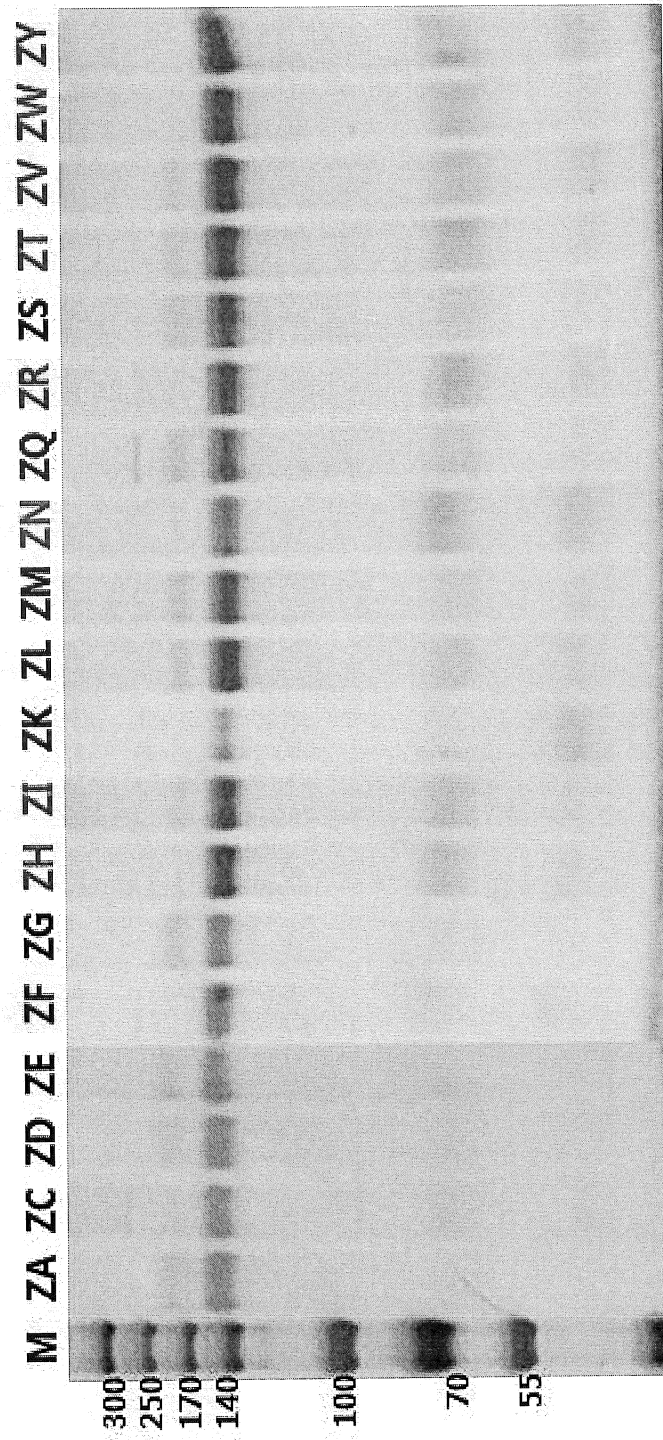


FIG. 10

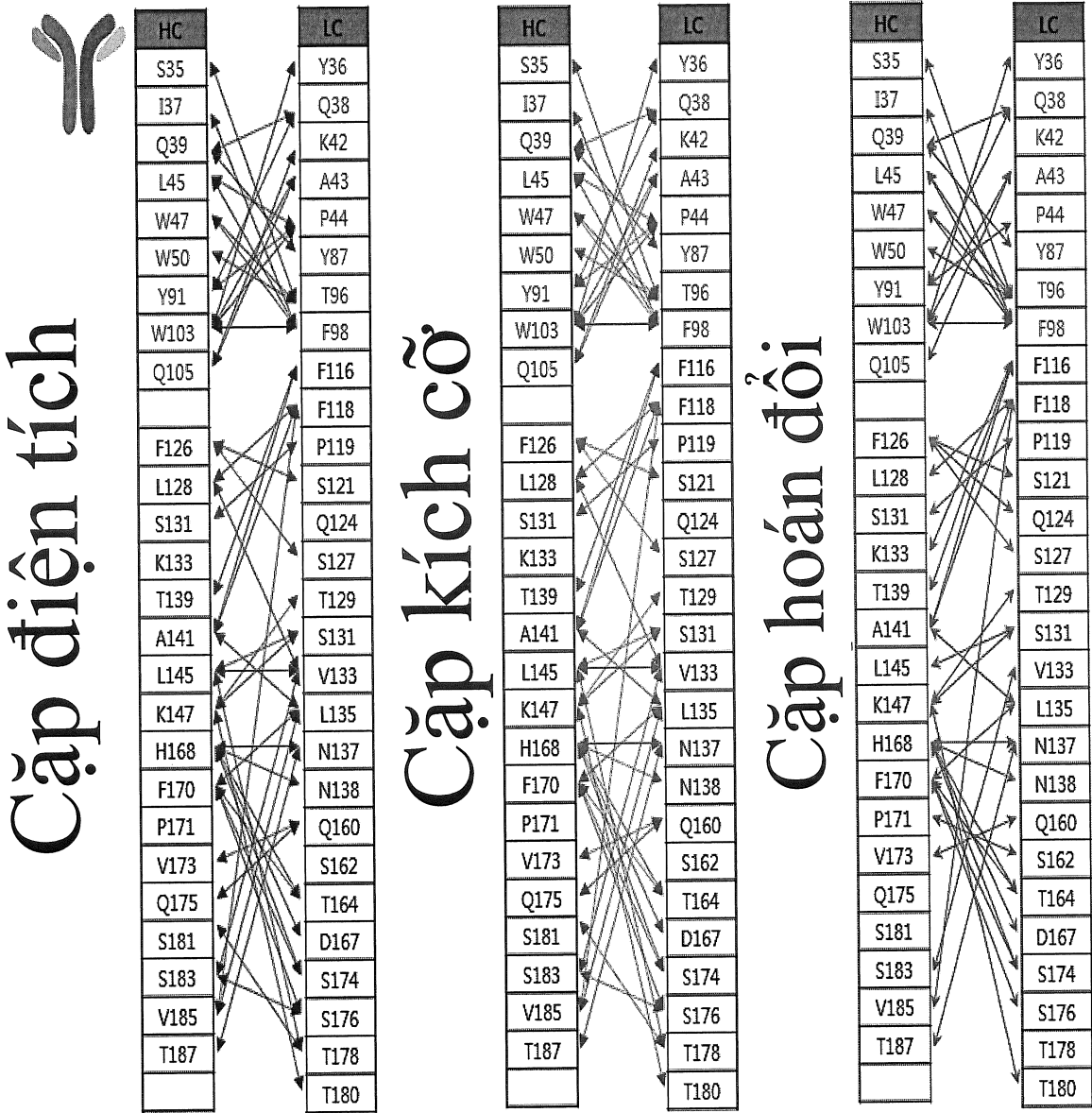


FIG. 11

Thử nghiệm bất cập cạnh tranh (CPP)

$$\begin{aligned} \text{CPP Score } (S^{\text{CPP}}) &= \frac{1}{2}(a^{\text{CPP}} + b^{\text{CPP}}) \\ a^{\text{CPP}} &= 100(C_{aA})/(C_{aA} + C_{aB}) = 100(C_A)/(C_A + C_B) \\ b^{\text{CPP}} &= 100(C_{bB})/(C_{bB} + C_{bA}) = 100(C_B)/(C_A + C_B) \end{aligned}$$

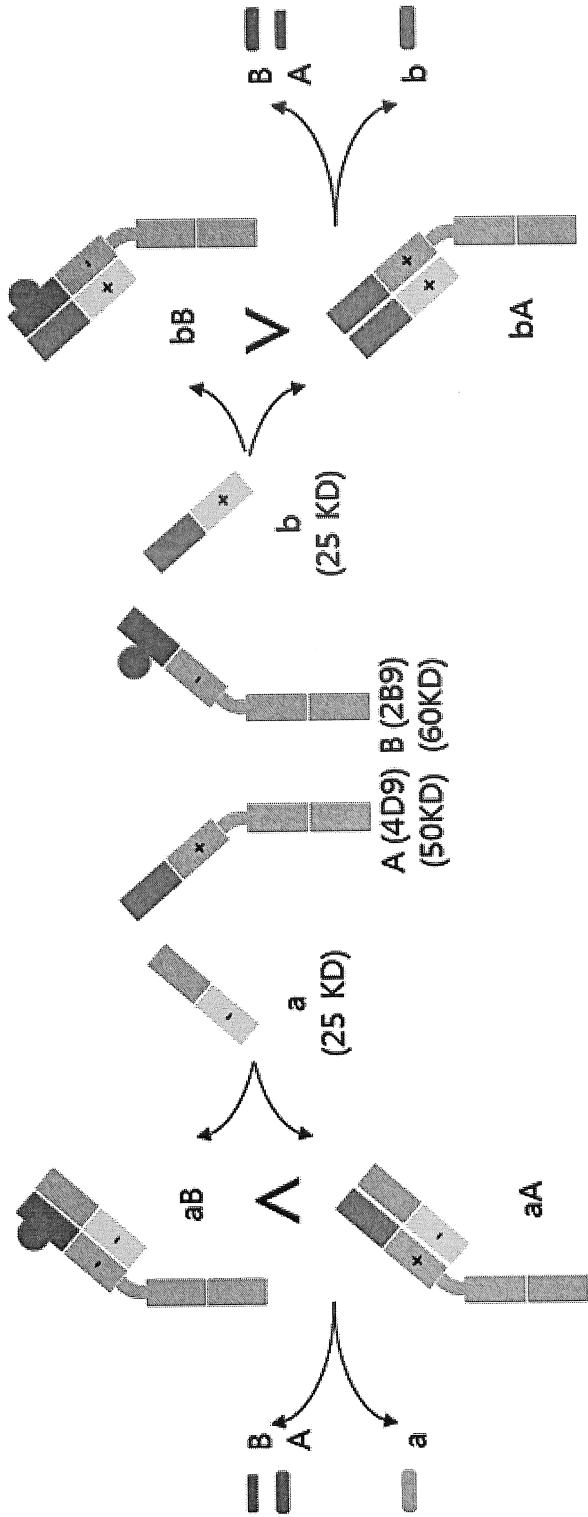
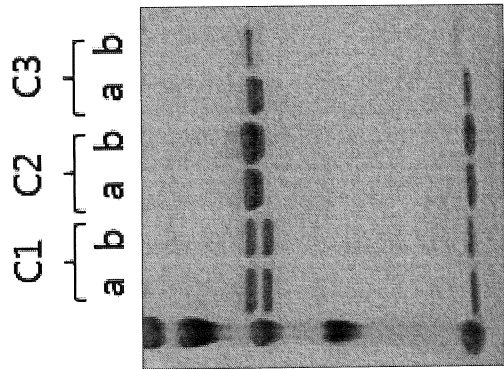


FIG. 12



• CPP Score (S^{CPP}) = $\frac{1}{2}(a^{CPP} + b^{CPP})$

$a^{CPP} = 100(C_{aA})/(C_{aA} + C_{aB}) = 100(C_A)/(C_A + C_B)$

$b^{CPP} = 100(C_{bB})/(C_{bB} + C_{bA}) = 100(C_B)/(C_A + C_B)$

$S^{CPP} = \begin{cases} 100 \text{ đối với bất cặp hiệu quả dương tính} \\ 0 \text{ đối với bất cặp ngẫu nhiên không hiệu quả} \\ -100 \text{ đối với bất cặp hiệu quả âm tính} \end{cases}$

	a	A (4D9)	B (2B9)	b	a^{CPP}	b^{CPP}	S^{CPP}
C1	A1R/Q38D/ L135Y/S176W	Q39K/S62E/ H172A/F174G	Q39Y/S62K	A1D/Q38R	0	0	0
C2	S121C/C214V	F126C/C220V	-	-	-100	100	0
C3	Q38D/A43D/ S176K	Q39K/Q105K/ S183D	Q39D/Q105D/ S183K	Q38K/A43K/ S176D	-100	100	0

