(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) **1-0037934**

(51)[2006.01] **C07K 16/28**; A61K 39/395; C12N 5/16; C12N 15/63; C12N 5/10; A61K 39/00

(13) **B**

(21) 1-2018-03351
(22) 02/02/2017
(86) PCT/EP2017/052202 02/02/2017
(87) WO 2017/134134 A1 10/08/2017
(30) 62/290,831 03/02/2016 US
(45) 25/12/2023 429
(43) 26/11/2018 368A

(73) 1. AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH (DE)
Staffelseestrasse 2, 81477 Munich, Germany
2. AMGEN INC. (US)
One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320-1799, United States of America

(72) RAUM, Tobias (DE); MUENZ, Markus (DE); BROZY, Johannes (DE); KUFER, Peter (DE); HOFFMANN, Patrick (DE); FRIEDRICH, Matthias (DE); RATTEL, Benno (DE); BOGNER, Pamela (DE); WOLF, Andreas (DE); POMPE, Cornelius (DE).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D &N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) CẤU TRÚC KHÁNG THỂ LIÊN HỢP TẾ BÀO T ĐẶC HIỆU KÉP BCMA VÀ CD3, CHẾ PHẨM CHỨA CHÚNG VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT CẤU TRÚC KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép của dạng Fc đặc hiệu được đặc trưng bởi việc bao gồm vùng thứ nhất gắn kết với BCMA, vùng thứ hai gắn kết với epitop ngoại bào của chuỗi CD3ε của người và/hoặc chuỗi CD3ε của khỉ *Macaca* và vùng thứ ba, là dạng Fc đặc hiệu. Ngoài ra, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa cấu trúc kháng thể, vectơ chứa polynucleotit này, tế bào chủ biểu hiện cấu trúc này, quy trình sản xuất và dược phẩm chứa chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép của dạng Fc đặc hiệu được đặc trưng bởi việc bao gồm vùng thứ nhất liên kết với BCMA, vùng thứ hai liên kết với epitop ngoại bào của chuỗi CD3ε của người và/hoặc chuỗi CD3ε của khỉ *Macaca* và vùng thứ ba, là dạng Fc đặc hiệu. Ngoài ra, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa cấu trúc kháng thể, vectơ chứa polynucleotit này, tế bào chủ biểu hiện cấu trúc này và dược phẩm chứa chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các phân tử thu được từ kháng thể đặc hiệu kép như các cấu trúc kháng thể BiTE® (thể liên hợp tế bào T đặc hiệu kép) là cấu trúc protein tái tổ hợp được tạo ra từ hai vùng liên kết thu được từ kháng thể được liên kết linh hoạt. Một vùng liên kết của các cấu trúc kháng thể BiTE® là đặc hiệu đối với kháng nguyên bề mặt kết hợp với khối u được chọn trên tế bào đích; vùng liên kết thứ hai là đặc hiệu đối với CD3, một cấu trúc dưới đơn vị của phức chất thụ thể tế bào T trên tế bào T. Bằng mô hình cụ thể của chúng, các cấu trúc kháng thể BiTE® được làm cho thích hợp duy nhất để liên kết tạm thời các tế bào T với các tế bào đích và, cùng lúc đó, hoạt hóa hữu hiệu khả năng tiêu hủy tế bào vốn có của các tế bào T chống lại các tế bào đích. Ngoài ra, sự phát triển quan trọng của việc tạo ra lần đầu tiên các cấu trúc kháng thể BiTE® (xem WO 99/54440 và WO 2005/040220) đã phát triển thành lâm sàng học ở dạng AMG 103 và AMG 110 là sự đề xuất các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép liên kết với epitop độc lập ở đầu tận cùng N của chuỗi CD3ε (WO 2008/119567). Các cấu trúc kháng thể BiTE® liên kết với epitop được chọn này không chỉ thể hiện tính đặc hiệu loài lai đối với chuỗi CD3ε người và *Callithrix jacchus, Saguinus oedipus* hoặc *Saimiri sciureus*, mà còn, do sự thừa nhận epitop đặc hiệu này (thay cho các epitop được mô tả trước đó của chất liên kết CD3 trong các phân tử liên hợp tế bào T đặc hiệu kép), không hoạt hóa theo cách không đặc hiệu các tế bào T với cùng một mức độ như quan sát được đối với việc tạo ra các kháng thể liên hợp tế T trước đó. Việc giảm sự hoạt hóa tế bào T này được liên kết tương quan với sự tái phân bố tế

bào T ít hơn hoặc được giảm ở các bệnh nhân, điều này được nhận dạng là nguy cơ của các tác dụng phụ.

Các cấu trúc kháng thể như được mô tả trong WO 2008/119567 có thể trải qua sự thanh thải nhanh khỏi cơ thể; do đó, trong khi chúng có thể nhanh chóng tới được hầu hết các phần trên cơ thể, và nhanh tạo thành và dễ dàng hơn để xử lý, các ứng dụng in vivo của chúng có thể bị giới hạn bởi sự tồn dư ngắn in vivo của chúng. Việc sử dụng kéo dài bằng cách truyền trong tĩnh mạch liên tục được sử dụng để đạt được hiệu quả điều trị vì thời gian bán thải in vivo ngắn của phân tử chuỗi đơn nhỏ này. Tuy nhiên, việc truyền trong tĩnh mạch liên tục này được cho là bất tiện cho bệnh nhân, do đó, trong trường hợp cách tiếp cận điều trị khác thuận tiện hơn, cản trở việc chọn hợp chất được chứng minh là hữu hiệu hơn trong việc điều trị bệnh tương ứng. Do đó, có nhu cầu trong lĩnh vực này về các liệu pháp điều trị đặc hiệu kép mà vẫn có hiệu quả điều trị tương tự, mà có dạng đơn giản để tạo ra, và có các đặc tính dược động học thuận lợi, bao gồm thời gian bán thải lâu hơn.

Thời gian bán thải tăng thường là hữu ích trong các ứng dụng *in vivo* của globulin miễn dịch, đặc biệt là các kháng thể và đặc biệt nhất là các đoạn kháng thể có kích thước nhỏ. Cách tiếp cận được mô tả trong lĩnh vực này để đạt được tác dụng như vậy bao gồm sự dung hợp cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép nhỏ với protein lớn hơn, tốt hơn là không cản trở tác dụng điều trị của BiTE®. Các ví dụ về sự phát triển khác của thể liên hợp tế bào T đặc hiệu kép bao gồm các phân tử Fc đặc hiệu kép, ví dụ, được mô tả trong US 2014/0302037, US 2014/0308285, WO 2014/144722, WO 2014/151910 và WO 2015/048272. Chiến lược khác là sử dụng HSA được dung hợp với phân tử đặc hiệu kép hoặc chỉ là sự dung hợp của các peptit liên kết albumin người (ví dụ, xem WO2013/128027, WO2014/140358).

BCMA (kháng nguyên thuần thục tế bào B, TNFRSF17, CD269) là một protein xuyên màng thuộc siêu họ thụ thể TNF. Nó được chứng minh là gen đánh dấu tế bào B cần thiết đối với sự phát triển và nội cân bằng của tế bào B (Schliemann et al., (2001) Science 293 (5537):2111-2114) do sự tương tác chủ yếu của nó với các phối tử BAFF (yếu tố hoạt hóa tế bào B, còn được gọi là TALL-1 hoặc TNFSF13B) và APRIL (phối tử gây tăng sinh) của nó.

Sự biểu hiện BCMA bị hạn chế đối với dòng tế bào B và chủ yếu có mặt ở các bạch cầu và nguyên bào bạch cầu và ở mức độ nào đó ở các tế bào B ghi nhớ, nhưng gần như

không có mặt ở các tế bào B tự nhiên và ngoại vi. BCMA cũng được biểu hiện ở các tế bào đa u tủy xương (multiple myeloma: MM) và có liên quan đến bệnh bạch cầu và u lympho. Cùng với các thành viên trong họ của nó TACI (yếu tố hoạt hóa xuyên màng và yếu tố tương tác phối tử xyclophylin) và BAFF-R (thụ thể yếu tố hoạt hóa tế bào B, còn được gọi là thành viên siêu họ thụ thể yếu tố hoại tử khối u 13C), BCMA điều hòa các khía cạnh khác nhau của tính miễn dịch thể dịch, sự phát triển và nội cân bằng của tế bào B. Sự biểu hiện của BCMA dường như khá muộn trong quá trình biệt hóa tế bào B và góp phần vào sự tồn tại lâu dài của nguyên bào bạch cầu và bạch cầu ở tủy xương. Việc loại bỏ nhắm đích gen BCMA ở chuột dẫn đến làm giảm đáng kể số lượng bạch cầu sống lâu ở tủy xương, chỉ ra sự quan trọng của BCMA đối với sự tồn tại của chúng.

Theo dòng phát hiện này, BCMA còn hỗ trợ sự phát triển và tồn tại của các tế bào đa u tủy xương (MM). Novak et al. đã phát hiện rằng các dòng tế bào MM và các tế bào MM mới được phân lập biểu hiện protein TACI và BCMA ở bề mặt tế bào của chúng và có sự biểu hiện biến đổi protein BAFF-R ở bề mặt tế bào của chúng (Novak et al., (2004) Blood 103(2):689-694).