FIG. 13

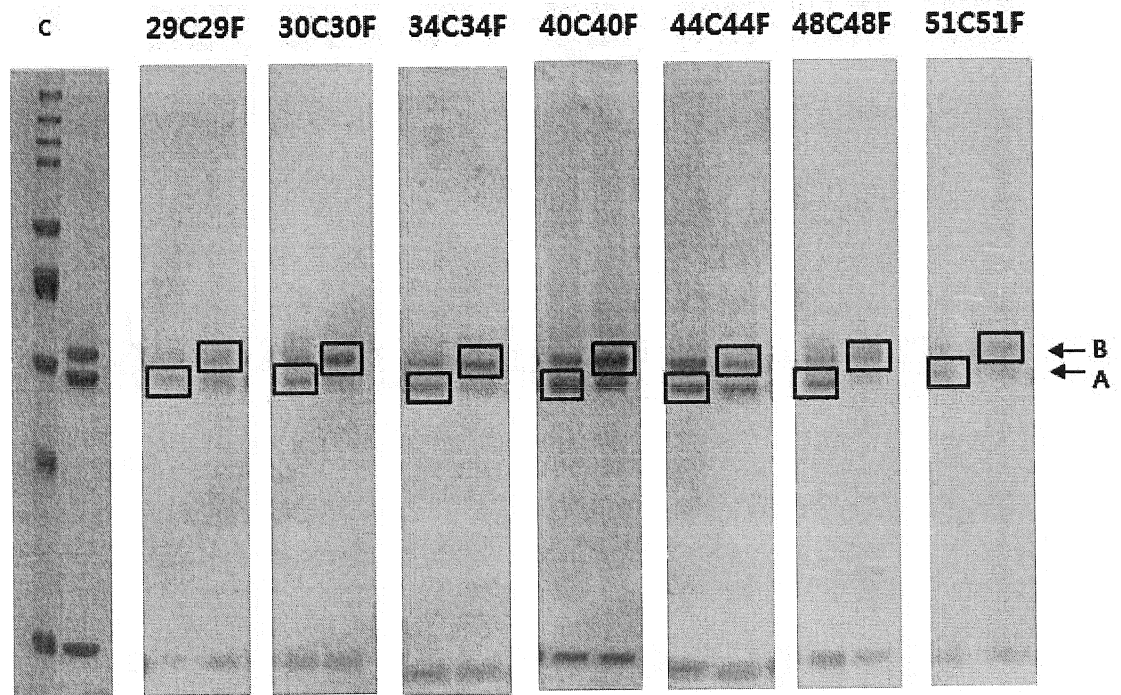


FIG. 14

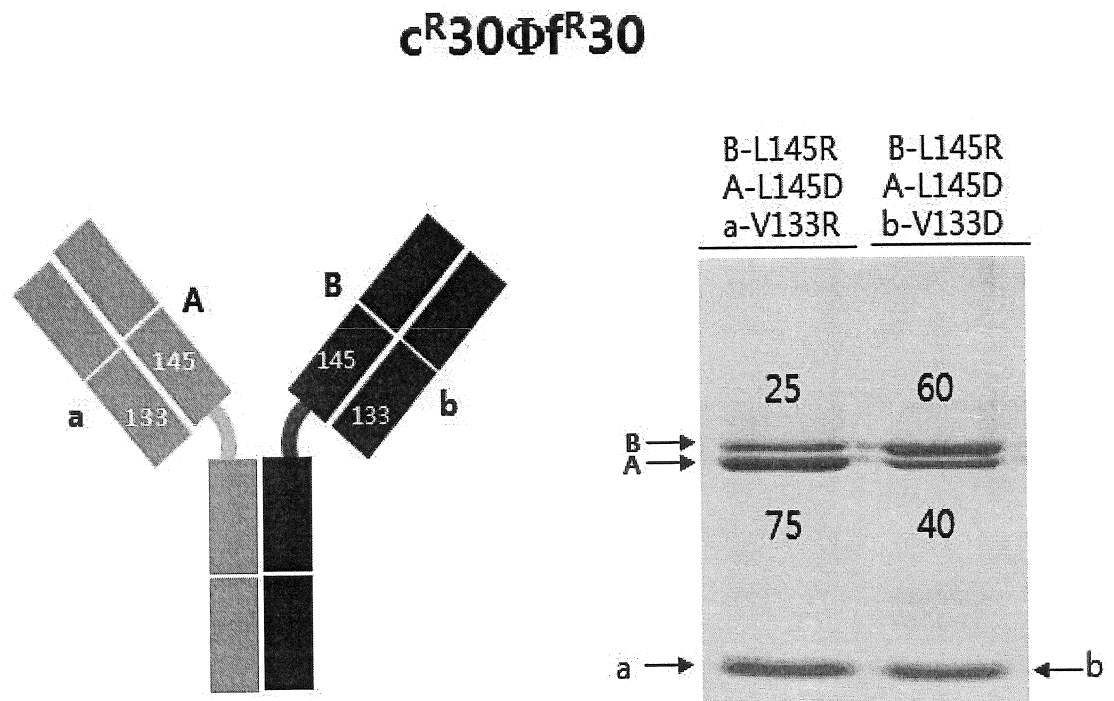


FIG. 15

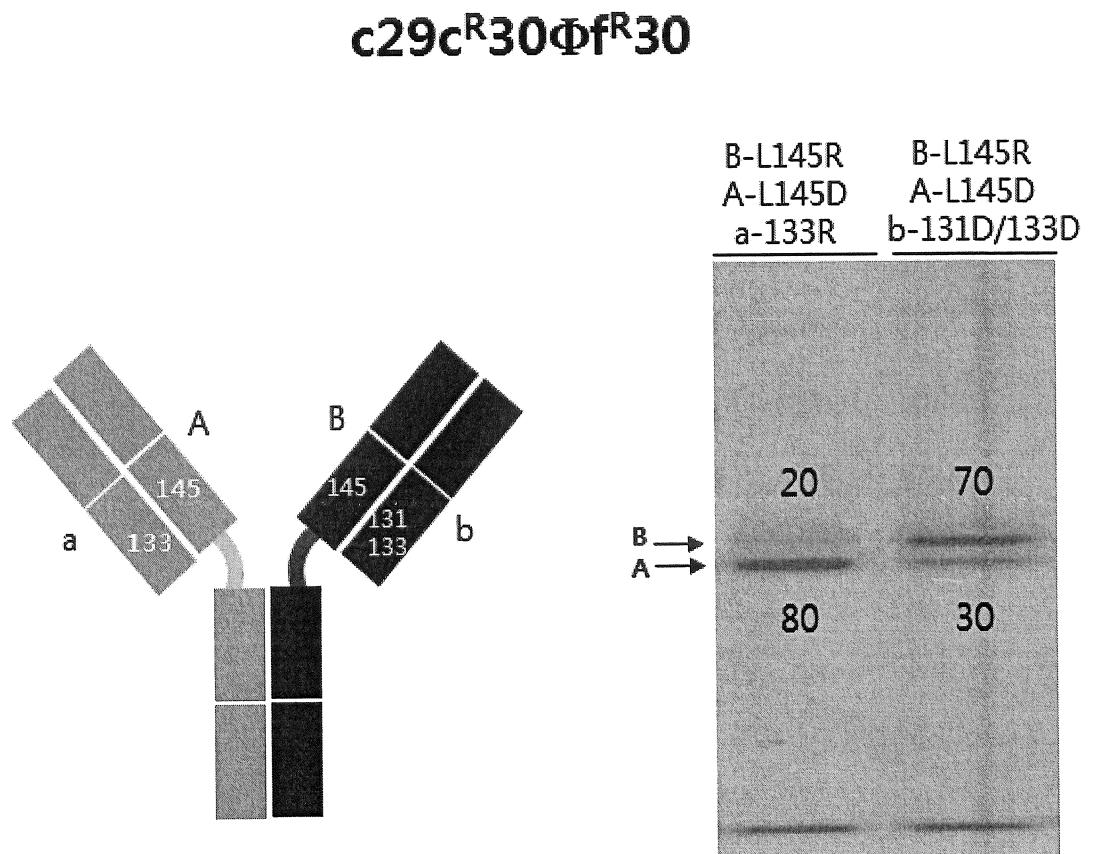


FIG. 16

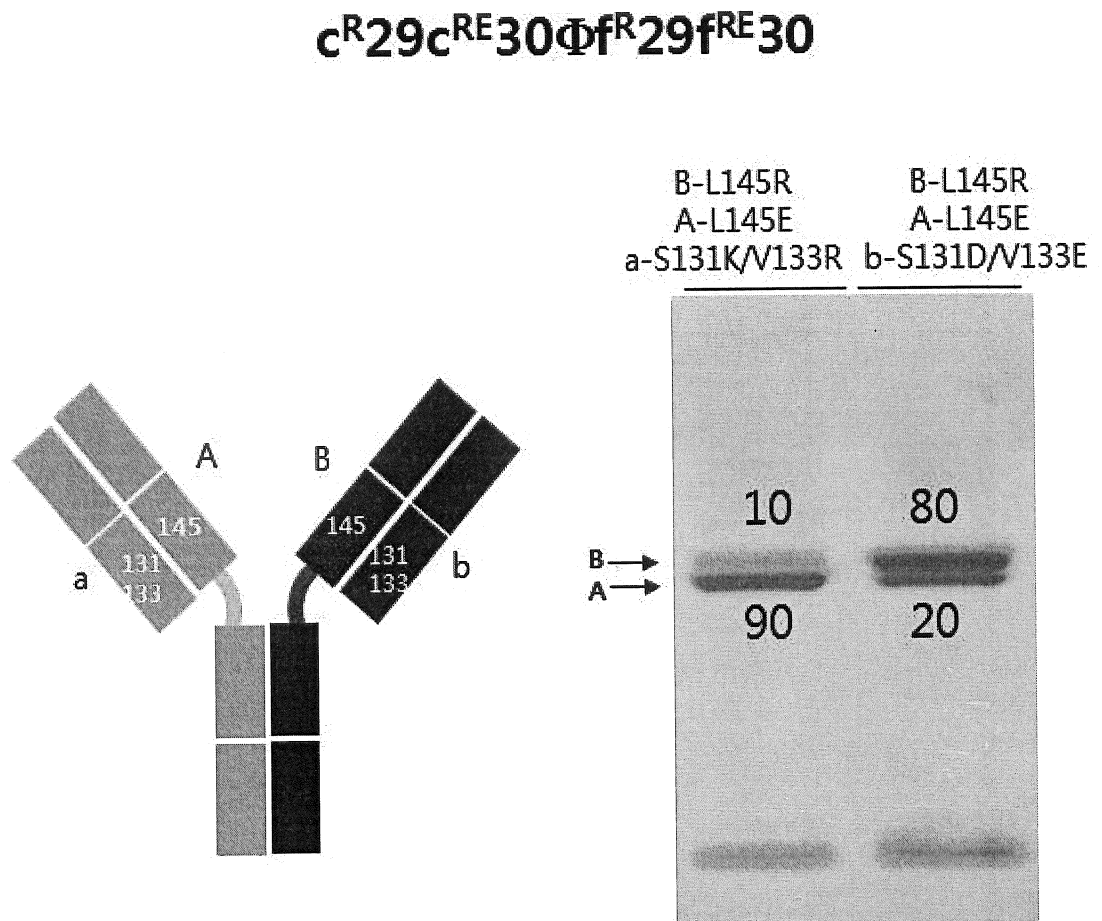


FIG. 17

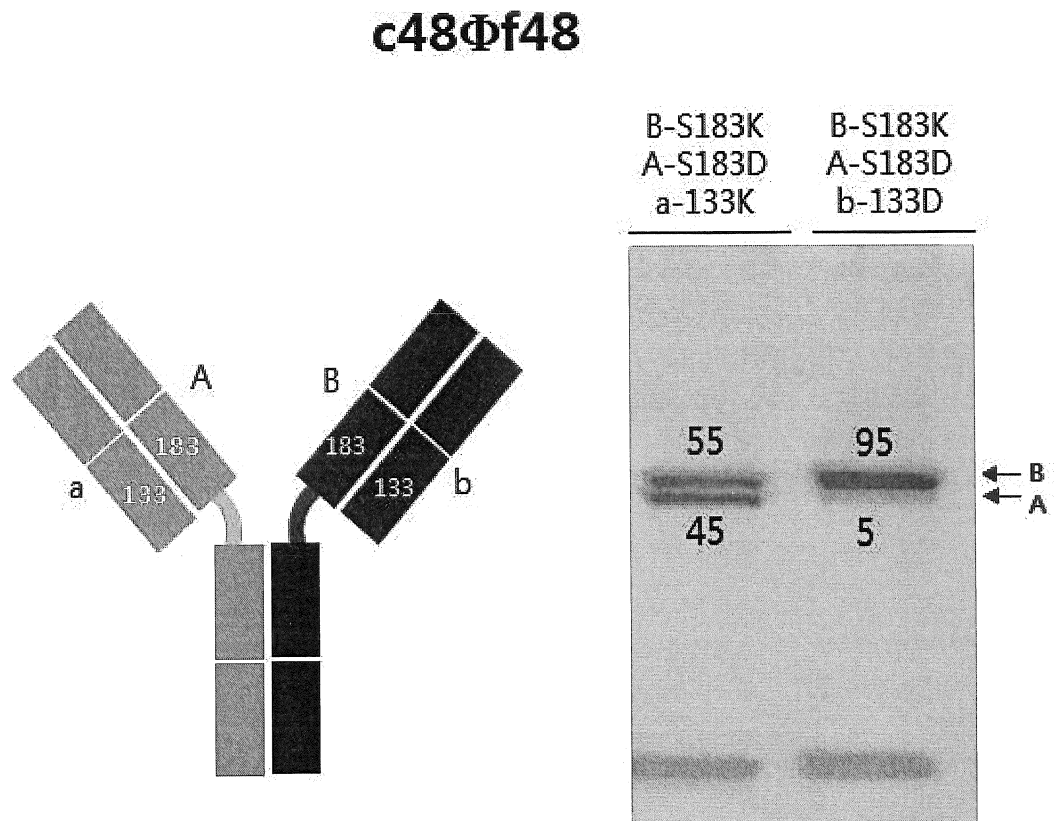


FIG. 18

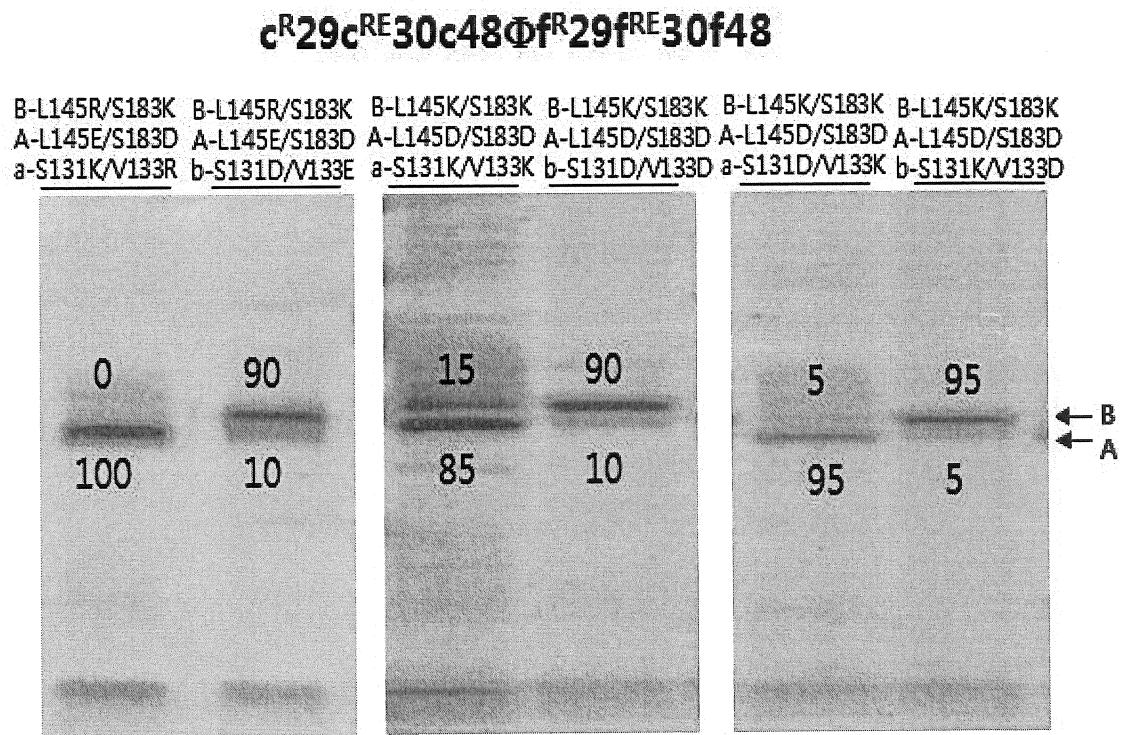
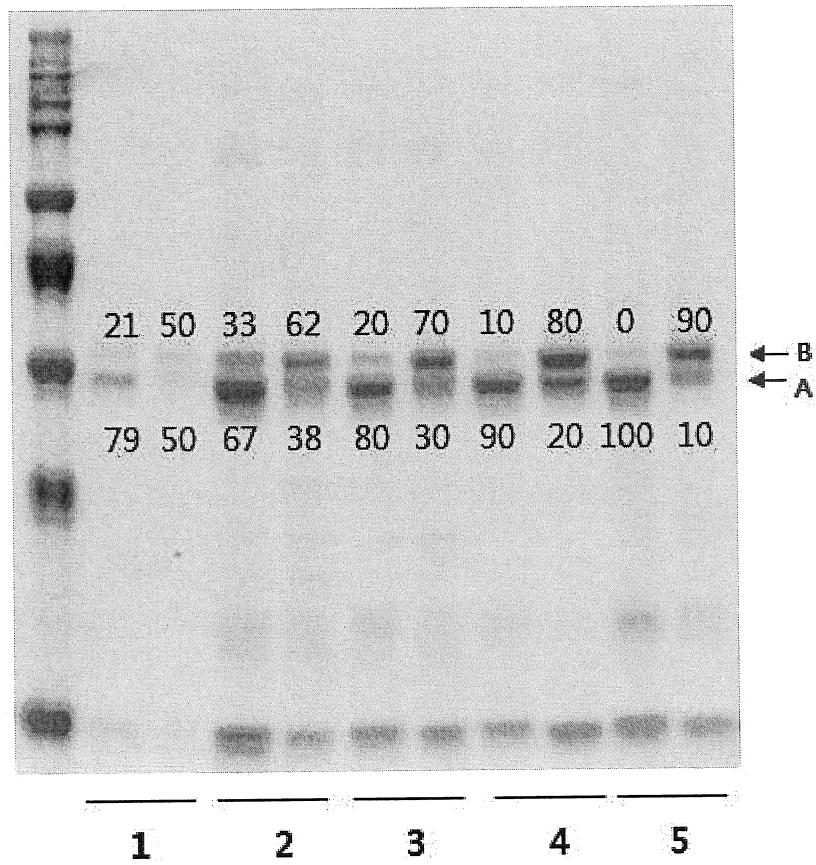


FIG. 19



FIG,20

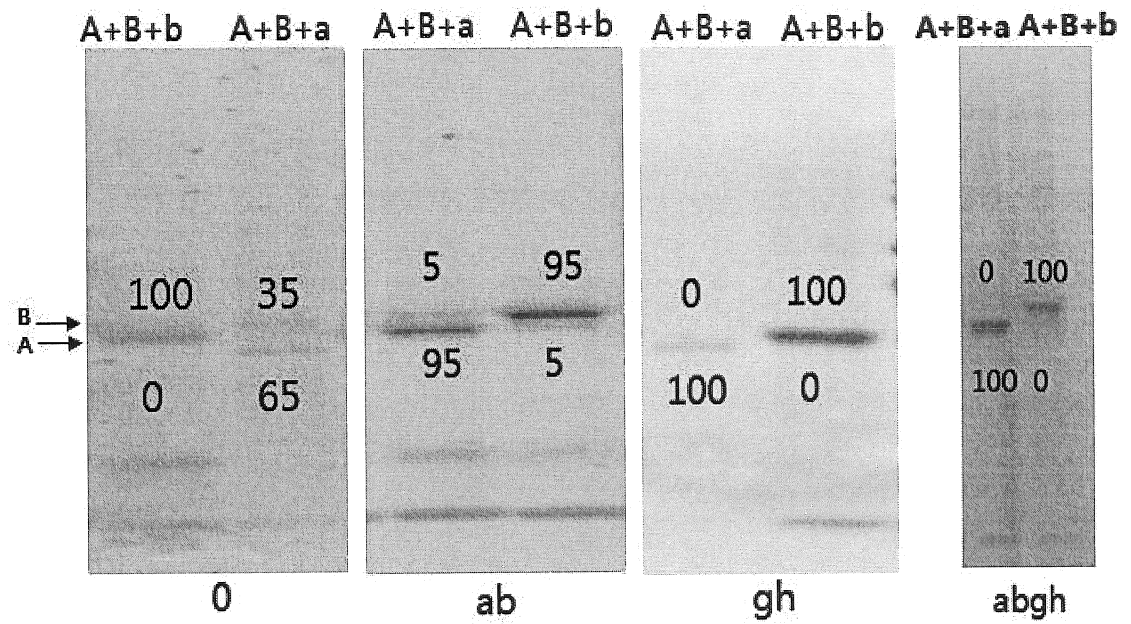


FIG. 21

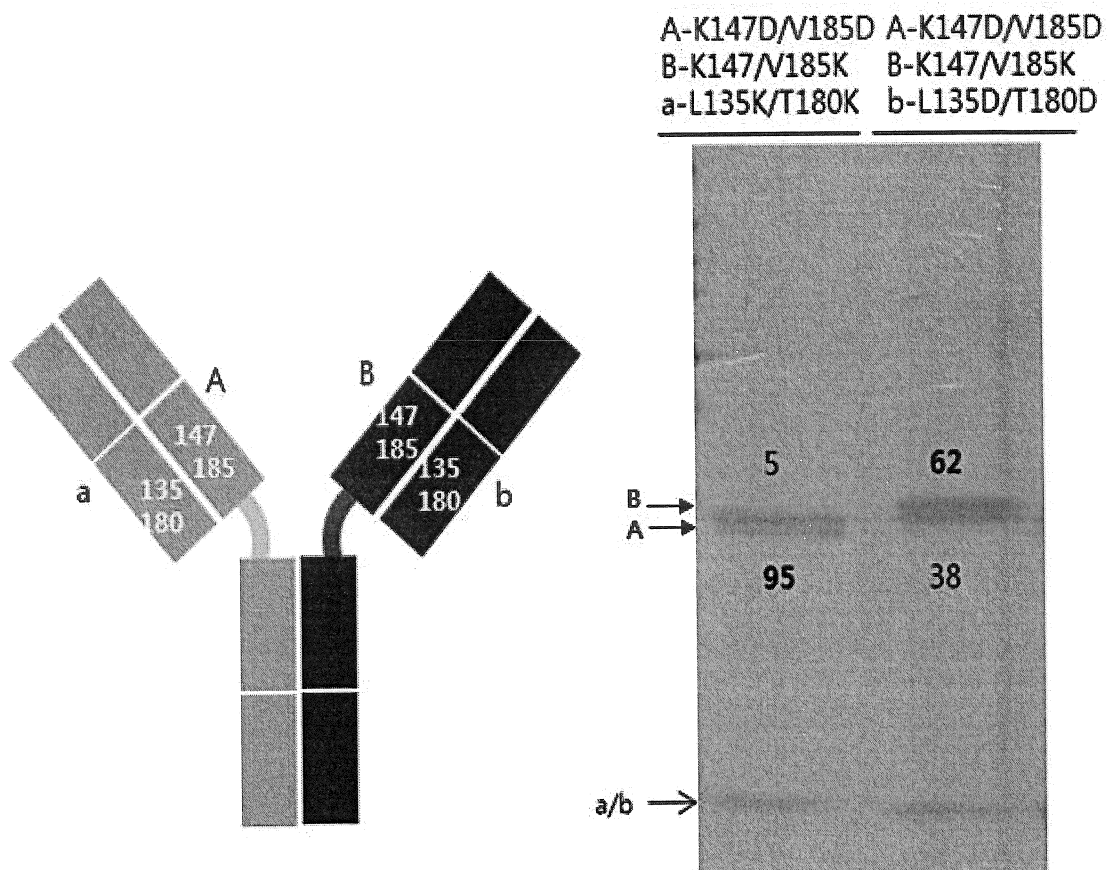


FIG. 22

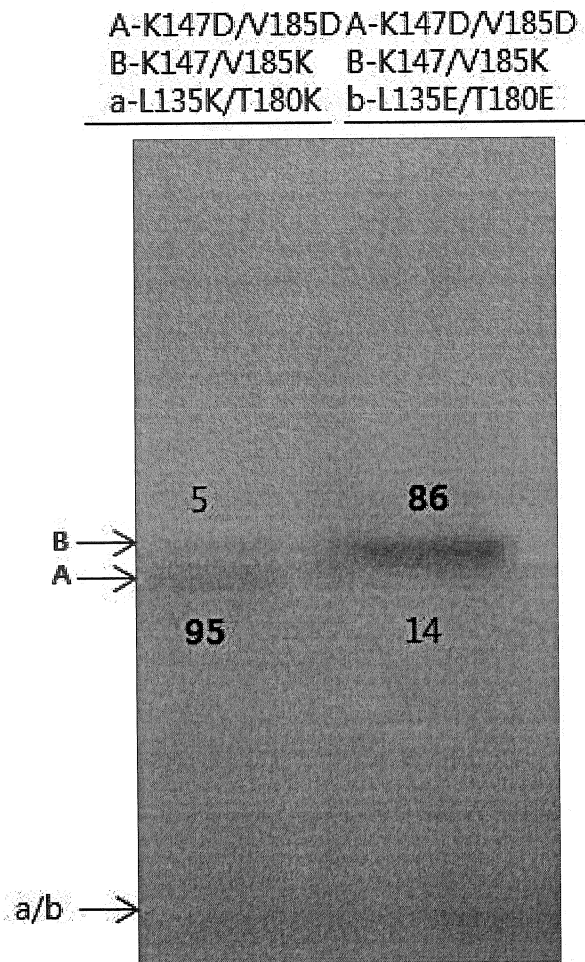


FIG. 23

c40Φf44

A-F170D/P171D	A-F170D/P171D
B-F170K/P171K	B-F170K/P171K
a-L135R/S162K	a-L135E/S162D

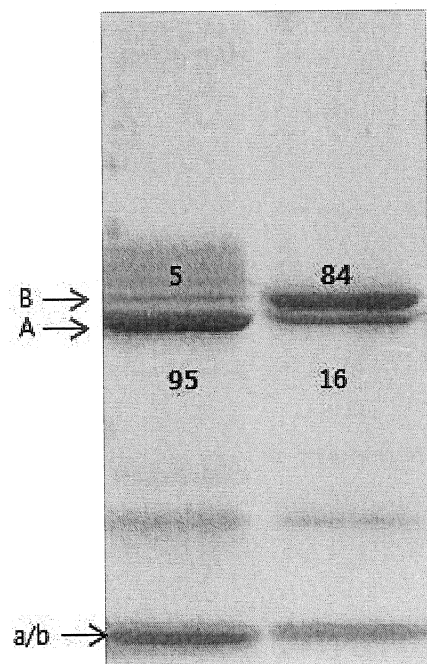
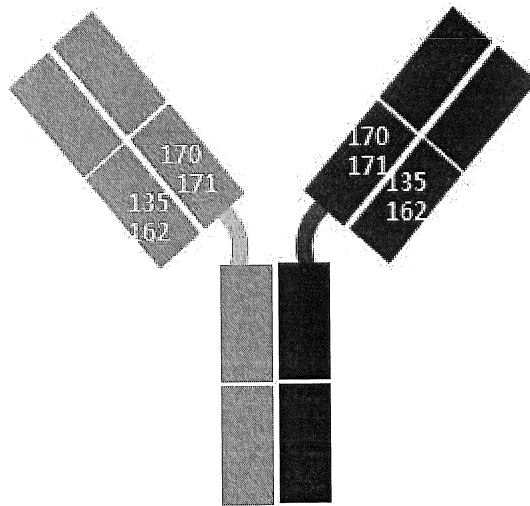