Bệnh đa u tủy xương (MM) là bệnh ác tính về huyết học phổ biến thứ hai và chiếm 2% số lượng ca tử vong vì bệnh ung thư. MM là bệnh dị nguyên và gần như do sự chuyển đoạn nhiễm sắc thể gây ra, không kể những cái khác, t(11; 14), t(4; 14), t(8;14), del(13), và del(17). Các bệnh nhân mắc MM có thể trải qua nhiều triệu chứng khác nhau liên quan đến bệnh do sự thâm nhiễm tủy xương, sự phá hủy xương, sự suy thận, thiếu hụt miễn dịch, và gánh nặng tâm lý xã hội từ chẩn đoán bệnh ung thư.

U tủy là bệnh nan y thường đi theo chiều hướng tái phát, với nhiều bệnh nhân (pts) cần nhiều phương pháp điều trị. Hiệu quả ở bệnh đa u tủy xương tái phát/khó chữa (relapsed/refractory multiple myeloma: RRMM) vẫn kém, đặc biệt là sau thất bại của việc điều trị dựa trên chất ức chế proteasome (proteasome inhibitor: PI) và/hoặc thuốc điều biến miễn dịch (immunomodulatory drug: IMiD).

MM vẫn là một bệnh khó điều trị và vẫn là bệnh nan y. Nó thường đi theo chiều hướng tái phát, với nhiều bệnh nhân cần nhiều phương pháp điều trị. Các phương pháp điều trị như phương pháp hóa trị liệu và ghép tế bào gốc đang trở nên có sẵn và có tỷ lệ sống sót cải thiện, nhưng thường mang lại các tác dụng phụ không mong muốn. Cho đến nay, hai lựa chọn điều trị thường được sử dụng nhất cho bệnh nhân mắc bệnh đa u tủy xương là

kết hợp steroit, thalidomide, lenalidomide, bortezomib hoặc các chất gây độc tế bào khác nhau, và đối với bệnh nhân trẻ hơn là phương pháp hóa trị liệu liều cao cùng với ghép tế bào gốc tự thể.

Hầu hết việc ghép là kiểu tự thể, tức là, sử dụng các tế bào của chính bệnh nhân. Việc ghép như vậy, mặc dù không chữa được bệnh, song đã được chứng minh là kéo dài tuổi thọ ở các bệnh nhân được chọn. Chúng có thể được thực hiện ở dạng liệu pháp ban đầu ở các bệnh nhân mới được chẩn đoán hoặc ở thời gian tái phát. Đôi khi, ở các bệnh nhân được chọn, nhiều hơn một lần ghép có thể được khuyến cáo để kiểm soát bệnh một cách thích hợp. Việc ghép tế bào gốc không thể là một lựa chọn đối với nhiều bệnh nhân vì tuổi cao, sự có mặt của một bệnh nặng khác, hoặc các hạn chế khác của cơ thể. Hóa trị liệu chỉ kiểm soát một phần bệnh đa u tủy xương, nó hiếm khi dẫn đến sự thuyên giảm hoàn toàn. Hiệu quả ở bệnh MM tái phát khó chữa vẫn kém, đặc biệt là sau thất bại của việc điều trị dựa trên chất ức chế proteasome (PI) và/hoặc thuốc điều biến miễn dịch. Do đó, có nhu cầu cấp thiết về liệu pháp điều trị mới, sáng tạo.

Bellucci et al. (Blood. 2005 May 15;105(10)) đã nhận dạng các kháng thể đặc hiệu BCMA ở các bệnh nhân mắc đa u tủy xương sau khi họ đã nhận sự truyền tế bào lympho cho. Huyết thanh của các bệnh nhân này có khả năng gián tiếp gây ra sự phân giải tế bào đặc hiệu BCMA bởi ADCC và CDC và chỉ được phát hiện ở các bệnh nhân có đáp ứng kháng u (4/9), nhưng không có ở các bệnh nhân không đáp ứng (0/6). Các tác giả nghiên cứu rằng việc tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép BCMA góp phần vào việc loại bỏ các tế bào u tủy và sự thuyên giảm lâu dài cho bệnh nhân. Ryan et al. (Mol Cancer Ther. 2007 Nov; 6(11):3009-18) đã báo cáo việc tạo ra kháng thể đặc hiệu BCMA đối kháng mà ngăn sự hoạt hóa NF-κB kết hợp với quá trình truyền tín hiệu tiền sống sót hữu hiệu ở các tế bào B bình thường và ác tính.

Mặc dù thực tế là BCMA; BAFF-R và TACI, tức là, các thụ thể tế bào B thuộc siêu họ thụ thể TNF, và các phối tử BAFF và APRIL của chúng là đối tượng cho các liệu pháp điều trị chống lại bệnh ung thư và/hoặc các rối loạn tự miễn, vẫn có nhu cầu về các lựa chọn sẵn có khác để điều trị các tình trạng y tế này. Một cách tiếp cận như vậy là thể liên hợp tế bào T thu được từ kháng thể đặc hiệu kép.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tất cả các dạng kéo dài thời gian bán thải (các dạng HLE) của các phân tử liên hợp tế bào T đặc hiệu kép được mô tả trong lĩnh vực này, mà bao gồm dạng hetero Fc (còn được gọi là Fc heterodime, hetFc hoặc hFc) và thể dung hợp của albumin huyết thanh người (còn được gọi là HSA hoặc hALB), có nhược điểm riêng như hoạt hóa tế bào T không đặc hiệu, hoạt hóa bổ sung, tính không ổn định, hoặc profin dược động học không đáp ứng sự kéo dài thời gian bán thải của các phân tử như mong muốn. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất dạng kéo dài thời gian bán thải của các phân tử liên hợp tế bào T đặc hiệu kép BCMAxCD3, mà khắc phục ít nhất một và, tất nhiên là, tốt hơn là nhiều hơn một trong các thiếu sót riêng lẻ được quan sát đối với các phân tử trong tình trạng kỹ thuật của sáng chế. Do đó, sáng chế đề xuất các cấu trúc kháng thể của dạng Fc đặc hiệu được đặc trưng bởi việc bao gồm vùng thứ nhất liên kết với BCMA, vùng thứ hai liên kết với epitop ngoại bào của chuỗi CD3ε của người và/hoặc chuỗi CD3ε của khỉ *Macaca*, và vùng thứ ba, là dạng Fc đặc hiệu. Ngoài ra, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa cấu trúc kháng thể, vectơ chứa polynucleotit này, tế bào chủ biểu hiện cấu trúc này và dược phẩm chứa chúng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Fig. 1a thể hiện sơ đồ một phương án của cấu trúc kháng thể theo sáng chế. Fig. 1b thể hiện cấu trúc kháng thể Fc heterodime và Fig. 1c thể hiện cấu trúc thể X được mô tả trong lĩnh vực này. Các cặp điện tích được chỉ ra được đưa vào để tăng cường quá trình heterodime hóa. Fig. 1d thể hiện thể dung hợp của cấu trúc kháng thể với albumin huyết thanh người (HSA / hALB).

Fig. 2: Đánh giá sự hoạt hóa tế bào T độc lập với đích bởi các cấu trúc kháng thể đích A HLE BiTE®. 2(a) Cấu trúc kháng thể theo sáng chế trong thử nghiệm hoạt hóa 48 giờ với PBMC người (3x); pha loãng theo dãy HLE BiTE® (bắt đầu 20 nM; 1:5, 7x+trống); không có hoặc có sự chặn FcR [10 mg/mL huIgG (Kiovog, Baxter)]; xác định FACS của sự biểu hiện CD69 và CD25 [không được thể hiện] ở tế bào T $CD4^+$, $CD8^+$. 2(b) Cấu trúc kháng thể hetero-Fc trong thử nghiệm hoạt hóa 48 giờ với PBMC người và PBMC được làm nghèo tế bào $CD14^+/CD33^+$ (3x); pha loãng theo dãy HLE BiTE® (bắt đầu 20 nM; 1:5, 7x+trống); xác định FACS của sự biểu hiện CD69 và CD25 [không được thể hiện] ở tế bào T $CD4^+$, $CD8^+$.