FIG. 24

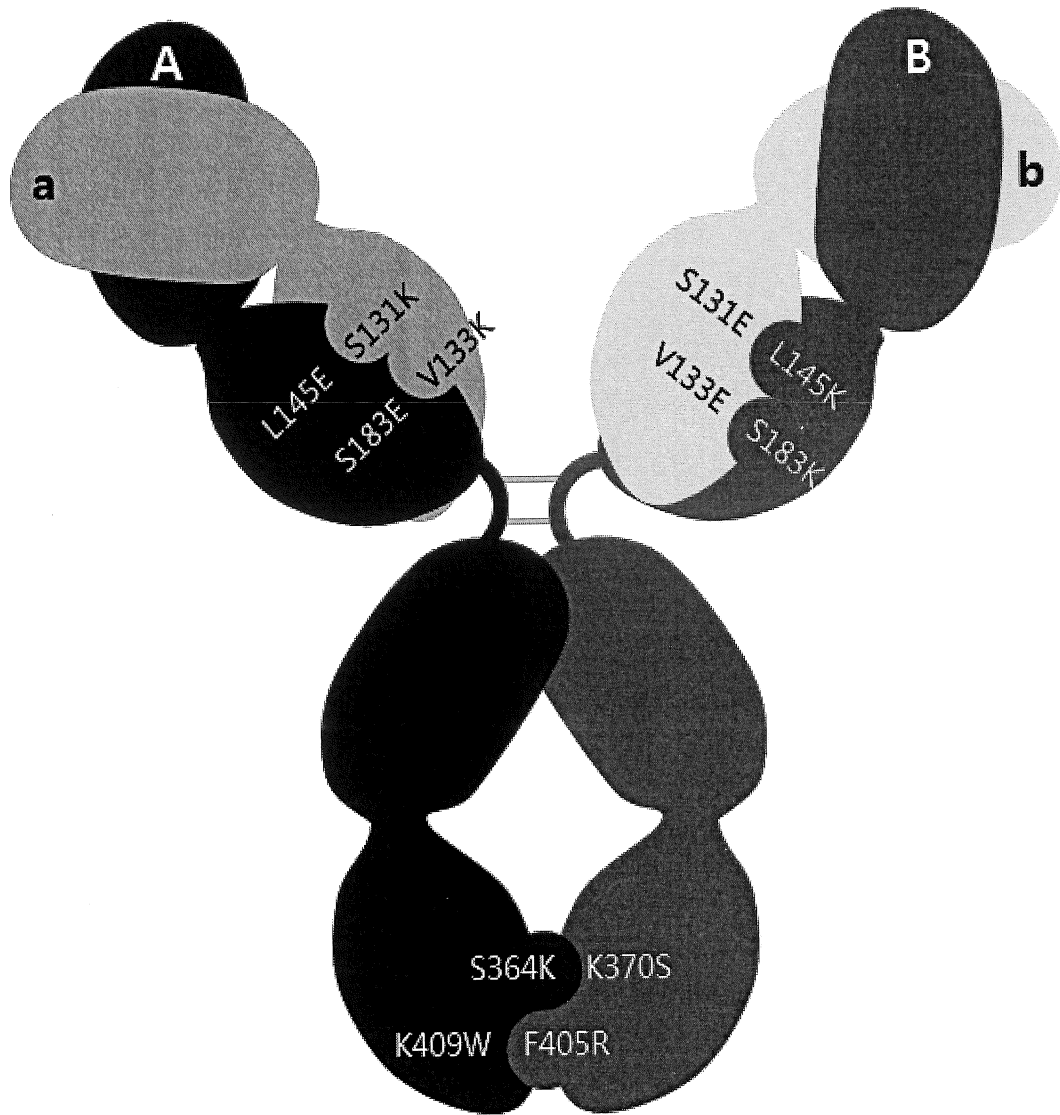


FIG. 25

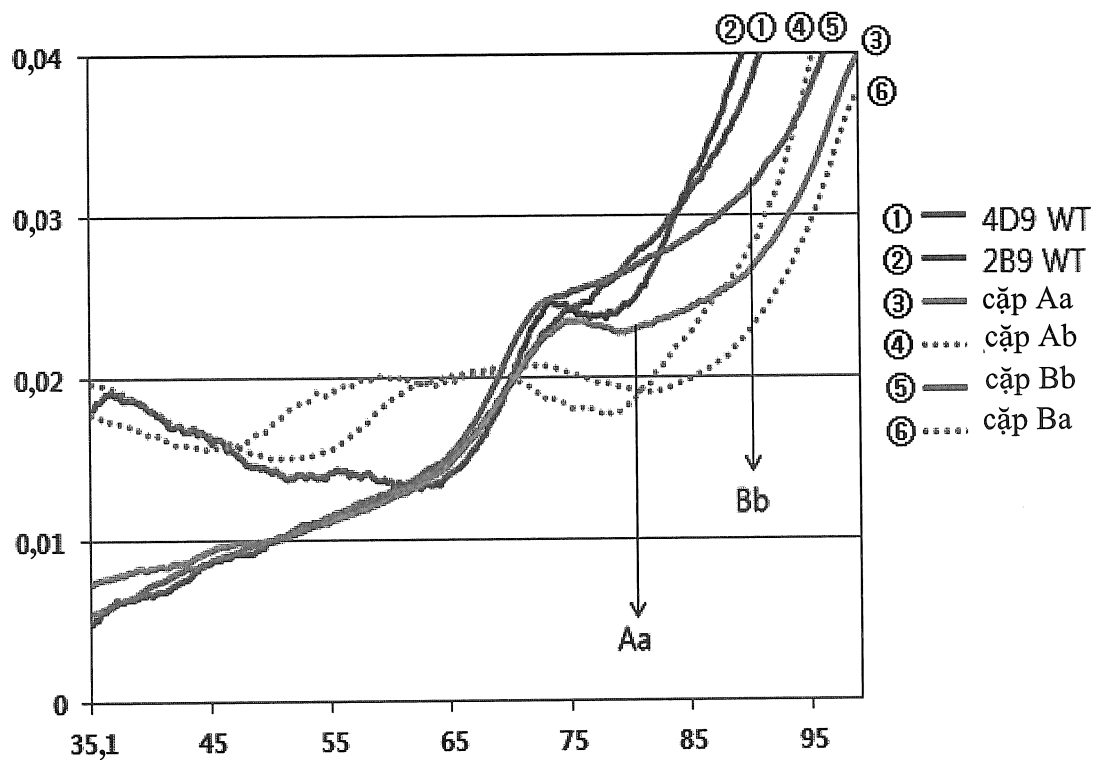


FIG.26

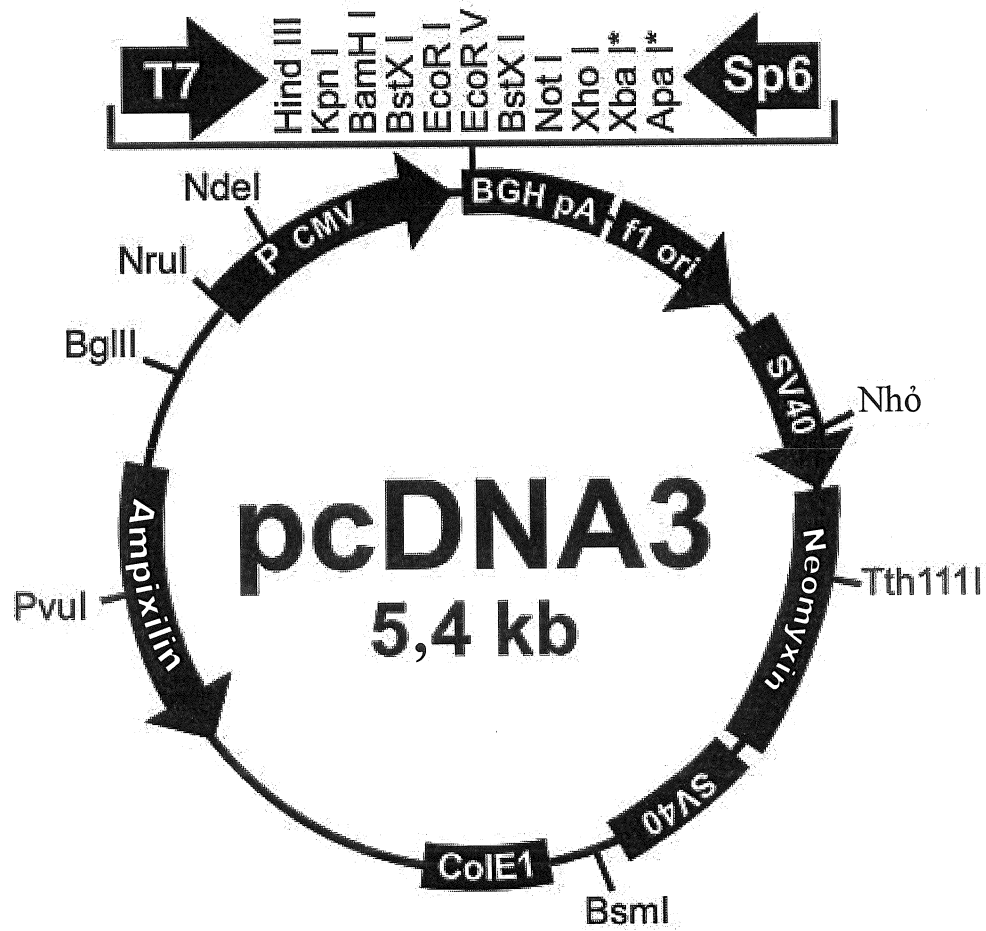


FIG. 27

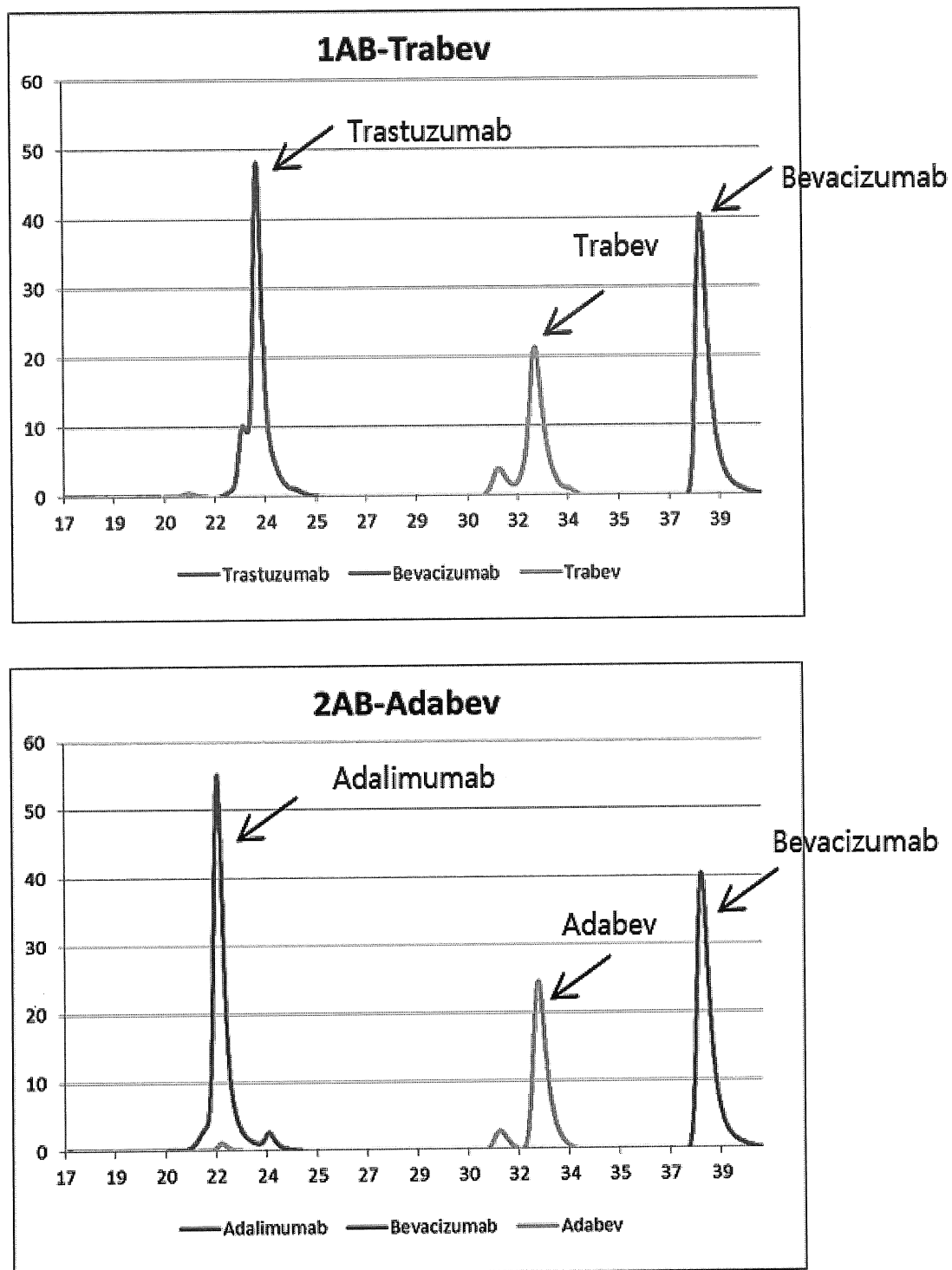


FIG. 28

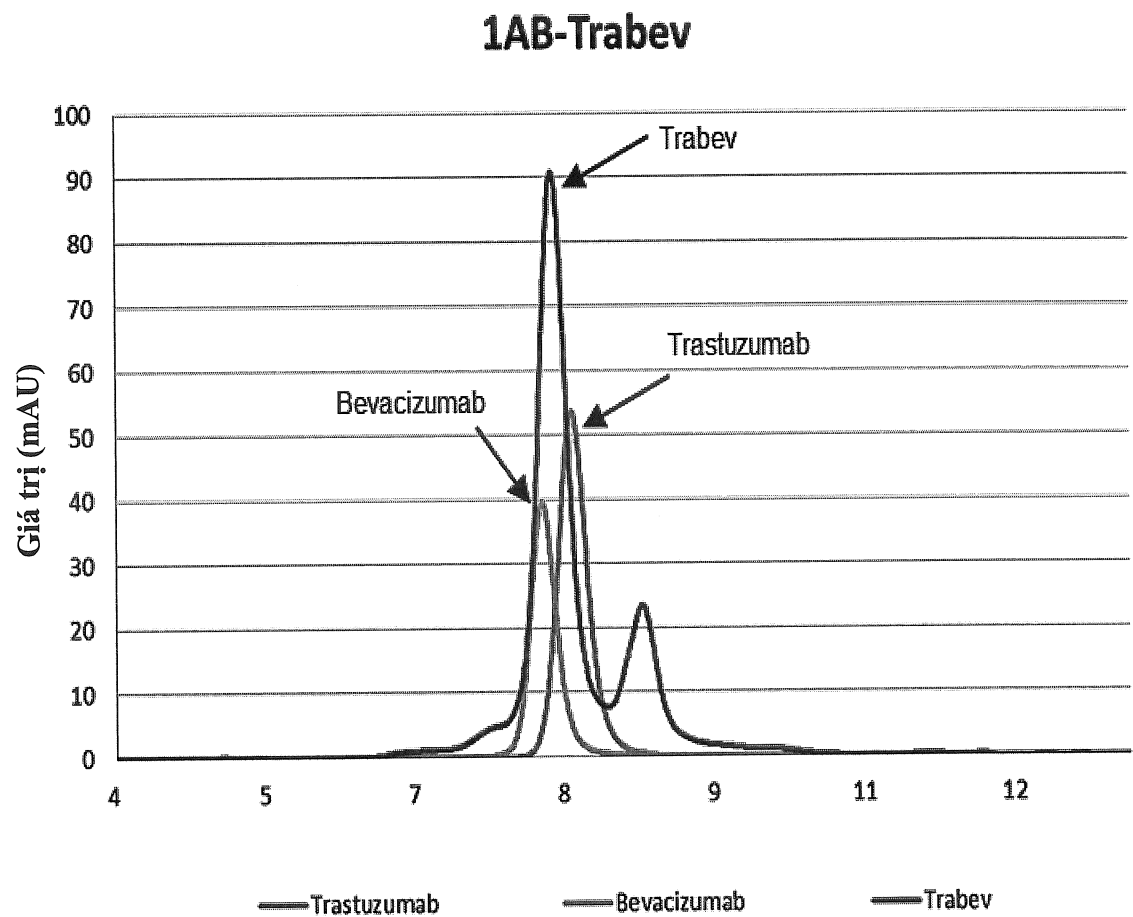


FIG. 29

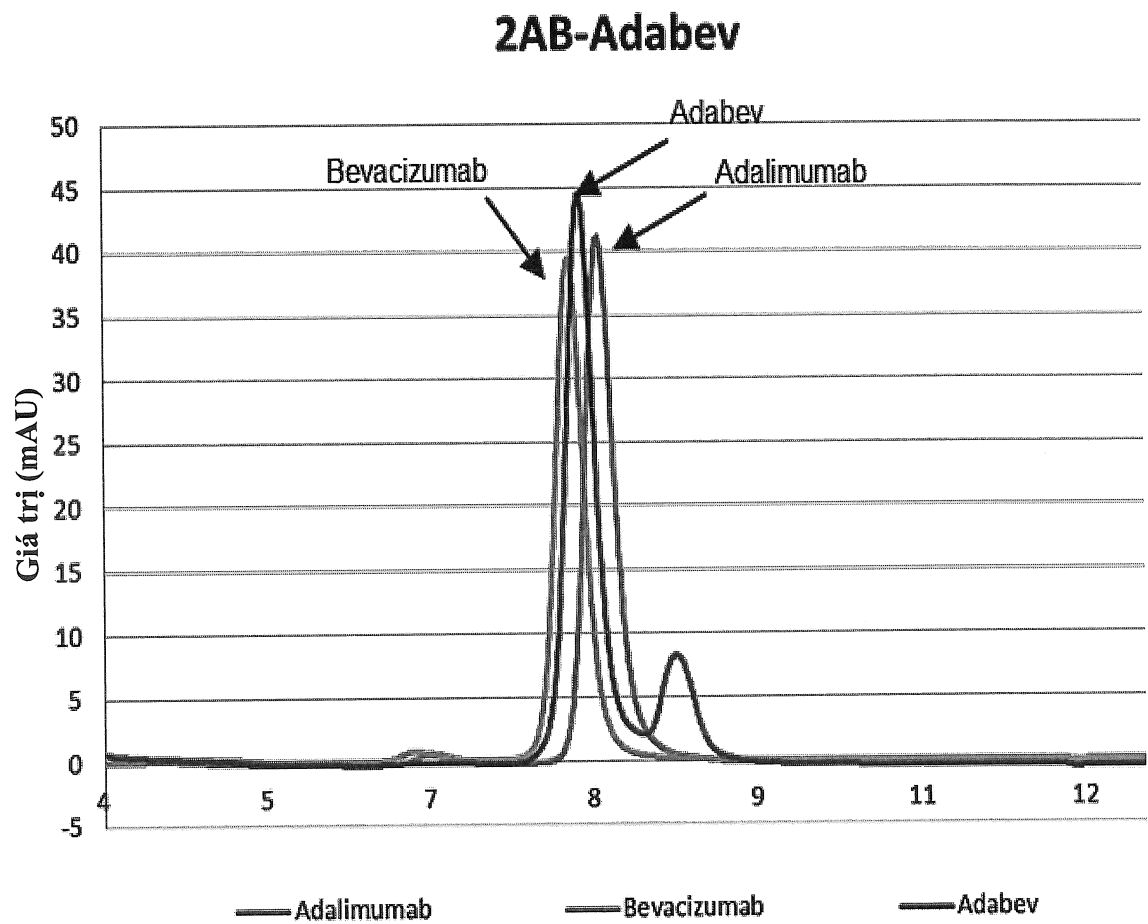


FIG. 30

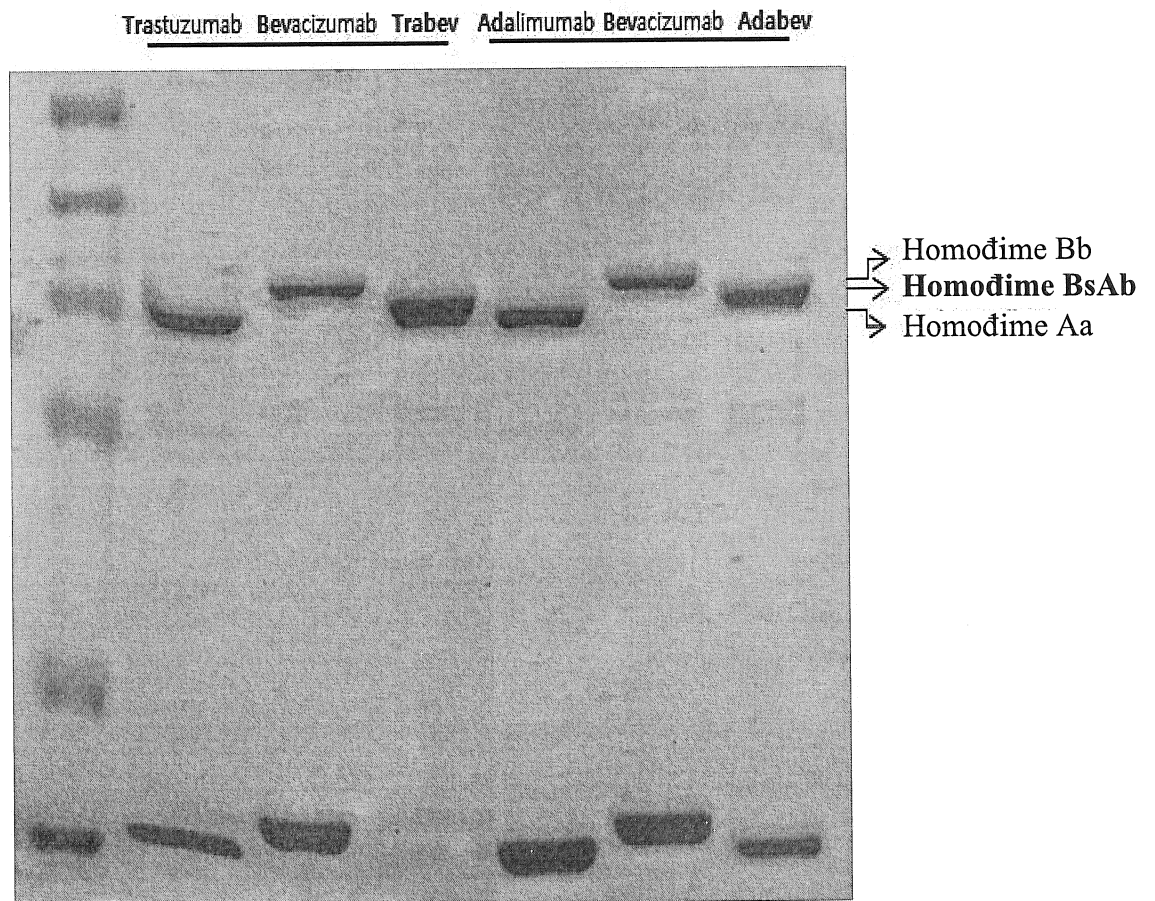


FIG. 31

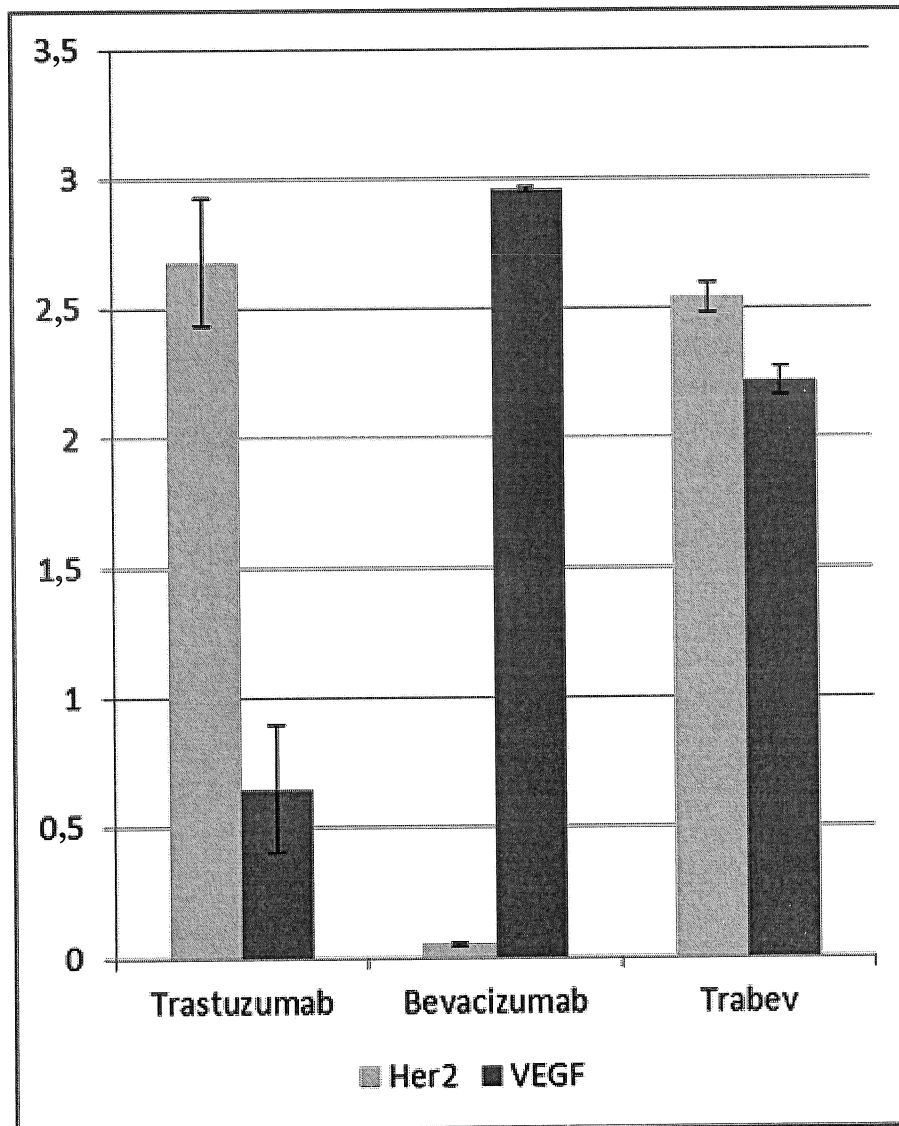
Trabev

FIG. 32

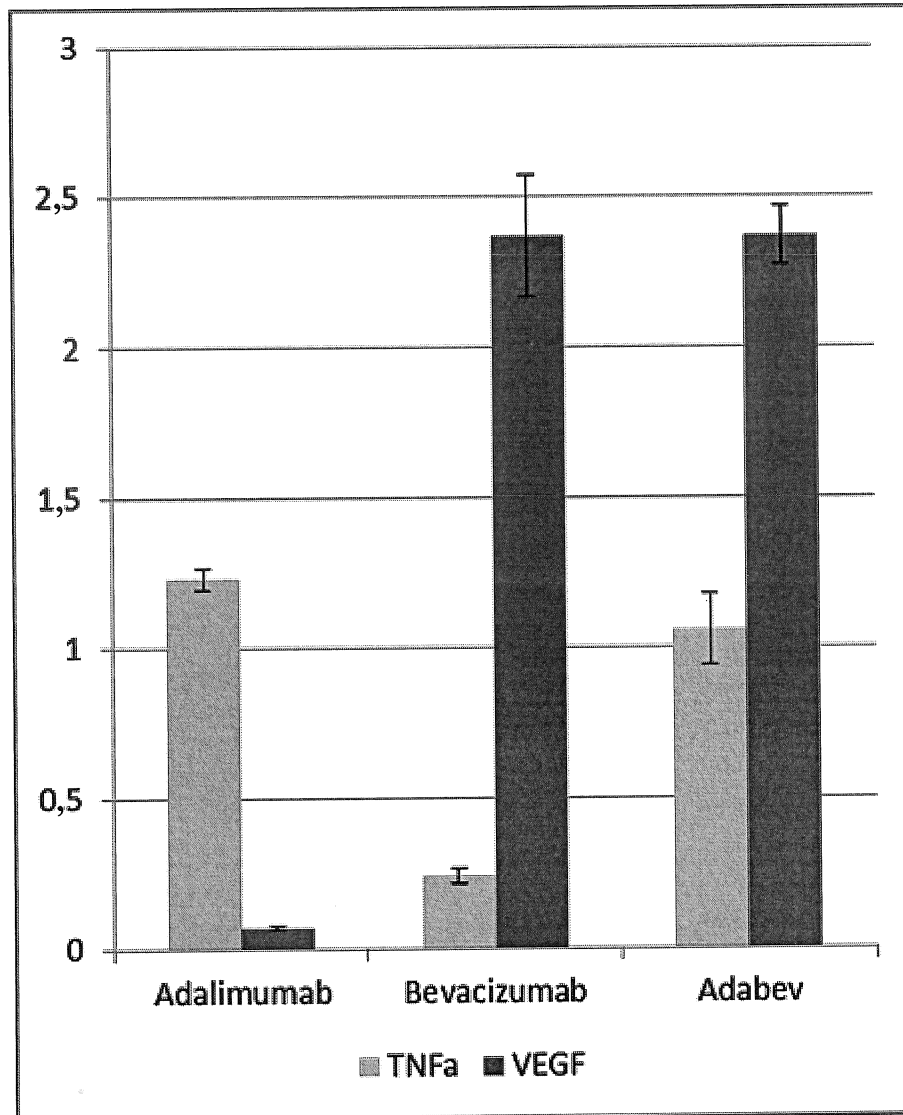
Adabev

FIG. 33a

Nghi vấn: Vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 ở người

Đối tượng: Vùng hằng định chuỗi nặng IgA1 ở người

		Điểm Điểm 125 bits(315)	Phương kỹ vọng 7e-38	Điều chỉnh chất nền thành phần	Tỷ lệ đồng nhất 108/341(32%)	Tỷ lệ dương tính 159/341(46%)	Khoảng trọng 17/341(4%)	
Nghi vấn	1			ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP-EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS				59
				AS P VFPL+ S + G + CLV+ +FP EP++V+W+ FP +				
Đối tượng	1			ASPTSPKVFPLSLCS-TQPDGNVVIACLVOGFFPQEPPLSVTWSESGQGVLTARNFPPSODA				59
Nghi vấn	60			SG-LYSLSSVVTVPSSS-LGTQTYICNVNH--KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP				115
				SG LY+ SS +T+P++ L ++ C+V H PS P + P				
Đối tượng	60			SGDLVTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPFCVPSTPPTPSPSTPPTPS				119
Nghi vấn	116			ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR				175
				P + L P +D L+ S +TC + + + V F W + +A P				
Đối tượng	120			PSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEA-NLTCTLTGL-RDASGVTFWTWTPSSGK--SAVOGPP				175
Nghi vấn	176			EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLF				235
				E Y V SVL + W +GK + C + P+ T+SK+ G P+V+ LP				
Đối tượng	176			ERDLGCGCYSVSSVLPGCAEPWNHKGKFTCTAAYPESKTPLTATLSKS-GNTFRPEVHLLP				234
Nghi vấn	236			PSRDELTKNQ-VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQ--PENNYKTTTPPVLD-SDG--SFEL				289
				P +EL N+ V+LTCL +GF P D+ V W Q P Y T + S G +F+ +				
Đối tượng	235			PPSEELALNELVLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTVASRQEPSPQGTTFV				294
Nghi vấn	290			YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK				330
				S L V W++G+ FSC V HEAL +TQK++ GK				
Đối tượng	295			TSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGK				335

K409 S364 K370

F405

FIG. 33b

Nghi vấn: Chuỗi nhẹ globulin miễn dịch ở người (kappa)

Đối tượng: Chuỗi nhẹ globulin miễn dịch ở người (lambdα)

		Điểm	Phương	Tỷ lệ	Tỷ lệ	Khoảng	
		Điểm	ky vọng	pháp	đồng nhất	dương tính	trống