Fig. 3: Đánh giá sự hoạt hóa tế bào T độc lập với đích bởi các cấu trúc kháng thể HLE BiTE®. 3(a) Cấu trúc kháng thể đích B theo sáng chế trong thử nghiệm hoạt hóa 48 giờ với PBMC người (3x); pha loãng theo dãy HLE BiTE® (bắt đầu 20 nM; 1:5, 7x+trống); không có hoặc có sự chặn FcR [10 mg/mL huIgG (Kiovog, Baxter)]; xác định FACS của sự biểu hiện CD69 và CD25 [không được thể hiện] ở tế bào T $CD4^+$, $CD8^+$. 3(b) Cấu trúc kháng thể đích B hetero-Fc trong thử nghiệm hoạt hóa 48 giờ với PBMC người và PBMC được làm nghèo tế bào $CD14^+/CD33^+$ (3x); pha loãng theo dãy HLE BiTE® (bắt đầu 20 nM; 1:5, 7x+trống); xác định FACS của sự biểu hiện CD69 và CD25 [không được thể hiện] ở tế bào T $CD4^+$, $CD8^+$. 3(c) Cấu trúc đích B thể X trong thử nghiệm hoạt hóa 48 giờ với PBMC người và PBMC được làm nghèo tế bào $CD14^+/CD33^+$ (3x); pha loãng theo dãy HLE BiTE® (bắt đầu 20 nM; 1:5, 7x+trống); xác định FACS của sự biểu hiện CD69 và CD25 [không được thể hiện] ở tế bào T $CD4^+$, $CD8^+$. 3(d) – 3(f) PBMC được phân lập từ ba thể cho của người khỏe mạnh khác nhau được nuôi cấy với nồng độ tăng dần của các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép HLE đặc hiệu đối với đích B trong 48 giờ. Sự biểu hiện gen đánh dấu hoạt hóa CD69 ở tế bào T CD4+ và CD8+ được xác định bằng phép phân tích tế bào theo dòng chảy bằng cách sử dụng mAb được tiếp hợp với PE-Cy7 đặc hiệu đối với CD69.

Fig. 4: Sự liên kết C1q bổ sung của các cấu trúc kháng thể dung hợp BiTE® Fc. Các cấu trúc kháng thể dung hợp BiTE® Fc (BiTE® Fc chuỗi đơn (hình tam giác), BiTE® hetero Fc (hình vuông), BiTE® chính tắc (hình tròn)) được phủ trên đĩa Maxisorp (theo dãy pha loãng), trước khi ủ với huyết thanh người được thu gom và ủ với kháng thể chuột đa dòng kháng CC1q người, được tạo ra bởi thể tiếp hợp kháng Fc-AP chuột của dê.

Fig. 5: Profin PK trung bình của hai cấu trúc kháng thể BiTE® nhắm đích BCMA khác nhau sau khi sử dụng liều đơn ở khỉ cynomolgus. Để so sánh, nồng độ huyết thanh được tiêu chuẩn hóa liều đến 15 µg/kg và được tính theo nmol.

Fig. 6: Profin PK trung bình của chín cấu trúc kháng thể BiTE® khác nhau, mỗi loại được dung hợp với nhóm kéo dài thời gian bán thải scFc. Để so sánh, nồng độ huyết thanh được tiêu chuẩn hóa liều đến 15 µg/kg và được tính theo nmol.

Fig. 7: Các biến thể scFc đặc hiệu kép D9F (SEQ ID NO: 105), T2G (SEQ ID NO: 106), D3L (SEQ ID NO: 107), T7I (SEQ ID NO: 108) và K6C (SEQ ID NO: 109). Vùng liên

kết thứ ba được ưu tiên của cấu trúc kháng thể theo sáng chế là vùng liên kết thứ ba được bao gồm bởi SEQ ID NO: 105.

Fig. 8: Xác định sự liên kết với FcRn người dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance: SPR). Các cấu trúc D9F, T2G, D3L, T7I và K6C mỗi loại được thử nghiệm về khả năng liên kết của chúng đối với FcRn người trong thử nghiệm SPR (Biacore). Sự liên kết tối đa trong giai đoạn tiêm được xác định đối với tất cả các cấu trúc ở dạng đơn vị đáp ứng tương ứng (response units: RU), tương đương với sự tăng khối lượng phân tử trên chip CM5 được phủ FcRn do cấu trúc được liên kết. Tất cả các cấu trúc được xác định gồm hai bản. Các giá trị trung bình của việc xác định hai bản được mô tả trên Fig. 8A và 8B.

Fig. 9: Các cấu trúc D9F, T2G, D3L, T7I và K6C và kháng thể IgG1-kappa người MT201 được thử nghiệm về khả năng liên kết của chúng đối với FcRn người trong thử nghiệm SPR (Biacore). Sự liên kết tối đa trong giai đoạn tiêm được xác định đối với tất cả các cấu trúc ở dạng đơn vị đáp ứng tương ứng (RU), tương đương với sự tăng khối lượng phân tử trên chip CM5 được phủ FcRn do cấu trúc được liên kết. Tất cả các cấu trúc được xác định gồm hai bản. Các giá trị trung bình của việc xác định hai bản được mô tả bao gồm các thanh sai số độ lệch chuẩn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Ngoài thời gian bán thải của các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế được kéo dài đáng kể, thể dung hợp của dạng Fc đặc hiệu cũng chịu trách nhiệm cho sự ảnh hưởng đáng kể đầy bất ngờ đối với vùng liên kết thứ nhất và thứ hai của cấu trúc kháng thể theo sáng chế. Do đó, trong khi các dạng kéo dài thời gian bán thải khác của các cấu trúc kháng thể liên hợp tế bào T thể hiện các dấu hiệu được ưu tiên riêng lẻ, việc chọn dạng Fc đặc hiệu này cho phép tạo ra các phân tử đặc hiệu kép thường thể hiện phổ rộng của các đặc tính được ưu tiên của dạng phân tử khỏe mạnh và, do đó, cho phép phát triển các dược phẩm đầy hứa hẹn.

Do đó, sáng chế đề xuất cấu trúc kháng thể bao gồm :

- vùng thứ nhất liên kết với BCMA,
- vùng thứ hai liên kết với epitop ngoại bào của chuỗi CD3ε của người và/hoặc chuỗi CD3ε của khỉ *Macaca*; và

- vùng thứ ba gồm hai monome polypeptit, mỗi monome chứa vùng bản lề, vùng CH2 và vùng CH3, trong đó hai monome polypeptit nói trên được dung hợp với nhau nhờ trình tự liên kết peptit.

Thuật ngữ "cấu trúc kháng thể" được dùng để chỉ phân tử trong đó cấu trúc và/hoặc chức năng được dựa trên cấu trúc và/hoặc chức năng của một kháng thể, *ví dụ*, có chiều dài đầy đủ hoặc toàn bộ phân tử globulin miễn dịch và/hoặc thu được từ các vùng chuỗi nặng biến đổi (VH) và/hoặc chuỗi nhẹ biến đổi (VL) của kháng thể hoặc đoạn của chúng. Do đó, cấu trúc kháng thể có khả năng liên kết với đích hoặc kháng nguyên đặc hiệu của nó. Hơn nữa, vùng liên kết của cấu trúc kháng thể theo sáng chế có các yêu cầu cấu trúc tối thiểu của một kháng thể mà cho phép liên kết với đích. Yêu cầu tối thiểu này có thể được hiểu là sự có mặt của ít nhất ba CDR chuỗi nhẹ (tức là CDR1, CDR2 và CDR3 của vùng VL) và/hoặc ba CDR chuỗi nặng (tức là CDR1, CDR2 và CDR3 của vùng VH) chẳng hạn, tốt hơn là có tất cả sáu CDR. Cách tiếp cận khác để xác định các yêu cầu cấu trúc tối thiểu của một kháng thể là xác định epitop của kháng thể đó trong cấu trúc của đích đặc hiệu tương ứng, vùng protein của protein đích tạo nên vùng epitop (cụm epitop) hoặc bằng cách viện dẫn đến kháng thể đặc hiệu cạnh tranh với epitop của kháng thể được xác định. Các kháng thể mà các cấu trúc kháng thể theo sáng chế dựa vào bao gồm các kháng thể đơn dòng, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể khảm, kháng thể được khử miễn dịch, kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể người.

Vùng liên kết của cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể gồm, ví dụ, các nhóm CDR nêu trên. Tốt hơn, nếu các CDR này có trong khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH); tuy nhiên, vùng liên kết này không buộc phải có cả hai vùng biến đổi này. Các đoạn Fd, ví dụ, có hai vùng VH và thường giữ nguyên chức năng liên kết với kháng nguyên nào đó của vùng liên kết với kháng nguyên nguyên vẹn. Các ví dụ khác về dạng của đoạn kháng thể, biến thể kháng thể hoặc vùng liên kết bao gồm (1) đoạn Fab, đoạn hóa trị một có các vùng VL, VH, CL và CH1; (2) đoạn $F(ab')_2$, đoạn hóa trị hai có hai đoạn Fab được liên kết với nhau bằng cầu disulfua ở vùng bản lề; (3) đoạn Fd có hai vùng VH và CH1; (4) đoạn Fv có các vùng VL và VH của một nhánh của kháng thể, (5) đoạn dAb (Ward et al., (1989) Nature 341 :544-546), mà có vùng VH; (6) vùng quyết định bổ trợ (complementarity determining region: CDR) phân lập, và (7) Fv chuỗi đơn (single chain Fv: scFv), dạng sau cùng được ưu tiên hơn (ví dụ, thu được từ thư viện scFv). Ví dụ về các phương án của cấu trúc

kháng thể theo sáng chế được mô tả trong các công bố đơn quốc tế số WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2014/0308285, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2014/0302037, công bố đơn quốc tế số WO2014/144722, WO 2014/151910, và WO 2015/048272 chẳng hạn.