		151 bits(382)	2e-50	Điều chỉnh chất nền thành phần	90/233(39%)	138/233(59%)	12/233(5%)
Nghi vấn	7	VIMLLLWVSGTCGDIILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQFVGSSIHMYQORTNGSPRL	66				
		+ + +L + +G+ LTQ P ++SVSPG+ S +C + + WYQ + SP L					
Đối tượng	6	LFLGLVLAICTGSGVASVELTQ-PPLVSVSPGQTASITCSGDKLGDNACWYQLKFGQSPVL	64				
Nghi vấn	67	LIKYASESMGIPSRFSGSGSGTDFTLSINTVESEDIADYYCQ---QSHSWPFTFGSGTN	123				
		+I + SGIP R SGS SG TL+I+ ++ D A+YYCQ S SW FG GT					
Đối tượng	65	VIIQDNRRPSGIPERISGSNSGNTATLTISGTOAMDEAEYYCQAWDSSTSW--VFGGGTK	122				
Nghi vấn	124	LEV-KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNPFYPREAKVQWKVDNA-LOSGNSQOE	181				
		L V + AAPSV +FPPS E+L++ A++VCL+++FYP V WK D++ +++G E					
Đối tượng	123	LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVANKADSSPVKAG--VE	180				
Nghi vấn	182	SVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	234				
		+ T ++ Y+ SS L+L+ ++ H+ Y+C+VTH+G S V K+ EC					
Đối tượng	181	TTTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQCQVTHEG--STVEKTVAPTEC	231				

S131 & V133

FIG. 33c

Trình tự C _{H1}	L145	S183
IgG1 ở người	ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLAKDYFPEPVTVMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS	SSVWTVPPSSSLGTQTYTCNNVHPSENTKVDKRV
IgG2 ở người	ASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLAKDYFPEPVTVMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS	SSVWTVPPSSNFGTQTYTCNVDEHPSENTKVDKTV
IgG3 ở người	ASTKGPSVFPPLAPCSRSTSGGTAALGCLAKDYFPEPVTVMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS	SSVWTVPPSSSLGTQTYTCNNVHPSENTKVDKRV
IgG4 ở người	ASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLAKDYFPEPVTVMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS	SSVWTVPPSSSLGTQTYTCNVDEHPSENTKVDKRV
IgG1 ở chuột	AKTTAPSVYPLAPGSAAQTNMNTLGC	LAKGYFPEPVTVMNSGSLSSGVHTFPAVLQS
IgG2 ^a ở chuột	AKTTAPSVYPLAPVCGGTGSSVTLGC	LAKGYFPEPVTVMNSGSLSSGVHTFPALLQS
IgG2 ^a ở chuột	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSTLGC	LAKGYFPEPVTVMNSGSLSSGVHTFPALLQS
IgG2b ở chuột	AKTTAPSVYPLAPCGCDTTGSSVTLGC	LAKGYFPEPVTVMNSGSLSSGVHTFPALLQS
IgG3 ở chuột	TTTAPSVYPLVPGCSDTSGSSVTLGC	LAKGYFPEPVTVMNYGALSSGVHTVSSVLQS
IgG1 ở chuột cống	AETTAPSVYPLAPGTALKNSMNTLGC	LAKGYFPEPVTVMNSGALSSGVHTFPAVLQS
IgG2a ở chuột cống	AETTAPSVYPLAPGTALKNSMNTLGC	LAKGYFPEPVTVMNSGALSSGVHTFPALLQS
IgG2b ở chuột cống	AQTAPSVYPLAPCGCDTTSSTVTLGC	LAKGYFPEPVTVMNSGALSSDVHTFPALLQS
IgG2c ở chuột cống	AETTAPSVYPLVPGCSGTSGLVTLGC	LAKGYFPEPVTVMNSGALSSGVHTFPALLQS