Trong định nghĩa về "vùng liên kết" hoặc "vùng mà liên kết" là các đoạn chứa các kháng thể có chiều dài đầy đủ, như VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', $F(ab')_2$ hoặc "r IgG" ("một nửa kháng thể"). Các cấu trúc kháng thể theo sáng chế cũng có thể gồm các đoạn cải biến của các kháng thể, còn được gọi là dạng biến đổi của kháng thể, như scFv, di-scFv hoặc bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-zipper, scFab, Fab_2, Fab_3, dime của một đoạn globulin miễn dịch, dime của một đoạn globulin miễn dịch chuỗi đơn, dime của một đoạn globulin miễn dịch nối tiếp (Tandab's), di-scFv nối tiếp, tri-scFv nối tiếp, "đa kháng thể" như trime của một đoạn globulin miễn dịch hoặc tetrame của một đoạn globulin miễn dịch, và các kháng thể đơn vùng như các kháng thể nano hoặc các kháng thể đơn vùng biến đổi chỉ chứa một vùng biến đổi, mà có thể là VHH, VH hoặc VL, mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên hoặc epitop độc lập với các vùng hoặc miền V khác.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "Fv chuỗi đơn," "kháng thể chuỗi đơn" hoặc "scFv" dùng để chỉ các đoạn kháng thể chuỗi polypeptit đơn gồm các vùng biến đổi từ cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, nhưng thiếu các vùng cố định. Thông thường, kháng thể chuỗi đơn còn gồm liên kết polypeptit giữa các vùng VH và VL mà có thể tạo thành cấu trúc mong muốn cho phép sự liên kết kháng nguyên. Các kháng thể chuỗi đơn được thảo luận chi tiết bởi Pluckthun trong The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg và Moore biên tập Springer-Verlag, New York, các trang 269-315 (1994). Các phương pháp khác nhau để tạo thành các kháng thể chuỗi đơn là đã biết, bao gồm các phương pháp được mô tả trong patent Mỹ số 4,694,778 và 5,260,203; công bố đơn patent quốc tế số WO 88/01649; Bird (1988) Science 242:423-442; Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Ward *et al.* (1989) Nature 334:54454; Skerra *et al.* (1988) Science 242:1038-1041. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể chuỗi đơn cũng có thể là đặc hiệu kép, đa đặc hiệu, của người, và/hoặc được làm tương thích với người và/hoặc tổng hợp.

Hơn nữa, định nghĩa của thuật ngữ "cấu trúc kháng thể" bao gồm các cấu trúc hóa trị một, hóa trị hai và đa hóa trị/nhiều hóa trị và, do đó các cấu trúc đặc hiệu kép chỉ liên kết

đặc hiệu với hai cấu trúc kháng nguyên, cũng như là các cấu trúc đa hóa trị/nhiều hóa trị, liên kết đặc hiệu với nhiều hơn hai cấu trúc kháng nguyên, ví dụ ba, bốn hoặc nhiều hơn, nhờ các vùng liên kết riêng. Hơn nữa, định nghĩa của thuật ngữ "cấu trúc kháng thể" bao gồm các phân tử chỉ có một chuỗi polypeptit cũng như là các phân tử có nhiều hơn một chuỗi polypeptit, các chuỗi này có thể giống nhau (homodime, homotrime hoặc homo oligome) hoặc khác nhau (heterodime, heterotrime hoặc heterooligome). Ví dụ về các kháng thể nêu trên và các biến thể hoặc dẫn xuất của chúng được mô tả trong tài liệu không kể các tài liệu khác Harlow và Lane, Antibodies a laboratory manual, CSHL Press (1988) and Using Antibodies: a laboratory manual, CSHL Press (1999), Kontermann và Dübel, Antibody Engineering, Springer, 2nd ed. 2010 và Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009.

Thuật ngữ "đặc hiệu kép" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ cấu trúc kháng thể là "ít nhất là đặc hiệu kép", tức là, nó gồm ít nhất vùng liên kết thứ nhất và vùng liên kết thứ hai, trong đó vùng liên kết thứ nhất liên kết với một kháng nguyên hoặc đích (ở đây là: BCMA), và vùng liên kết thứ hai liên kết với kháng nguyên hoặc đích khác (ở đây là: CD3). Do đó, các cấu trúc kháng thể theo sáng chế có tính đặc hiệu đối với ít nhất hai kháng nguyên hoặc đích khác nhau. Ví dụ, tốt hơn nếu vùng thứ nhất không liên kết với epitop ngoại bào của CD3ε của một hoặc nhiều loài như được mô tả ở đây. Thuật ngữ "kháng nguyên bề mặt tế bào đích" dùng để chỉ cấu trúc kháng nguyên được biểu hiện bởi tế bào và có mặt ở bề mặt tế bào sao cho nó có thể đến được cấu trúc kháng thể như được mô tả ở đây. Nó có thể là một protein, tốt hơn là phần ngoại bào của protein, hoặc cấu trúc hydrat cacbon, tốt hơn là cấu trúc hydrat cacbon của protein, như glycoprotein. Tốt hơn, nếu nó là kháng nguyên khối u. Thuật ngữ "cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép" theo sáng chế còn bao gồm các cấu trúc kháng thể đa đặc hiệu như các cấu trúc kháng thể đặc hiệu ba, cấu trúc kháng thể đặc hiệu ba bao gồm ba vùng liên kết, hoặc các cấu trúc có nhiều hơn ba (ví dụ, bốn, năm…) tính đặc hiệu.

Các cấu trúc kháng thể theo sáng chế là (ít nhất là) đặc hiệu kép, chúng không tồn tại tự nhiên và chúng khác biệt rõ ràng với các sản phẩm tồn tại tự nhiên. Do đó, globulin miễn dịch hoặc cấu trúc kháng thể "đặc hiệu kép" là globulin miễn dịch hoặc kháng thể lai nhân tạo có ít nhất hai vị trí liên kết riêng biệt với tính đặc hiệu khác nhau. Các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp khác nhau bao gồm

sự dung hợp các tế bào lai hoặc liên kết các đoạn của Fab'. Ví dụ, xem, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990).

Ít nhất hai vùng liên kết và vùng biến đổi (VH / VL) trong cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể hoặc không thể chứa trình tự liên kết peptit (các peptit đệm). Thuật ngữ "trình tự liên kết peptit" theo sáng chế gồm trình tự axit amin mà các trình tự axit min trong vùng (biến đổi và/hoặc liên kết) này và vùng (biến đổi và/hoặc liên kết) khác của cấu trúc kháng thể theo sáng chế được liên kết với nhau qua đó. Trình tự liên kết peptit còn có thể được sử dụng để dung hợp vùng thứ ba với các vùng khác của cấu trúc kháng thể theo sáng chế. Dấu hiệu kỹ thuật cơ bản của trình tự liên kết peptit này là nó không có hoạt tính polyme hóa bất kỳ. Trình tự liên kết peptit thích hợp là các trình tự liên kết được mô tả trong patent Mỹ số 4,751,180 và 4,935,233 hoặc WO 88/09344. Trình tự liên kết peptit còn có thể được sử dụng để liên kết các vùng hoặc môđun hoặc miền khác (như vùng kéo dài thời gian bán thải) với cấu trúc kháng thể theo sáng chế.

Tốt hơn là, cấu trúc kháng thể theo sáng chế là "cấu trúc kháng thể được tạo *in vitro*". Thuật ngữ này được dùng để chỉ cấu trúc kháng thể theo định nghĩa trên trong đó tất cả hoặc một phần vùng biến đổi (ví dụ, ít nhất một CDR) được tạo ra trong quá trình chọn lọc tế bào không miễn dịch, *ví dụ*, phương pháp biểu hiện trên thể thực khuẩn *in vitro*, phương pháp sử dụng chip protein hoặc phương pháp khác bất kỳ trong đó các trình tự dự tuyển có thể được thử nghiệm về khả năng liên kết với kháng nguyên của chúng. Tốt hơn là, thuật ngữ này loại trừ các trình tự chỉ được tạo ra bằng cách sắp xếp lại bộ gen trong tế bào miễn dịch ở động vật. "Kháng thể tái tổ hợp" là kháng thể được tạo ra bằng cách sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc kỹ thuật di truyền.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" (monoclonal antibody-mAb) hoặc cấu trúc kháng thể đơn dòng như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ kháng thể thu được từ một quần thể kháng thể gần như đồng nhất, *tức là*, từng kháng thể trong quần thể là giống nhau ngoại trừ các đột biến có thể có nguồn gốc trong tự nhiên và/hoặc các cải biến sau dịch mã (ví dụ, đồng phân hóa, amit hóa) mà có thể có mặt với lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, được định hướng kháng phía kháng nguyên đơn hoặc quyết định trên kháng nguyên, ngược với các chế phẩm kháng thể thông thường (đa dòng) mà thường chứa nhiều kháng thể khác nhau kháng các quyết định (hoặc epitop) khác nhau. Ngoài tính đặc hiệu của chúng, kháng thể đơn dòng có ưu điểm ở chỗ chúng được tổng hợp bằng cách nuôi cấy tế bào lai, do đó không bị tạp nhiễm bởi các globulin miễn dịch khác.

Từ bổ nghĩa "đơn dòng" cho biết đặc điểm của kháng thể này là được thu từ quần thể kháng thể gần như đồng nhất, và không được hiểu là đòi hỏi tổng hợp kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ.

Để tạo ra kháng thể đơn dòng, kỹ thuật bất kỳ tạo ra kháng thể được tổng hợp bằng cách nuôi cấy dòng tế bào liên tục có thể được sử dụng. Ví dụ, kháng thể đơn dòng được sử dụng có thể được tổng hợp bằng phương pháp sử dụng tế bào lai được mô tả lần đầu trong tài liệu Koehler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), hoặc có thể được tổng hợp bằng các phương pháp ADN tái tổ hợp (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 4,816,567). Ví dụ về các kỹ thuật khác để tổng hợp kháng thể đơn dòng của người bao gồm kỹ thuật dung hợp tế bào lai, kỹ thuật sử dụng tế bào lai là tế bào B của người (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) và kỹ thuật EBV-tế bào lai (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

Sau đó, các tế bào lai có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn, như thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn enzym (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA) và phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (BIACORE™), để xác định một hoặc nhiều tế bào lai tổng hợp kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể. Dạng bất kỳ của kháng nguyên thích hợp có thể được sử dụng làm tác nhân gây miễn dịch, *ví dụ*, kháng nguyên tái tổ hợp, các dạng có nguồn gốc trong tự nhiên, biến thể bất kỳ hoặc đoạn của chúng, cũng như là peptit kháng nguyên của chúng. Cộng hưởng plasmon bề mặt như được sử dụng trong hệ thống BIAcore có thể được sử dụng để làm tăng hiệu quả của các kháng thể thể thực khuẩn mà liên kết với epitop của kháng nguyên bề mặt tế bào đích (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13).

Phương pháp tổng hợp kháng thể đơn dòng được lấy làm ví dụ khác bao gồm sàng lọc thư viện biểu hiện protein, ví dụ, thư viện biểu hiện trên thể thực khuẩn hoặc thư viện biểu hiện ribosom. Phương pháp biểu hiện trên thể thực khuẩn được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Ladner *et al.*, Patent Mỹ số 5,223,409; Smith (1985) Science 228:1315-1317, Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) và Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991).

Ngoài việc sử dụng thư viện biểu hiện, kháng nguyên thích hợp có thể được sử dụng để gây miễn dịch động vật không phải người, *ví dụ*, loài gặm nhấm (như chuột nhắt, chuột

cảnh, thỏ hoặc chuột cống). Theo một phương án, động vật không phải người bao gồm ít nhất một phần của gen globulin miễn dịch của người. Ví dụ, có thể thao tác di truyền các giống chuột nhắt bị thiếu hụt quá trình tổng hợp kháng thể chuột nhắt với các đoạn lớn của các locut Ig (globulin miễn dịch) của người. Bằng cách sử dụng công nghệ tế bào lai, kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên thu được từ các gen có tính đặc hiệu mong muốn có thể được tổng hợp và được chọn lọc. Ví dụ, xem tài liệu XENOMOUSE™, Green *et al.* (1994) Nature Genetics 7:13-21, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2003-0070185, công bố đơn quốc tế số WO 96/34096, và WO 96/33735.

Kháng thể đơn dòng cũng có thể thu được từ động vật không phải người, và sau đó được cải biến, *ví dụ*, được làm tương thích với người, được khử miễn dịch, được tạo khảm v.v., sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về các cấu trúc kháng thể được cải biến bao gồm các biến thể được làm tương thích với người của kháng thể không phải của người, các kháng thể "thuần thục ái lực" (xem tài liệu, *ví dụ* Hawkins et al. J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) và Lowman *et al.*, Biochemistry 30, 10832-10837 (1991)) và các thể đột biến kháng thể có (các) chức năng hiệu ứng thay đổi (xem tài liệu, *ví dụ*, patent Mỹ số 5,648,260, Kontermann và Dübel (2010), *loc. cit.* và Little (2009), *loc. cit.*).

Trong miễn dịch học, thuần thục ái lực là quá trình mà qua đó tế bào B tổng hợp kháng thể có ái lực tăng thêm đối với kháng nguyên trong suốt quá trình đáp ứng miễn dịch. Bằng cách cho tiếp xúc lặp lại với cùng một kháng nguyên, vật chủ sẽ tổng hợp kháng thể có ái lực cao liên tục. Giống như kiểu nguyên thủy trong tự nhiên, thuần thục ái lực *in vitro* được dựa trên các nguyên tắc đột biến và chọn lọc. Thuần thục ái lực *in vitro* đã được sử dụng thành công để làm tối ưu hóa kháng thể, cấu trúc kháng thể, và đoạn kháng thể. Các đột biến ngẫu nhiên bên trong các CDR được tạo ra bằng cách chiếu xạ, sử dụng các tác nhân đột biến hóa học hoặc PCR tạo lỗi ngẫu nhiên. Ngoài ra, tính đa dạng di truyền có thể được gia tăng do sự xáo trộn mạch. Hai hoặc ba vòng đột biến và chọn lọc sử dụng phương pháp biểu hiện như biểu hiện trên thể thực khuẩn thường thu được các đoạn kháng thể có ái lực trong khoảng nanomol thấp.

Một loại biến đổi thay thế axit amin được ưu tiên của cấu trúc kháng thể bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc trong vùng siêu biến của kháng thể bố mẹ (ví dụ, kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể của người). Thông thường, (các) biến thể tạo ra được chọn để phát triển tiếp sẽ có các đặc tính sinh học tốt hơn so với kháng thể bố mẹ

mà tạo ra các biến thể này. Một cách thích hợp để tạo ra các biến thể thay thế như vậy bao gồm làm thuần thục ái lực sử dụng phương pháp biểu hiện trên thể thực khuẩn. Nói tóm lại, một vài vị trí trong vùng siêu biến (ví dụ, 6-7 vị trí) được gây đột biến để tạo ra tất cả các thay thế axit amin có thể có ở mỗi vị trí. Do đó, biến thể kháng thể tạo ra được biểu hiện ở dạng hóa trị một từ các hạt thể thực khuẩn dạng sợi dưới dạng các thể dung hợp với sản phẩm gen III của M13 được bao gói trong mỗi hạt. Các biến thể được biểu hiện trên thể thực khuẩn sau đó được sàng lọc hoạt tính sinh học (ví dụ, ái lực liên kết) như được mô tả ở đây. Để xác định các vị trí trong vùng siêu biến dự tuyển để cải biến, gây đột biến sàng lọc alanin có thể được tiến hành để xác định các gốc trong vùng siêu biến góp phần đáng kể cho việc liên kết với kháng nguyên. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, việc phân tích cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng thể-kháng nguyên để xác định các điểm tiếp xúc giữa vùng liên kết và, *ví dụ*, BCMA của người là có lợi. Các gốc tiếp xúc như vậy và các gốc bên cạnh là các gốc dự tuyển để thay thế theo các kỹ thuật được mô tả ở đây. Một khi các biến thể như vậy được tạo ra, nhóm biến thể được sàng lọc như được mô tả ở đây và các kháng thể có đặc tính tốt hơn trong một hoặc nhiều thử nghiệm thích hợp có thể được chọn để phát triển tiếp.

Kháng thể đơn dòng và cấu trúc kháng thể theo sáng chế nói riêng bao gồm các kháng thể "khảm" (globulin miễn dịch) trong đó một phần chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong kháng thể thu được từ loài cụ thể hoặc thuộc một lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi đó phần còn lại của (các) chuỗi là giống hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ loài khác hoặc thuộc một lớp hoặc phân lớp kháng thể khác, cũng như là các đoạn của các kháng thể này, miễn là chúng có hoạt tính sinh học mong muốn (Patent Mỹ số 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Các kháng thể khảm quan tâm ở đây bao gồm các kháng thể "được làm tương thích với động vật linh trưởng" chứa các trình tự liên kết với kháng nguyên của vùng biến đổi thu được từ động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ mũi dài, khỉ không đuôi v.v.) và các trình tự vùng cố định của người. Nhiều phương pháp tổng hợp kháng thể khảm đã được mô tả. Xem tài liệu, *ví dụ*, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. ScL U.S.A. 81:6851 , 1985; Takeda *et al.*, Nature 314:452, 1985, Cabilly *et al.*, Patent Mỹ số 4,816,567; Boss *et al.*, Patent Mỹ số 4,816,397; Tanaguchi *et al.*, patent châu Âu số EP 0171496; patent châu Âu số EP 0173494; và Patent Anh số GB 2177096.