FIG. 33d

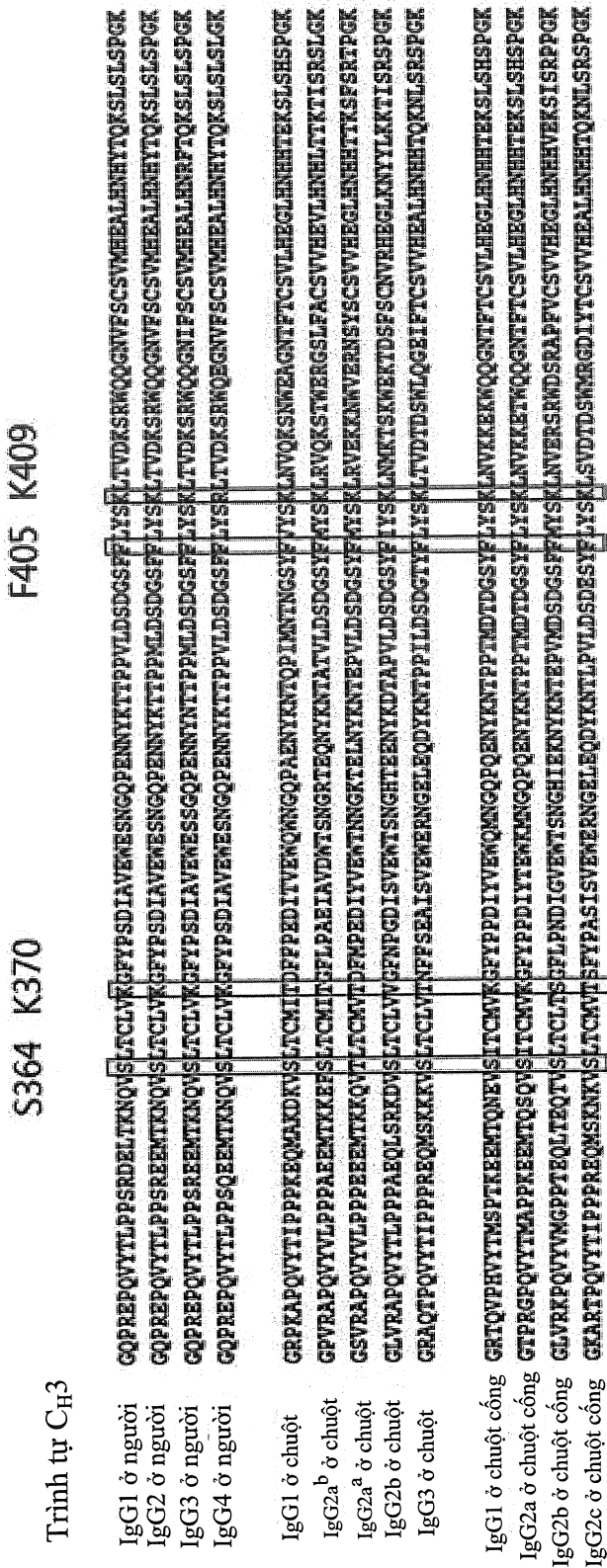


FIG. 34

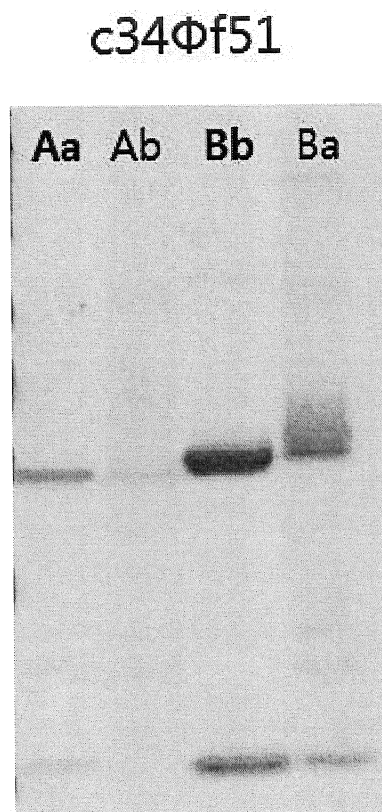


FIG. 35

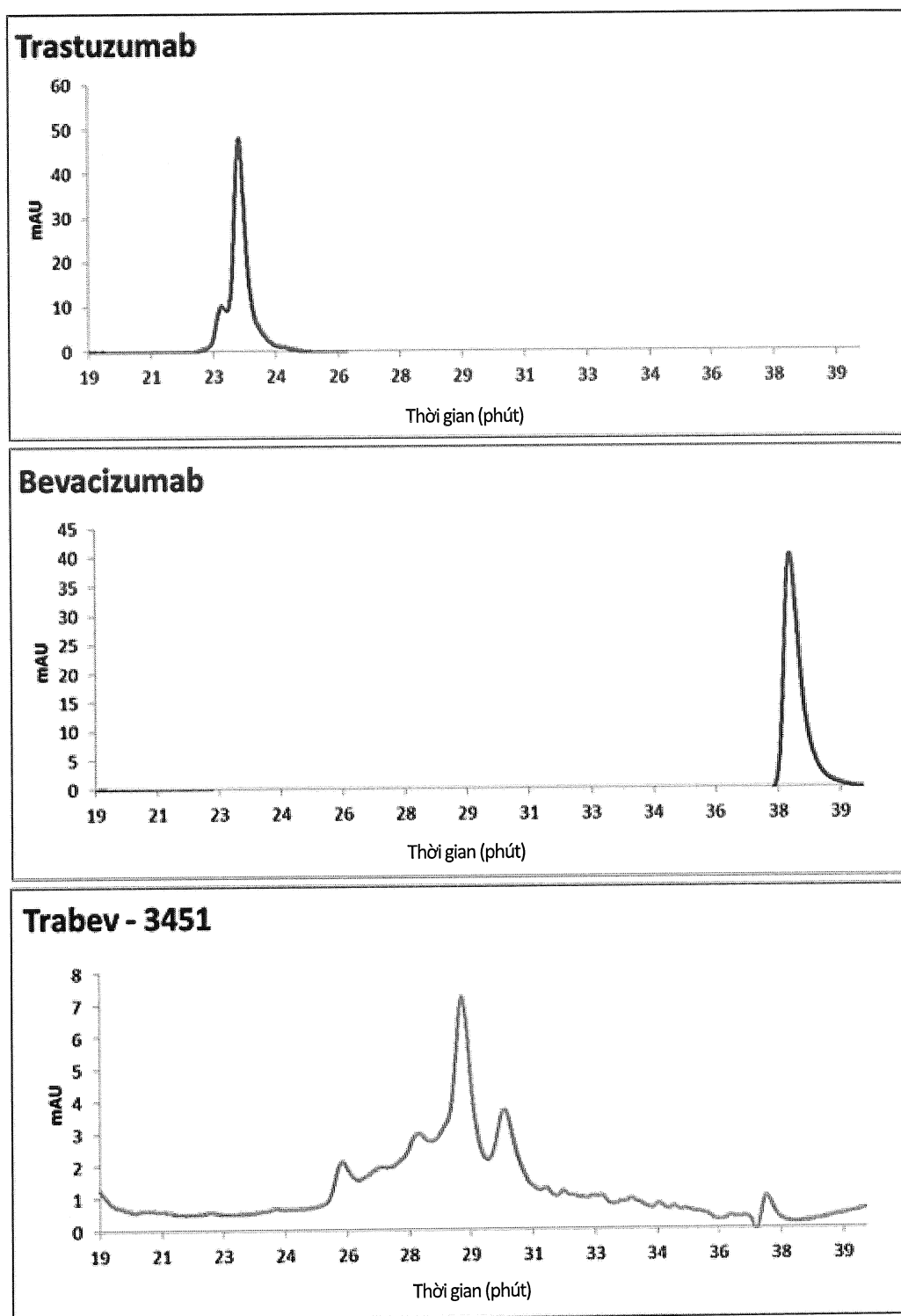


FIG. 36

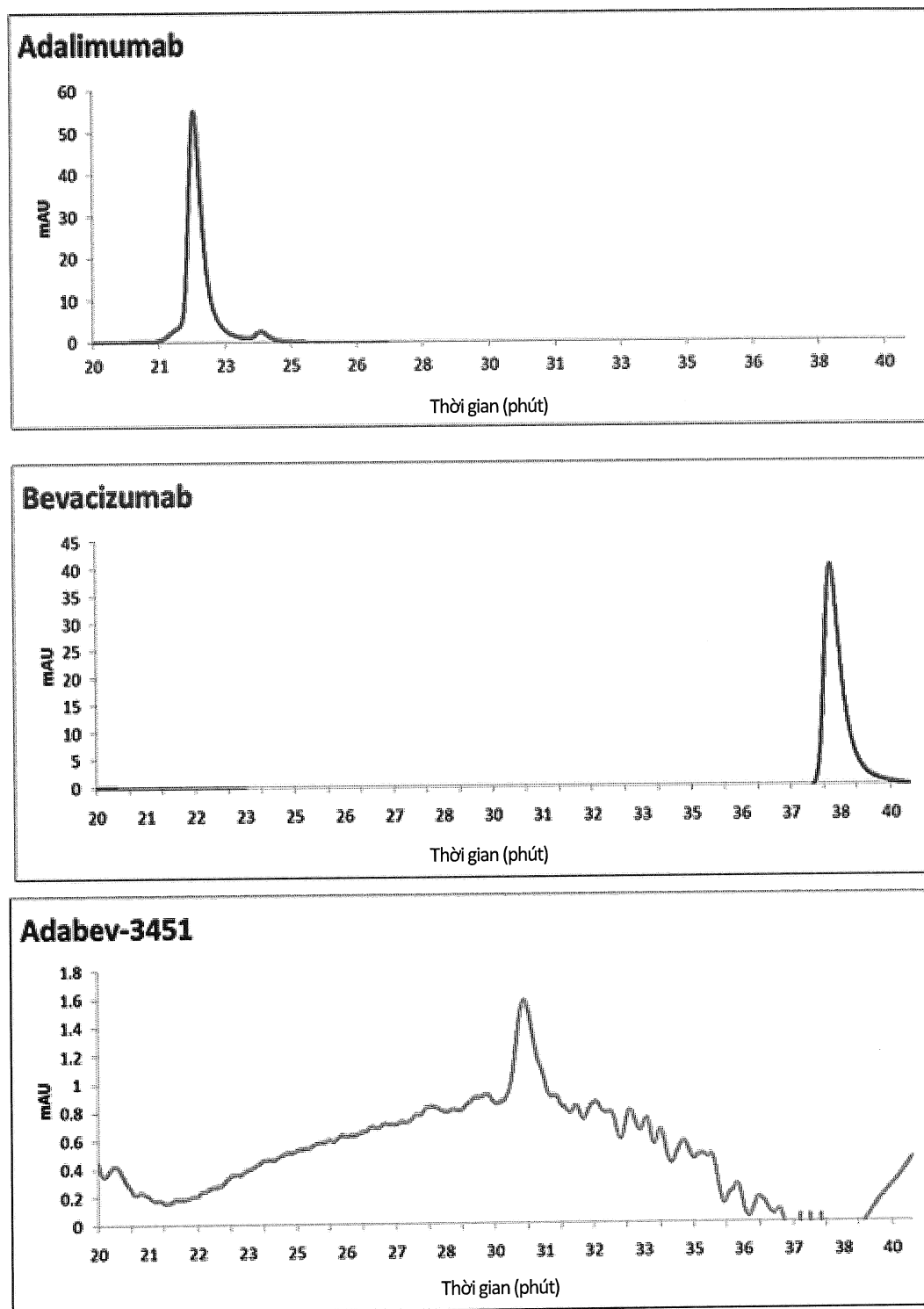


FIG. 37

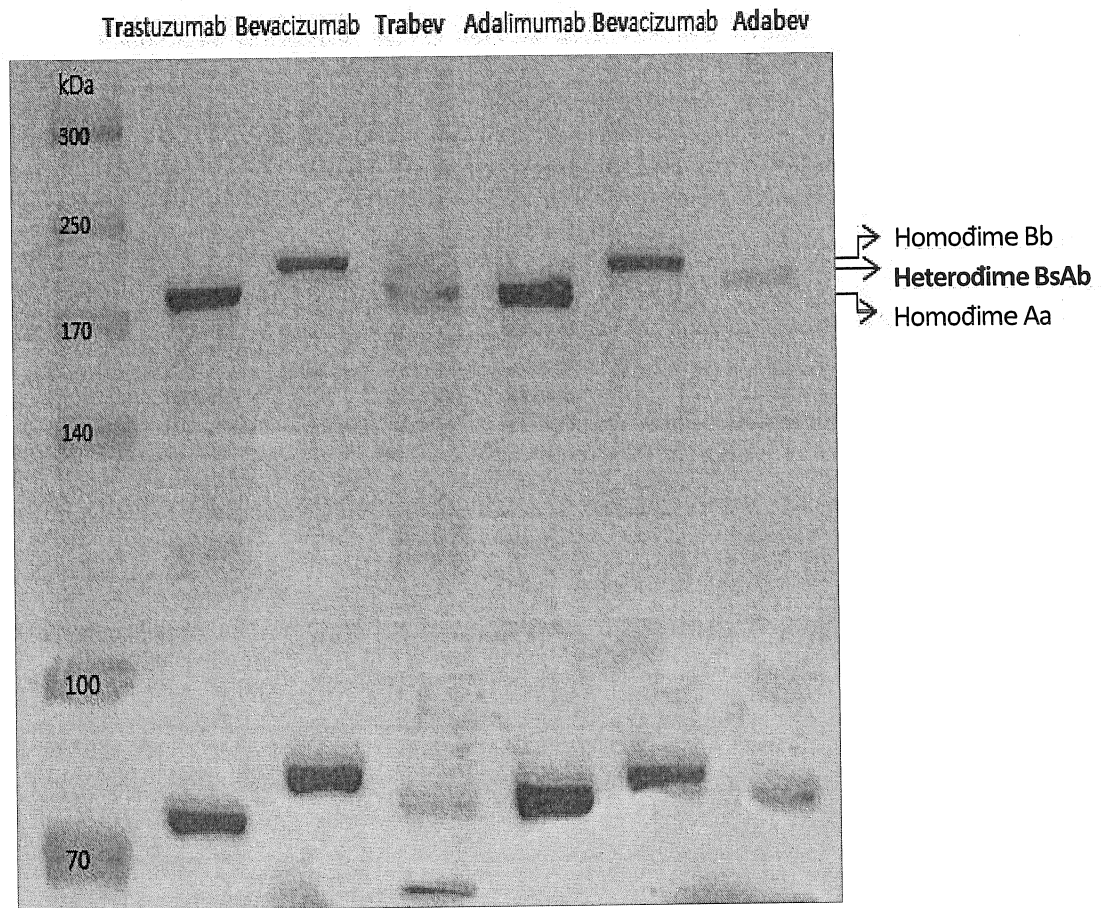


FIG. 38

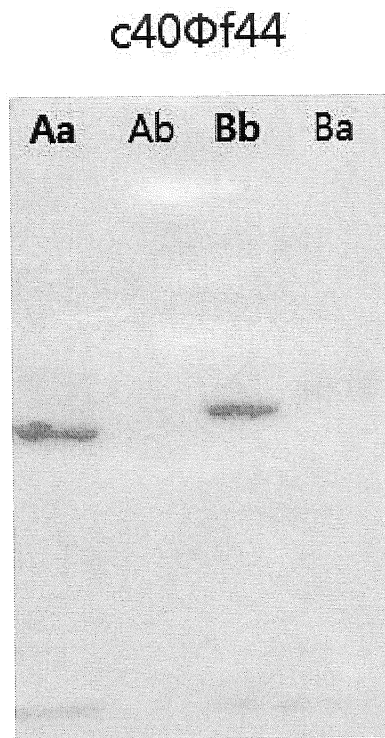


FIG. 39

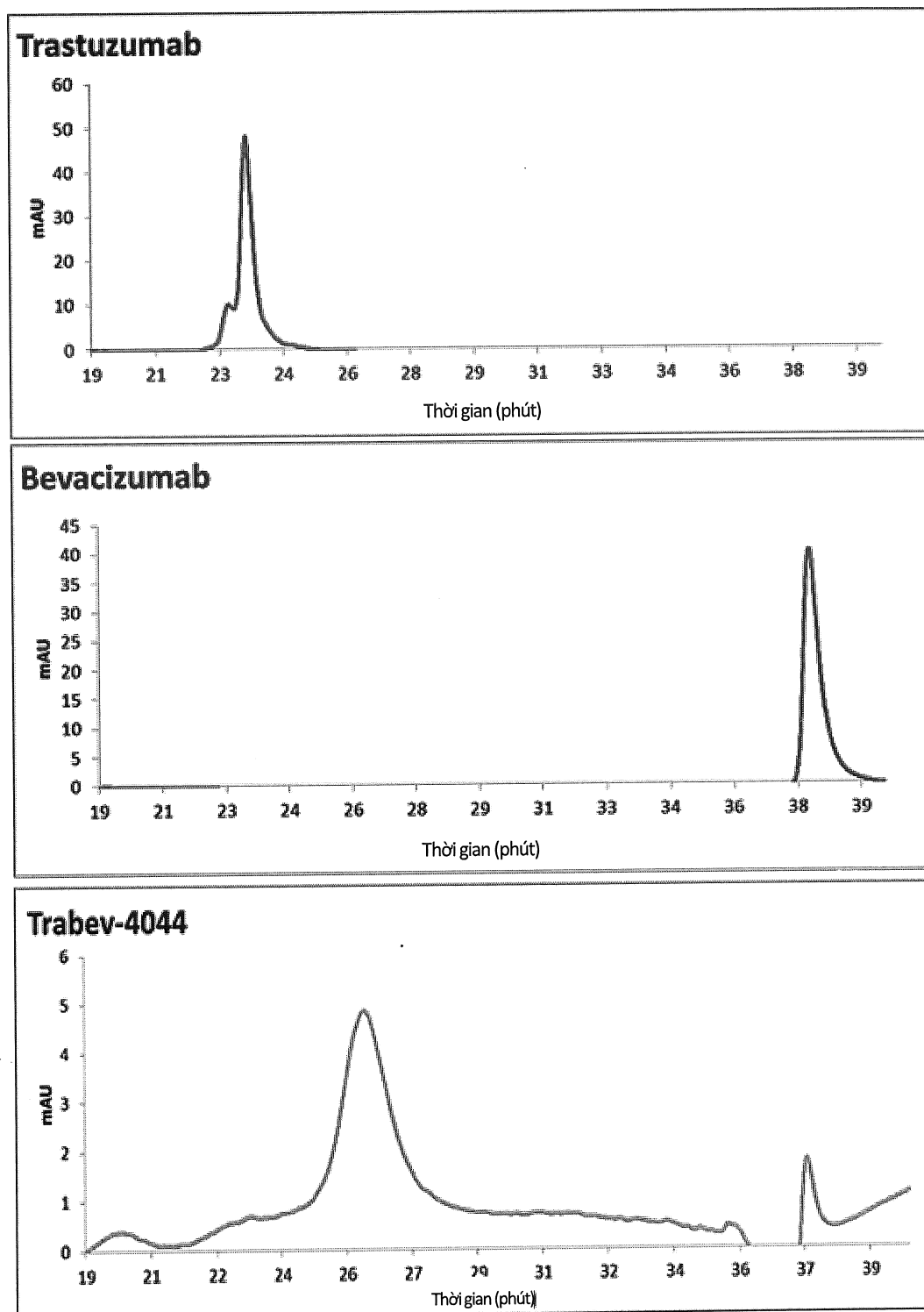


FIG. 40

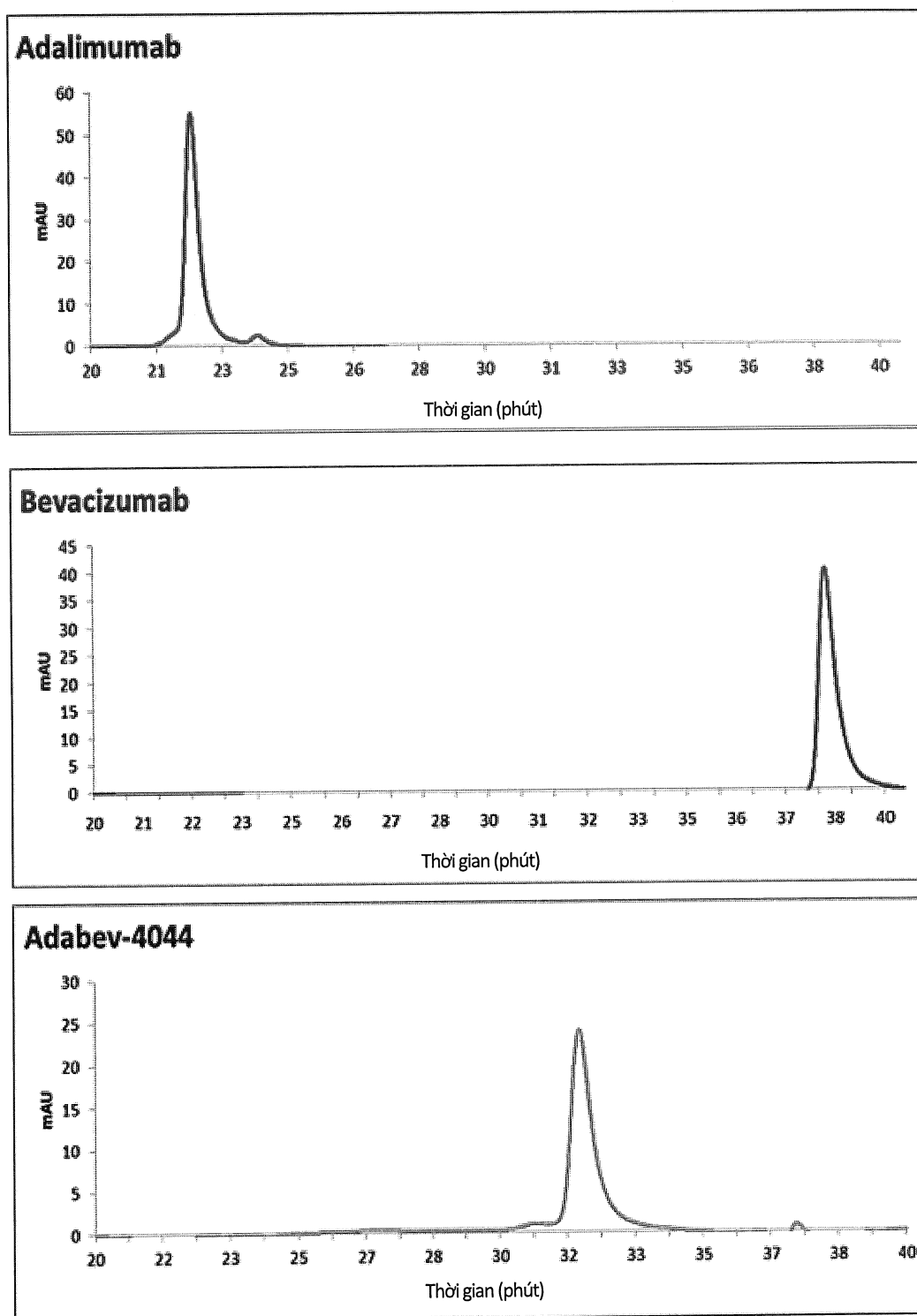


FIG. 41

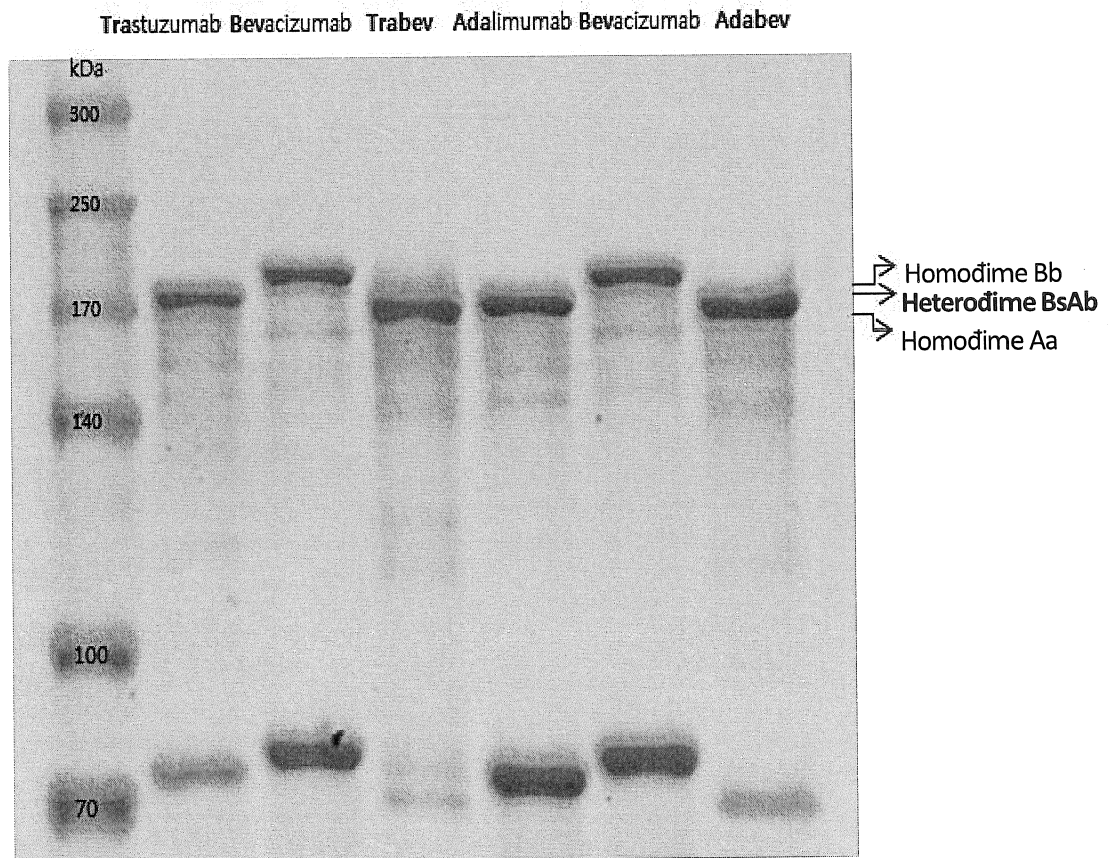
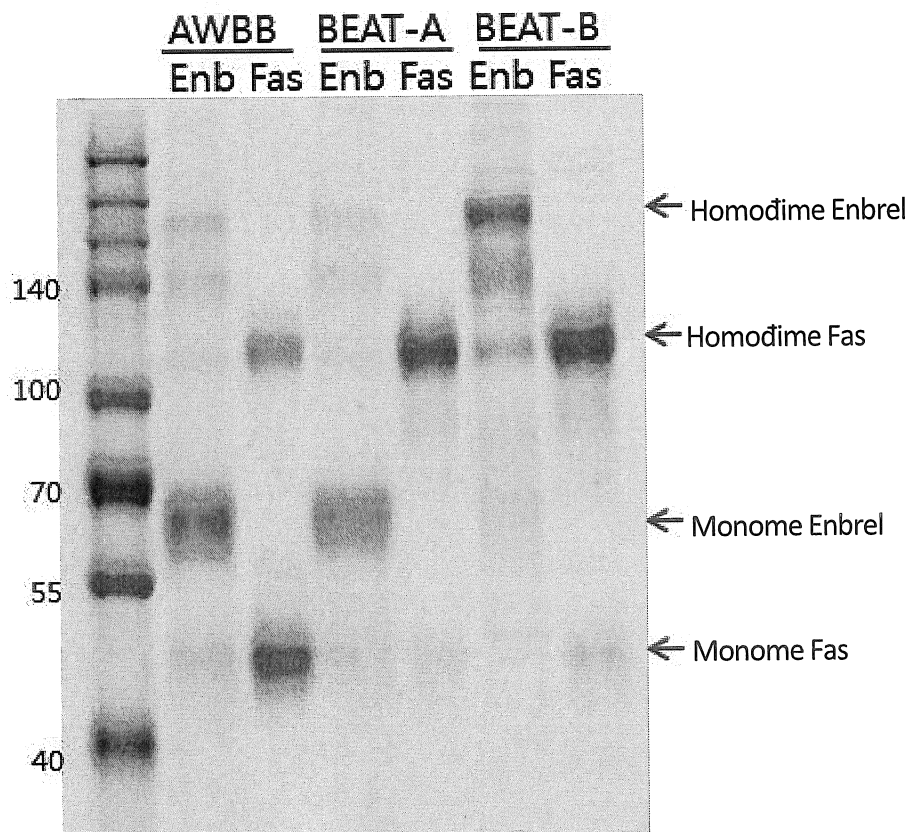


FIG. 42



<110> Ibentrus, Inc.

<120> PROTEIN ĐẶC HIỆU KÉP VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHÚNG

<130> OPP20173983KR

<150> KR10-2016-0091157

<151> 19-07-2016

<150> KR10-10-2017-0091210

<151> 18-07-2017

<160> 54

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH1 của IgG1 ở người

<400> 1

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 Lys Thr His Thr
 100 105

<210> 2

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH1 của IgG2 ở người

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 100 105

<210> 3

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH1 của IgG3 ở người

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 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 Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
 100 105 110

<210> 4

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH1 của IgG4 ở người

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Ser Pro Asn Met Val Pro His Ala His His Ala Gln
 100 105 110

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH1 của IgA1 ở người

<400> 5

Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr
 1 5 10 15

Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
 20 25 30

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val
 35 40 45

Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr
 50 55 60

Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly
 65 70 75 80

Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp
 85 90 95

Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro
 100 105

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH1 của IgA2 ở người

<400> 6

Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Asp Ser Thr

1 5 10 15

Pro Gln Asp Gly Asn Val Val Val Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe

20 25 30

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Asn Val

35 40 45

Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr

50 55 60

Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Pro Asp Gly

65 70 75 80

Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp

85 90 95

Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Pro Pro Pro Pro

100 105

<210> 7

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH1 của IgD ở người

<400> 7

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

His Pro Lys Asp Asn Ser Pro Val Val Leu Ala Cys Leu Ile Thr Gly
20 25 30

Tyr His Pro Thr Ser Val Thr Val Thr Trp Tyr Met Gly Thr Gln Ser
35 40 45

Gln Pro Gln Arg Thr Phe Pro Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ser Tyr Tyr
50 55 60

Met Thr Ser Ser Gln Leu Ser Thr Pro Leu Gln Gln Trp Arg Gln Gly
65 70 75 80

Glu Tyr Lys Cys Val Val Gln His Thr Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu
85 90 95

Ile Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser
100 105 110

<210> 8

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH1 của IgE ở người

<400> 8

Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys
 1 5 10 15

Asn Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Ala Thr
 20 25 30

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Cys Asp Thr Gly Ser Leu
 35 40 45

Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly
 50 55 60

His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys
 65 70 75 80

Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp
 85 90 95

Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser Val Cys Ser Arg Asp Phe Thr
 100 105 110

<210> 9

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH1 của IgM người

<400> 9

Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
 1 5 10 15

Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp

20

25

30

Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser

35

40

45

Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys

50

55

60

Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln

65

70

75

80

Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn

85

90

95

Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro

100

105

110

<210> 10

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CL của chuỗi kappa ở người

<400> 10

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> 11

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CL của chuỗi lambda 1 ở người

<400> 11

Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu

1

5

10

15

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

20

25

30

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala

35

40

45

Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 50 55 60

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 65 70 75 80

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 85 90 95

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100

<210> 12

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CL của chuỗi lambda 2 ở người

<400> 12

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 20 25 30

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 35 40 45

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 50 55 60

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 65 70 75 80

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 85 90 95

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100

<210> 13

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CL của chuỗi lambda 3 ở người

<400> 13

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 20 25 30

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 35 40 45

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 50 55 60

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys
 65 70 75 80

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 85 90 95

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100

<210> 14

<211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CL của chuỗi lambda 7 ở người

<400> 14

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val Ser Asp Phe Tyr Pro
 20 25 30

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Val
 35 40 45

Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 50 55 60

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 65 70 75 80

Ser Tyr Ser Cys Arg Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 85 90 95

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH3 của IgG1 ở người

<400> 15

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

1

5

10

15

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

20

25

30

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

35

40

45

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

50

55

60

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

65

70

75

80

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

85

90

95

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100

105

<210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens miền CH3 của IgG2 ở người

<400> 16
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 1 5 10 15

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 20 25 30

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 35 40 45

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 50 55 60

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 65 70 75 80

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 85 90 95

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 17

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH3 của IgG3 ở người

<400> 17

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

1 5 10 15

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

20 25 30

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro

35 40 45

Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser

50 55 60

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

65 70 75 80

Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg

85 90 95

Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

100 105

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH3 của IgG4 ở người

<400> 18

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

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
20 25 30

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
35 40 45

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

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
65 70 75 80

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
85 90 95

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
100 105

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH3 của IgA1 ở người

<400> 19

Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu

1 5 10 15

Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly

20 25 30

Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu

35 40 45

Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser

50 55 60

Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala

65 70 75 80

Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu

85 90 95

Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly

100 105 110

Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser

115 120

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH3 của IgA2 ở người

<400> 20

Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu

1 5 10 15

Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly

20 25 30

Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu

35 40 45

Leu Pro Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser

50 55 60

Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser

65 70 75 80

Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr

85 90 95

Ile Asp Arg Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly

100 105 110

Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser

115 120

<210> 21

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH3 của IgD ở người

<400> 21

Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser

1 5 10 15

Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe

20 25 30

Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val

35 40 45

Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Arg Ser

50 55 60

Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser

65 70 75 80

Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg

85 90 95

Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp

100 105 110

His Gly Pro Met Lys Val Lys

115

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH4 của IgE ở người

<400> 22

Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly Ser

1 5 10 15

Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro Glu

20 25 30

Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp Ala

35 40 45

Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe

50 55 60

Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp

65 70 75 80

Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr

85 90 95

Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys Glu Leu Asp Val Cys

100 105 110

Val Glu Glu Ala Glu Gly Glu Ala

115 120

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens miền CH3 của IgM ở người