Kháng thể, cấu trúc kháng thể, đoạn kháng thể hoặc biến thể kháng thể cũng có thể được cải biến bằng cách loại bỏ đặc hiệu các epitop tế bào T của người (phương pháp được gọi là "khử miễn dịch") bằng các phương pháp được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 98/52976 hoặc WO 00/34317 chẳng hạn. Nói tóm lại, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được phân tích các peptit liên kết với MHC lớp II; các peptit này là các epitop tế bào T tiềm năng (như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 98/52976 và WO 00/34317). Để phát hiện các epitop tế bào T tiềm năng, phương pháp xây dựng mô hình trên máy tính được gọi là "sắp gióng cột peptit" có thể được áp dụng, và ngoài ra cơ sở dữ liệu của các peptit liên kết với MHC lớp II của người có thể được tra cứu các motip có mặt trong các trình tự VH và VL, như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 98/52976 và WO 00/34317. Các motip này liên kết với alotyp bất kỳ trong số 18 alotyp DR MHC lớp II chính, và do đó tạo thành các epitop tế bào T tiềm năng. Các epitop tế bào T tiềm năng được phát hiện có thể được loại trừ bằng cách thay thế một số lượng nhỏ các gốc axit amin trong vùng biến đổi, hoặc tốt hơn là, thay thế axit amin đơn. Thông thường, các thay thế bảo toàn được tiến hành. Thông thường, nhưng không ngoại trừ, axit amin chung với một vị trí trong các trình tự kháng thể dòng mầm của người có thể được sử dụng. Các trình tự dòng mầm của người được mô tả, ví dụ trong tài liệu Tomlinson, *et al.*(1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G.P. *et al.*(1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; và Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14: 14:4628-4638. Thư mục V BASE cung cấp một thư mục đầy đủ về các trình tự vùng biến đổi của globulin miễn dịch của người (được biên soạn bởi Tomlinson, LA. *và các đồng tác giả,* trung tâm thao tác di truyền protein MRC, Cambridge, Anh). Các trình tự này có thể được sử dụng làm nguồn trình tự của người, *ví dụ*, cho các vùng khung và CDR. Các vùng khung liên ứng của người cũng có thể được sử dụng, ví dụ như được mô tả trong Patent Mỹ số 6,300,064.

Kháng thể "được làm tương thích với người", cấu trúc kháng thể, biến thể hoặc các đoạn của chúng (như Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ hoặc các trình tự liên kết với kháng nguyên khác của kháng thể) là các kháng thể hoặc globulin miễn dịch có các trình tự chủ yếu của người, mà chứa (a) (các) trình tự nhỏ thu được từ globulin miễn dịch không phải của người. Nói chung, kháng thể được làm tương thích với người là globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) trong đó các gốc từ vùng siêu biến (kể cả vùng CDR) của kháng thể nhận được thay thế bằng các gốc từ vùng siêu biến của loài không phải người (*ví dụ*,

loài gặm nhấm) (kháng thể cho) như chuột nhắt, chuột cống, chuột cảnh hoặc thỏ có tính đặc hiệu, ái lực, và khả năng tiếp nhận mong muốn. Trong một vài trường hợp, các gốc trong vùng khung (FR) Fv của globulin miễn dịch của người được thay thế bằng các gốc không phải của người tương ứng. Hơn nữa, "kháng thể được làm tương thích với người" như được sử dụng ở đây cũng có thể chứa các gốc mà không được tìm thấy trong kháng thể nhận cũng như kháng thể cho. Các cải biến này được tạo ra nhằm cải tiến và tối ưu hóa thêm các đặc tính của kháng thể. Kháng thể được làm tương thích với người cũng có thể chứa ít nhất một phần vùng cố định của globulin miễn dịch (Fc), thông thường là vùng của globulin miễn dịch của người. Để biết thêm chi tiết, xem tài liệu Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332: 323-329 (1988); và Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

Kháng thể được làm tương thích với người hoặc các đoạn của chúng có thể được tạo ra bằng cách thay thế các trình tự của vùng biến đổi Fv mà không có liên quan trực tiếp đến việc liên kết kháng nguyên bằng các trình tự tương đương từ các vùng biến đổi Fv của người. Các phương pháp được lấy làm ví dụ để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người hoặc các đoạn của chúng được đề cập bởi tài liệu Morrison (1985) Science 229:1202-1207; bởi tài liệu Oi *et al.* (1986) BioTechniques 4:214; và bởi patent Mỹ số US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205; và US 6,407,213. Các phương pháp này bao gồm phân lập, thao tác, và biểu hiện các trình tự axit nucleic mà mã hóa toàn bộ hoặc một phần các vùng biến đổi Fv của globulin miễn dịch từ ít nhất một trong số chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Các axit nucleic như vậy có thể được tạo ra từ tế bào lai tổng hợp kháng thể kháng đích tiền định, như được mô tả trên đây, cũng như là từ các nguồn khác. ADN tái tổ hợp mã hóa phân tử kháng thể được làm tương thích với người sau đó có thể được tách dòng trong vectơ biểu hiện thích hợp.

Kháng thể được làm tương thích với người cũng có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các động vật chuyển gen như chuột biểu hiện các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người, nhưng không có khả năng biểu hiện các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch nội sinh của chuột nhắt. Tác giả Winter mô tả một phương pháp ghép CDR được lấy làm ví dụ mà có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người được mô tả ở đây (Patent Mỹ số 5,225,539). Toàn bộ các CDR của một kháng thể người cụ thể có thể được thay thế bằng ít nhất một phần CDR không phải của người, hoặc chỉ một vài trong số các CDR có thể được thay thế bằng các CDR không phải của người. Chỉ

cần thay thế một số CDR cần cho việc liên kết của kháng thể được làm tương thích với người với kháng nguyên tiền định.

Kháng thể được làm tương thích với người có thể được làm tối ưu hóa bằng cách đưa các gốc thay thế bảo toàn, các gốc thay thế trình tự liên ứng, các gốc thay thế dòng mầm và/hoặc các gốc đột biến ngược vào. Các phân tử globulin miễn dịch được thay đổi như vậy có thể được tạo ra bằng kỹ thuật bất kỳ trong số một vài kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, (*ví dụ*, Teng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor *et al.*, Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson *et al.*, Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982, và EP 239 400).

Thuật ngữ "kháng thể người", "cấu trúc kháng thể người" và "vùng liên kết của người" bao gồm các kháng thể, cấu trúc kháng thể và vùng liên kết có các vùng kháng thể như các vùng biến đổi và cố định hoặc các vùng mà hầu như tương ứng với các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, ví dụ, các vùng, cấu trúc được mô tả trong tài liệu Kabat *et al.* (1991) (*loc. cit.*). Các kháng thể người, cấu trúc kháng thể hoặc vùng liên kết theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (*ví dụ*, các gốc đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc gây đột biến soma *in vivo*), ví dụ trong các CDR, và cụ thể là, trong CDR3. Các kháng thể người, cấu trúc kháng thể hoặc các vùng liên kết có thể có ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc nhiều hơn năm vị trí được thay thế bằng gốc axit amin mà không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Định nghĩa về kháng thể người, cấu trúc kháng thể và các vùng liên kết như được sử dụng ở đây, tuy nhiên, cũng bao gồm "các kháng thể người đầy đủ" mà chỉ bao gồm các trình tự của người được thay đổi không nhân tạo và/hoặc di truyền của các kháng thể như các kháng thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các công nghệ hoặc các hệ như chuột nhắt Xenomouse. Tốt hơn, nếu "kháng thể người đầy đủ" không bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch tế bào mầm ở người.

Theo một vài phương án, cấu trúc kháng thể theo sáng chế là các cấu trúc kháng thể "phân lập" hoặc "gần như tinh khiết". Thuật ngữ "phân lập" hoặc "gần như tinh khiết", nếu được sử dụng để mô tả các cấu trúc kháng thể được bộc lộ ở đây, có nghĩa là cấu trúc kháng thể mà được xác định, phân tách và/hoặc thu hồi từ một thành phần của môi trường tổng hợp nó. Tốt hơn là, cấu trúc kháng thể không hoặc hầu như không đi kèm với

tất cả các thành phần khác trong môi trường tổng hợp nó. Các thành phần tạp nhiễm trong môi trường tổng hợp kháng thể, như thành phần thu được từ các tế bào chuyển nhiễm tái tổ hợp, là các nguyên liệu mà thường can thiệp vào việc sử dụng polypeptit để chẩn đoán hoặc điều trị, và có thể bao gồm enzym, hormon, và các chất tan có hoặc không có protein khác. Cấu trúc kháng thể có thể chiếm ít nhất khoảng 5%, hoặc ít nhất khoảng 50% trọng lượng của tổng lượng protein trong một mẫu nhất định. Cần hiểu rằng protein phân lập có thể chiếm từ 5% đến 99,9% trọng lượng của tổng lượng protein, tùy trường hợp. Polypeptit có thể được tạo ra ở nồng độ cao hơn đáng kể bằng cách sử dụng trình tự khởi đầu dễ cảm ứng hoặc trình tự khởi đầu biểu hiện cao, nhờ vậy polypeptit có thể được tổng hợp ở mức nồng độ cao. Định nghĩa này bao gồm cả quy trình tổng hợp cấu trúc kháng thể trong nhiều vi sinh vật và/hoặc tế bào chủ mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo các phương án được ưu tiên, cấu trúc kháng thể sẽ được tinh chế (1) đến mức đủ để thu được ít nhất 15 gốc của trình tự axit amin bên trong hoặc đầu tận cùng N bằng cách sử dụng thiết bị phân tích cấu trúc bậc một của protein có cốc ly tâm nhanh, hoặc (2) đến mức đồng nhất bằng SDS-PAGE trong các điều kiện khử hoặc không khử sử dụng thuốc nhuộm xanh Coomassie hoặc, tốt hơn là, thuốc nhuộm bạc. Tuy nhiên, thông thường, cấu trúc kháng thể phân lập sẽ được tạo ra bằng ít nhất một bước tinh chế.

Thuật ngữ "vùng liên kết" theo sáng chế có đặc điểm là vùng mà liên kết (đặc hiệu) với/tương tác với/nhận diện epitop đích nhất định hoặc vị trí đích nhất định trên phân tử đích (kháng nguyên), ở đây: lần lượt là BCMA và CD3. Cấu trúc và chức năng của vùng liên kết thứ nhất (nhận diện BCMA), và tốt hơn là cả cấu trúc và/hoặc chức năng của vùng liên kết thứ hai (nhận diện CD3), được dựa trên cấu trúc và/hoặc chức năng của kháng thể, ví dụ của toàn bộ phân tử globulin miễn dịch hoặc có chiều dài đầy đủ, và/hoặc thu được từ vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể hoặc đoạn của chúng. Tốt hơn, nếu vùng liên kết thứ nhất được đặc trưng bởi sự có mặt của ba CDR chuỗi nhẹ (tức là CDR1, CDR2 và CDR3 của vùng VL) và/hoặc ba CDR chuỗi nặng (tức là CDR1, CDR2 và CDR3 của vùng VH). Tốt hơn là, vùng liên kết thứ hai cũng đáp ứng các yêu cầu cấu trúc tối thiểu của kháng thể mà cho phép liên kết với đích. Tốt hơn nữa là, vùng liên kết thứ hai chứa ít nhất ba CDR chuỗi nhẹ (tức là CDR1, CDR2 và CDR3 của vùng VL) và/hoặc ba CDR chuỗi nặng (tức là CDR1, CDR2 và CDR3 của vùng VH). Được dự tính rằng vùng liên kết thứ nhất và/hoặc thứ hai được tạo ra bằng hoặc có thể thu được bằng các phương pháp biểu hiện trên thể

thực khuẩn hoặc sàng lọc thư viện chứ không phải là bằng cách ghép các trình tự CDR từ kháng thể hiện có (đơn dòng) vào khung protein.

Theo sáng chế, các vùng liên kết là ở dạng gồm một hoặc nhiều polypeptit. Các polypeptit như vậy bao gồm các phần protein và các phần không phải protein (ví dụ các phân tử liên kết hóa học hoặc các tác nhân hóa học liên kết ngang như glutaraldehyt). Các protein (bao gồm các đoạn của chúng, tốt hơn là các đoạn có hoạt tính sinh học, và các peptit, thường có dưới 30 axit amin) gồm hai hoặc nhiều axit amin liên kết với nhau nhờ trình tự liên kết peptit cộng hóa trị (tạo ra chuỗi axit amin).

Thuật ngữ "polypeptit" như được sử dụng ở đây để chỉ một nhóm các phân tử, mà thường có nhiều hơn 30 axit amin. Polypeptit có thể còn tạo thành các multime như dime, trime và oligome cao, *tức là*, gồm có nhiều hơn một phân tử polypeptit. Các phân tử polypeptit tạo ra dime, trime v.v. như vậy có thể giống hoặc không giống nhau. Cấu trúc bậc cao hơn tương ứng của các multime này do đó, được gọi là homo- hoặc heterodime, homo- hoặc heterotrime v.v.. Một ví dụ về hereteromultime là phân tử kháng thể, ở dạng có nguồn gốc trong tự nhiên, gồm hai chuỗi nhẹ polypeptit giống nhau và hai chuỗi nặng polypeptit giống nhau. Thuật ngữ “peptit”, "polypeptit" và "protein" cũng được dùng để chỉ các peptit/polypeptit/protein được cải biến trong tự nhiên, trong đó cải biến này được tạo ra bởi cải biến sau dịch mã chẳng hạn như glycosyl hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa và cải biến tương tự. “Peptit”, "polypeptit" hoặc "protein" nếu được đề cập ở đây cũng có thể được cải biến hóa học như pegyl hóa. Các cải biến này là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả dưới đây.

Tốt hơn là vùng liên kết mà liên kết với BCMA và/hoặc vùng liên kết mà liên kết với CD3ε là các vùng liên kết của người. Kháng thể và cấu trúc kháng thể chứa ít nhất một vùng liên kết của người tránh được một vài vấn đề có liên quan đến kháng thể hoặc cấu trúc kháng thể có các vùng cố định và/hoặc biến đổi không phải của người như của loài gặm nhấm (*ví dụ* chuột nhắt, chuột cống, chuột cảnh hoặc thỏ). Sự có mặt các protein thu được từ loài gặm nhấm như vậy có thể dẫn đến sự thanh thải kháng thể hoặc cấu trúc kháng thể nhanh hoặc có thể gây ra đáp ứng miễn dịch chống lại kháng thể hoặc cấu trúc kháng thể bởi bệnh nhân. Để tránh sử dụng các kháng thể hoặc cấu trúc kháng thể có nguồn gốc từ loài gặm nhấm, kháng thể/cấu trúc kháng thể người hoặc người đầy đủ có thể được tạo ra bằng cách đưa chức năng của kháng thể người vào loài gặm nhấm để loài gặm nhấm tạo ra kháng thể người đầy đủ.

Khả năng tách dòng và tái cấu trúc locut người có kích cỡ megabazơ trong YAC và đưa chúng vào dòng mầm của chuột nhắt tạo ra một phương pháp có hiệu quả để xác định các thành phần chức năng của các locut lớn hoặc được lập bản đồ sơ bộ cũng như là tạo ra các mô hình bệnh ở người hữu dụng. Hơn nữa, việc sử dụng công nghệ thay thế locut chuột nhắt bằng các locut tương đương của người như vậy có thể hình thành các quan niệm duy nhất về sự biểu hiện và điều hòa các sản phẩm gen của người trong quá trình phát triển, sự kết nối của chúng với các hệ thống khác, và mối liên quan của chúng với sự cảm ứng và tiến triển bệnh.

Một ứng dụng thực tiễn quan trọng của chiến lược như vậy là "làm tương thích với người" hệ miễn dịch thể dịch của chuột nhắt. Việc đưa các locut globulin miễn dịch (Ig) của người vào chuột nhắt trong đó các gen Ig nội sinh được làm bất hoạt tạo ra cơ hội để nghiên cứu các cơ chế dẫn đến sự biểu hiện theo chương trình và tổ hợp các kháng thể cũng như là vai trò của chúng trong việc phát triển tế bào B. Hơn nữa, chiến lược này có thể tạo ra nguồn lý tưởng để tổng hợp kháng thể đơn dòng (mAb) người đầy đủ – một mốc quan trọng để đáp ứng triển vọng liệu pháp kháng thể trong điều trị bệnh ở người. Các kháng thể người đầy đủ hoặc cấu trúc kháng thể được cho là làm giảm tối thiểu các đáp ứng dị ứng hoặc miễn dịch bên trong với mAb thu được từ chuột nhắt hoặc của chuột nhắt và do đó làm tăng hiệu quả và độ an toàn của các kháng thể/cấu trúc kháng thể được sử dụng. Việc sử dụng các kháng thể của người đầy đủ hoặc cấu trúc kháng thể có thể được cho là tạo ra ưu điểm đáng kể trong việc điều trị các bệnh mạn tính và tái phát ở người, như bệnh viêm, bệnh tự miễn, và bệnh ung thư, mà cần sử dụng hợp chất nhiều lần.

Một phương pháp hướng đến mục tiêu này là thao tác di truyền các chủng chuột nhắt bị thiết hụt quá trình tổng hợp kháng thể chuột nhắt với các đoạn lớn của locut Ig người với mong muốn là chuột nhắt này sẽ tổng hợp một kho lớn các kháng thể của người khi không có mặt kháng thể chuột nhắt. Các đoạn Ig lớn của người sẽ bảo toàn được tính đa dạng gen biến thiên lớn cũng như là điều hòa quá trình tổng hợp và biểu hiện kháng thể một cách thích hợp. Bằng cách khai thác cơ chế xen trồng nhiều loại và chọn lọc kháng thể ở chuột nhắt và sự thiếu dung nạp miễn dịch với các protein của người, kho kháng thể người tạo ra ở các chủng chuột nhắt này sẽ tạo ra các kháng thể có ái lực cao với kháng kháng nguyên quan tâm bất kỳ, kể cả kháng nguyên của người. Bằng cách sử dụng công nghệ tế bào lai, mAb người đặc hiệu kháng nguyên có tính đặc hiệu mong muốn có thể dễ