<400> 23

Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala

1 5 10 15

Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val

20 25 30

Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly

35 40 45

Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu

50 55 60

Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser

65 70 75 80

Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Ala His Glu

85 90 95

Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly

100 105 110

Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser

115 120

<210> 24

<211> 1386

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDS của TNFRSF1B (Enbrel : NM_001066), trong đó vùng 1-771 mã hóa vùng ngoại bào

<400> 24

atggcgcccg tcgccgtctg ggccgcgctg gccgtcggac tggagctctg ggctgcggcg	60
cacgccttgc ccgccaggt ggcatttaca ccctacgcc cggagcccgg gagcacatgc	120
cggctcagag aatactatga ccagacagct cagatgtgct gcagcaaattg ctcgccgggc	180
caacatgcaa aagtcttctg taccaagacc tcggacaccg tgtgtgactc ctgtgaggac	240
agcacataca ccagctctg gaactgggtt cccgagtgtg tgagctgtgg ctcccgtgt	300
agctctgacc aggtggaaac tcaagcctgc actcggaac agaaccgcat ctgcacctgc	360
aggcccggct ggtactgcgc gctgagcaag caggaggggt gccggctgtg cgcgccgctg	420
cgcaagtgcc gcccgggctt cggcgtggcc agaccaggaa ctgaaacatc agacgtggtg	480
tgcaagccct gtgccccggg gacgttctcc aacacgactt catccacgga tatttgcagg	540
ccccaccaga tctgtaacgt ggtggccatc cctgggaatg caagcatgga tgcagtctgc	600
acgtccacgt cccccaccg gagtatggcc ccaggggcag tacacttacc ccagccagtg	660
tccacacgat cccaacacac gcagccaact ccagaacca gcaactgctcc aagcacctcc	720
ttcctgctcc caatgggccc cagcccccca gctgaaggga gcaactggcg cttcgctctt	780

ccagttggac tgattgtggg tgtgacagcc ttgggtctac taataatagg agtgggtgaac 840
 tgtgtcatca tgacccaggt gaaaaagaag cccttgtgcc tgcagagaga agccaagggtg 900
 cctcacttgc ctgccgataa ggcccggggg acacagggcc ccgagcagca gcacctgctg 960
 atcacagcgc cgagctccag cagcagctcc ctggagagct cggccagtgc gttggacaga 1020
 agggcgccca ctcggaacca gccacaggca ccaggcgtgg aggccagtgg ggccggggag 1080
 gcccgggcca gcaccgggag ctcagattct tcccctggtg gccatgggac ccaggtcaat 1140
 gtcacctgca tcgtgaacgt ctgtagcagc tctgaccaca gtcacagtgc ctctcccaa 1200
 gccagctcca caatgggaga cacagattcc agcccctcgg agtccccgaa ggacgagcag 1260
 gtccccttct ccaaggagga atgtgccttt cggtcacagc tggagacgcc agagaccctg 1320
 ctgggggagca ccgaagagaa gccctgccc cttggagtgc ctgatgctgg gatgaagccc 1380
 agttaa 1386

<210> 25

<211> 1008

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDS của thụ thể Fas (NM_000043), trong đó vùng 1-519 mã hóa vùng ngoại bào

<400> 25

atgctgggca tctggaccct cctacctctg gttcttacgt ctgttgctag attatcgtcc	60
aaaagtgtta atgcccaagt gactgacatc aactccaagg gattggaatt gaggaagact	120
gttactacag ttgagactca gaacttgga ggcctgcatc atgatggcca attctgccat	180
aagccctgtc ctccaggtga aaggaaagct agggactgca cagtcaatgg ggatgaacca	240
gactgcgtgc cctgccaaga agggaaggag tacacagaca aagcccattt ttcttccaaa	300
tgcagaagat gtagattgtg tgatgaagga catggcttag aagtggaaat aaactgcacc	360
cggaccacaga ataccaagtg cagatgtaaa ccaaactttt ttgttaactc tactgtatgt	420
gaacactgtg acccttgcac caaatgtgaa catggaatca tcaaggaatg cacactcacc	480
agcaacacca agtgcaaaga ggaaggatcc agatctaact tgggggtggct ttgtcttctt	540
cttttgccaa ttccactaat tgtttgggtg aagagaaagg aagtacagaa aacatgcaga	600
aagcacagaa aggaaaacca aggttctcat gaatctccaa ctttaaattc tgaaacagtg	660
gcaataaatt tatctgatgt tgacttgagt aaatatatca ccactattgc tggagtcatg	720
acactaagtc aagttaaagg ctttgttcga aagaatggtg tcaatgaagc caaaatagat	780
gagatcaaga atgacaatgt ccaagacaca gcagaacaga aagttcaact gcttcgtaat	840
tggcatcaac ttcattgaaa gaaagaagcg tatgacacat tgattaaaga tctcaaaaaa	900

gccaatcttt gtactcttgc agagaaaatt cagactatca tcctcaagga cattactagt 960

gactcagaaa attcaaactt cagaaatgaa atccaaagct tggctctag 1008

<210> 26

<211> 684

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDS của Fc ở người (từ globulin miễn dịch G ở người)

<400> 26

gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca 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 ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 420

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540
 gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 684

<210> 27

<211> 127

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng cúm B, 2B9

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Leu Asn Trp Lys Gly Asn Ser Val Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Gly Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Asn Lys Ala Asp Ala Ser Met Asp Tyr Tyr Tyr His His
 100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 28

<211> 381

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của 2B9

<400> 28

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaagtc cctgagactc 60

tcctgtgcag ccactggatt cacatttgac gattacgcca tgcactgggt ccgccaagct 120

ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaagt cttaattgga agggaaatag tgtagactac 180

gcggactctg tgagggggccg attcaccatg tccagagaca acgccaagaa actagtgtat 240
 ctgcaaatga acggtctgag aggtgacgac acggccgtct atttttgtgc aaaagataat 300
 aaagcggatg catctatgga ctactactac caccacggta tggacgtctg gggccaaggg 360
 accacggtca ccgtctcctc g 381

<210> 29
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể kháng cúm A, 4D9

<400> 29

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ile Ser Gly Ala Ser Ile Asn Thr Asp
 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 Arg Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Arg
 50 55 60

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

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

Arg Asp Val Thr Gly Ile Ser Arg Glu Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 30

<211> 363

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể
 kháng cúm A, 4D9

<400> 30

caggtcacct tgagggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcacta tctccggtgc ctccatcaat actgactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattggctat atctattaca gagggcgcac caactacaac 180

ccctccctca ggagccgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaatca attctccctg 240

cagatgacgt ctatgaccgc tgctgacacg gccgtatatatt actgtgcgag agatgtgact 300
ggcatcagtc gagaaaatgc ttttgatatac tggggccaag gcaccctggt caccgtctcc 360
tcg 363

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ thông thường đối với 4D9 và 2B9

<400> 31
Ala Ile Arg 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 Gly Tyr
20 25 30

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

Tyr 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 Ile Pro Thr

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 32

<211> 321

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ thông thường đối với 4D9 và 2B9

<400> 32

gccatccgga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc ggctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctctt gatctatgct gcatccagtt tgcagagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agctacagta tccccaccac cttcggccaa 300

gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 33

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 ở người

<400> 33

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 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100

105

110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 34

<211> 335

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng hằng định chuỗi nặng IgA1 ở người

<400> 34

Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr
 1 5 10 15

Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
 20 25 30

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val
 35 40 45

Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr
 50 55 60

Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly
 65 70 75 80

Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp
 85 90 95

Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro
 100 105 110

Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro Arg Leu Ser
 115 120 125

Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn
 130 135 140

Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe
 145 150 155 160

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

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

Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr
 195 200 205

Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn
 210 215 220

Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu
 225 230 235 240

Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser
 245 250 255

Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro
 260 265 270

Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly
 275 280 285

Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp
 290 295 300

Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys
 325 330 335

<210> 35

<211> 228

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ globulin miễn dịch ở người (Kapa)

<400> 35

Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly Asp Ile
 1 5 10 15

Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg
 20 25 30

Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Gly Ser Ser Ile His
 35 40 45

Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr
 50 55 60

Ala Ser Glu Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 65 70 75 80

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Thr Val Glu Ser Glu Asp
 85 90 95

Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Trp Pro Phe Thr Phe
 100 105 110

Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 130 135 140

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 145 150 155 160

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 165 170 175

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
 180 185 190

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

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
 210 215 220

Arg Gly Glu Cys
 225

<210> 36

<211> 226

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ globulin miễn dịch ở người (Lambda)

<400> 36

Leu Phe Leu Gly Val Leu Ala Tyr Cys Thr Gly Ser Val Ala Ser Tyr
 1 5 10 15

Glu Leu Thr Gln Pro Pro Leu Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala
 20 25 30

Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Asn Tyr Ala Cys Trp
 35 40 45

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

Asn Arg Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser Asn Ser
 65 70 75 80

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu
 85 90 95

Ala Glu Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ser Trp Val Phe
 100 105 110

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

Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
 130 135 140

Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr
 145 150 155 160

Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr
 165 170 175

Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr
 180 185 190

Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys
 195 200 205

Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr
 210 215 220

Glu Cys
 225

<210> 37

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền CH1 của IgG1 ở chuột

<400> 37

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

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu

50

55

60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val

65

70

75

80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys

85

90

95

Ile

<210> 38

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền CH1 của IgG2ab ở chuột

<400> 38

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly

1

5

10

15

Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr

20

25

30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

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

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Asn Thr Trp Pro Ser Gln Thr Ile
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile

<210> 39

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền CH1 của IgG2aa ở chuột

<400> 39

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile

<210> 40

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> miền CH1 của IgG2b ở chuột

<400> 40

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Ser Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45

Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met
 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
 65 70 75 80

Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Leu

<210> 41

<211> 96

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền CH1 của IgG3 ở chuột

<400> 41

Thr Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Cys Ser Asp
 1 5 10 15

Thr Ser Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe
 20 25 30

Pro Glu Pro Val Thr Val Lys Trp Asn Tyr Gly Ala Leu Ser Ser Gly
 35 40 45

Val Arg Thr Val Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Phe Tyr Ser Leu Ser
 50 55 60

Ser Leu Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Ile
 65 70 75 80

Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Glu Leu Ile Lys Arg Ile
 85 90 95

<210> 42

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền CH1 của IgG1 ở chuột cống

<400> 42

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

Leu Lys Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser
 35 40 45

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

Thr Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Ser Ser Gln Ala Val
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile

<210> 43

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền CH1 của IgG2a ở chuột cống

<400> 43

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

Leu Lys Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser
 35 40 45

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

Thr Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Ile

<210> 44

<211> 95

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền CH1 của IgG2b ở chuột cống

<400> 44

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

Asp Thr Thr Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser
 35 40 45

Asp Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60

Thr Ser Ser Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys
 65 70 75 80

Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 85 90 95

<210> 45

<211> 97

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền CH1 của IgG2c ở chuột cống

<400> 45

Ala Thr Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Val Pro Gly Cys Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Ser Gly Ser Leu Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr

	20		25		30										
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Lys	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Ser	Ser
	35						40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Leu
	50						55					60			
Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Ser	Ser	Gln	Thr	Val
	65						70				75				80
Thr	Cys	Ser	Val	Ala	His	Pro	Ala	Thr	Lys	Ser	Asn	Leu	Ile	Lys	Arg
							85				90				95

Ile

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền CH3 của IgG1 ở chuột

<400> 46

Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu
1					5					10				15	

Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe

	20		25		30										
Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala
	35						40					45			
Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser	Tyr
	50						55					60			
Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly
	65						70					75			80
Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His
							85				90			95	
Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Lys					
							100				105				
<210>	47														
<211>	107														
<212>	PRT														
<213>	Trình tự nhân tạo														
<220>															
<223>	Miền CH3 của IgG2ab ở chuột														
<400>	47														
Gly	Pro	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Ala	Glu
	1						5					10			15
Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Glu	Phe	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Gly	Phe

20 25 30
 Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu
 35 40 45
 Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
 50 55 60
 Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly
 65 70 75 80
 Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His Glu Val Leu His Asn His Leu
 85 90 95
 Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys
 100 105
 <210> 48
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Miền CH3 của IgG2aa ở chuột
 <400> 48
 Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe

Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu
 20 25 30
 35 40 45

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

Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg
 65 70 75 80

Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His
 85 90 95

Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 100 105

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền CH3 của IgG2b ở chuột

<400> 49

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

Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe

	20		25		30											
Asn	Pro	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Thr	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Glu	
	35		40		45											
Glu	Asn	Tyr	Lys	Asp	Thr	Ala	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	
	50		55		60											
Phe	Ile	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Met	Lys	Thr	Ser	Lys	Trp	Glu	Lys	Thr	
	65		70		75									80		
Asp	Ser	Phe	Ser	Cys	Asn	Val	Arg	His	Glu	Gly	Leu	Lys	Asn	Tyr	Tyr	
			85		90								95			
Leu	Lys	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Lys						
		100			105											
<210>	50															
<211>	107															
<212>	PRT															
<213>	Trình tự nhân tạo															
<220>																
<223>	Miền CH3 của IgG3 ở chuột															
<400>	50															
Gly	Arg	Ala	Gln	Thr	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Arg	Glu	
1		5		10		15										
Gln	Met	Ser	Lys	Lys	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asn	Phe	

	20		25		30										
Phe	Ser	Glu	Ala	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Glu
	35						40					45			
Gln	Asp	Tyr	Lys	Asn	Thr	Pro	Pro	Ile	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Thr	Tyr
	50						55					60			
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Asp	Ser	Trp	Leu	Gln	Gly
	65					70				75				80	
Glu	Ile	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	His
						85				90				95	
Thr	Gln	Lys	Asn	Leu	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Lys					
				100					105						
<210>	51														
<211>	107														
<212>	PRT														
<213>	Trình tự nhân tạo														
<220>															
<223>	Miền CH3 của IgG1 ở chuột cống														
<400>	51														
Gly	Arg	Thr	Gln	Val	Pro	His	Val	Tyr	Thr	Met	Ser	Pro	Thr	Lys	Glu
	1					5				10				15	
Glu	Met	Thr	Gln	Asn	Glu	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Met	Val	Lys	Gly	Phe
					20				25				30		

Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln
 35 40 45

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His
 85 90 95

Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 52

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền CH3 của IgG2a ở chuột cống

<400> 52

Gly Thr Pro Arg Gly Pro Gln Val Tyr Thr Met Ala Pro Pro Lys Glu
 1 5 10 15

Glu Met Thr Gln Ser Gln Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Thr Glu Trp Lys Met Asn Gly Gln Pro Gln

35

40

45

Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr

50

55

60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Thr Trp Gln Gln Gly

65

70

75

80

Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His

85

90

95

Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

100

105

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền CH3 của IgG2b ở chuột cống

<400> 53

Gly Leu Val Arg Lys Pro Gln Val Tyr Val Met Gly Pro Pro Thr Glu

1

5

10

15

Gln Leu Thr Glu Gln Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Thr Ser Gly Phe

20

25

30

Leu Pro Asn Asp Ile Gly Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Ile Glu

35

40

45

Lys Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Met Asp Ser Asp Gly Ser Phe

50

55

60

Phe Met Tyr Ser Lys Leu Asn Val Glu Arg Ser Arg Trp Asp Ser Arg

65

70

75

80

Ala Pro Phe Val Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His

85

90

95

Val Glu Lys Ser Ile Ser Arg Pro Pro Gly Lys

100

105

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền CH3 của IgG2c ở chuột cống

<400> 54

Gly Lys Ala Arg Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Arg Glu

1

5

10

15

Gln Met Ser Lys Asn Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Val Thr Ser Phe

20

25

30

Tyr Pro Ala Ser Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu Leu Glu

35

40

45

Gln Asp Tyr Lys Asn Thr Leu Pro Val Leu Asp Ser Asp Glu Ser Tyr

50

55

60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Thr Asp Ser Trp Met Arg Gly

65

70

75

80

Asp Ile Tyr Thr Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn His His

85

90

95

Thr Gln Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys

100

105