dàng được tổng hợp và chọn lọc. Chiến lược chung này đã được chứng minh là có liên quan đến việc tạo ra chủng chuột nhắt Xenomouse thứ nhất (xem tài liệu Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994)). Chủng chuột nhắt Xenomouse được thao tác di truyền với các nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (yeast artifical chromosome-YAC) chứa các đoạn cấu trúc dòng mầm có kích thước 245kb và 190kb của locut chuỗi nặng của người và locut chuỗi nhẹ kappa, tương ứng mà chứa các trình tự lõi vùng biến đổi và cố định. YAC chứa Ig của người đã được chứng minh là tương thích với hệ chuột nhắt cả về sắp xếp lại và biểu hiện các kháng thể và có khả năng thay thế cho các gen Ig chuột nhắt đã bất hoạt. Điều này đã được chứng minh bằng khả năng cảm ứng sự phát triển tế bào B của chúng, khả năng tạo ra kho kháng thể người đầy đủ giống người trưởng thành, và khả năng tạo ra mAb người đặc hiệu kháng nguyên. Các kết quả này cũng gợi ý rằng việc đưa các phần lớn của locut Ig người chứa số gen V lớn hơn, các yếu tố điều hòa khác và vùng cố định Ig của người vào gần như có thể tạo ra kho đầy đủ mà đặc trưng của đáp ứng thể dịch của người với sự lây nhiễm và gây miễn dịch. Công trình nghiên cứu của Green at al. gần đây đã mở rộng nghiên cứu đến việc đưa kho kháng thể người với lượng lớn hơn xấp xỉ 80% vào nhờ đưa các đoạn YAC cấu hình có kích cỡ megabazơ dòng mầm của locut chuỗi nặng của người và locut chuỗi nhẹ kappa, tương ứng. Xem tài liệu Mendez *et al.* Nature Genetics 15:146-156 (1997) và đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 08/759,620.

Quy trình tổng hợp kháng thể của chuột nhắt XenoMouse còn được bàn luận và mô tả trong các đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 07/466,008, số 07/610, 515, số 07/919, 297, số 07/922,649, số 08/031,801, số 08/112,848, số 08/234,145, số 08/376,279, số 08/430,938, số 08/464,584, số 08/464,582, số 08/463,191, số 08/462,837, số 08/486,853, số 08/486,857, số 08/486,859, số 08/462,513, số 08/724,752, và số 08/759,620; và patent Mỹ số 6,162,963; 6,150,584; 6,114,598; 6,075,181, và 5,939,598 và patent Nhật số 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, và 3 068 507 B2. Cũng xem tài liệu Mendez *et al.* Nature Genetics 15:146-156 (1997) và Green và Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), patent châu Âu số EP 0 463 151 B1, công bố đơn quốc tế số WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310, và WO 03/47336.

Theo một phương án khác, các quy trình tổng hợp khác bao gồm GenPharm International, Inc., đã sử dụng phương pháp "tiểu locut". Theo phương pháp tiểu locut, locut Ig ngoại sinh được bắt chước nhờ bao gồm các mảnh (các gen riêng biệt) từ locut Ig. Do đó, một hoặc nhiều gen VH, một hoặc nhiều gen DH, một hoặc nhiều gen JH,

vùng cố định mu, và vùng cố định thứ hai (tốt hơn là vùng cố định gama) được tạo thành một cấu trúc để đưa vào động vật. Phương pháp này được mô tả trong patent Mỹ số 5,545,807 của Surani và các đồng tác giả và các patent Mỹ số 5,545,806; 5,625,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; 5,770,429; 5,789,650; 5,814,318; 5,877,397; 5,874,299; và 6,255,458 của Lonberg và Kay, các patent Mỹ 5,591,669 và 6,023.010 của Krimpenfort và Berns, các patent Mỹ số 5,612,205; 5,721,367; và 5,789,215 của Berns và các đồng tác giả, và patent Mỹ số 5,643,763 của Choi và Dunn, và đơn yêu cầu cấp patent Mỹ của GenPharm International số 07/574,748, số 07/575,962, số 07/810,279, số 07/853,408, số 07/904,068, số 07/990,860, số 08/053,131, số 08/096,762, số 08/155,301, số 08/161,739, số 08/165,699, số 08/209,741. Cũng xem patent châu Âu số EP 0 546 073 B1, công bố đơn quốc tế số WO 92/03918, công bố đơn quốc tế số WO 92/22645, công bố đơn quốc tế số WO 92/22647, công bố đơn quốc tế số WO 92/22670, công bố đơn quốc tế số WO 93/12227, công bố đơn quốc tế số WO 94/00569, công bố đơn quốc tế số WO 94/25585, công bố đơn quốc tế số WO 96/14436, công bố đơn quốc tế số WO 97/13852, và công bố đơn quốc tế số WO 98/24884 và patent Mỹ số 5,981,175. Xem thêm tài liệu: Taylor *et al.*(1992), Chen *et al.*(1993), Tuaillon *et al.* (1993), Choi *et al.*(1993), Lonberg *et al.* (1994), Taylor *et al.* (1994), và Tuaillon *et al.*(1995), Fishwild *et al.* (1996).

Kirin cũng đã mô tả việc tạo ra các kháng thể người từ chuột, trong đó, bằng cách dung hợp tiểu tế bào, các đoạn nhiễm sắc thể lớn, hoặc toàn bộ nhiễm sắc thể, được đưa vào. Xem đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 773 288 và 843 961. Xenerex Biosciences đang triển khai công nghệ tạo ra các kháng thể người tiềm năng. Trong công nghệ này, chuột nhắt SCID được tái thiết bằng các tế bào lympho của người, ví dụ, các tế bào B và/hoặc T. Sau đó chuột được gây miễn dịch bằng kháng nguyên và có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên này. Xem các patent Mỹ số 5,476,996; 5,698,767; và 5,958,765.

Các đáp ứng của kháng thể người kháng chuột nhắt (human anti-mouse antibody-HAMA) đã khiến cho ngành công nghiệp bào chế kháng thể khảm hay mặt khác được làm tương thích với người. Tuy nhiên được cho rằng các đáp ứng kháng thể người kháng khảm nhất định (human anti-chimeric antibody-HACA) sẽ được theo dõi, cụ thể là việc sử dụng kháng thể đa liều hoặc thường xuyên. Do đó, mong muốn tạo ra cấu trúc kháng

thể chứa vùng liên kết của người kháng BCMA và/hoặc vùng liên kết của người kháng CD3ε để loại bỏ các quan ngại và/hoặc các tác động của đáp ứng HAMA hoặc HACA.

Thuật ngữ "liên kết (đặc hiệu)", nhận diện (đặc hiệu)", "nhằm vào (đặc hiệu)", và "phản ứng (đặc hiệu) với" theo sáng chế có nghĩa là vùng liên kết tương tác hoặc tương tác đặc hiệu với epitop nhất định hoặc vị trí đích nhất định trên các phân tử đích (kháng nguyên), ở đây là: BCMA và CD3ε tương ứng.

Thuật ngữ "epitop" được dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà vùng liên kết, kháng thể hoặc globulin miễn dịch, hoặc dẫn xuất, đoạn hoặc biến thể của kháng thể hoặc globulin miễn dịch, gắn đặc hiệu vào. "Epitop" có tính kháng nguyên và do đó thuật ngữ epitop ở đây đôi khi được dùng để chỉ là "cấu trúc kháng nguyên" hay "quyết định kháng nguyên". Do đó, vùng liên kết là "vị trí tương tác với kháng nguyên". Việc liên kết/tương tác như vậy cũng được hiểu là "nhận diện đặc hiệu".

"Epitop" có thể được tạo ra bằng các axit amin kế tiếp hoặc không kế tiếp được đặt kề nhau bằng cách gấp bậc ba protein. "Epitop tuyến tính" là một epitop trong đó trình tự axit amin sơ cấp chứa epitop được nhận diện. Epitop tuyến tính thường chứa ít nhất 3 hoặc ít nhất 4, và thông thường hơn, ít nhất 5 hoặc ít nhất 6 hoặc ít nhất 7, ví dụ, khoảng 8 đến 10 axit amin trong một trình tự duy nhất.

"Epitop cấu hình", ngược với epitop tuyến tính, là một epitop trong đó trình tự axit amin sơ cấp chứa epitop không phải là thành phần xác định duy nhất của epitop được nhận diện (*ví dụ*, epitop trong đó trình tự axit amin sơ cấp không cần được nhận diện bởi vùng liên kết). Thông thường, epitop cấu hình có số axit amin nhiều hơn so với epitop tuyến tính. Liên quan đến việc nhận dạng các epitop cấu hình, vùng liên kết nhận dạng cấu trúc ba chiều của kháng nguyên, tốt hơn là peptit hoặc protein hoặc đoạn của chúng (trong phạm vi sáng chế, cấu trúc kháng nguyên cho một trong số các vùng liên kết được bao gồm trong protein kháng nguyên bề mặt tế bào đích). Ví dụ, nếu một phân tử protein cuộn gấp để tạo thành cấu trúc ba chiều, thì axit amin nhất định và/hoặc khung polypeptit tạo nên epitop cấu hình trở nên kề nhau cho phép kháng thể nhận diện được epitop. Các phương pháp xác định cấu hình epitop bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp tinh thể học tia X, phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (two-dimensional nuclear magnetic resonance-2D-NMR) và phương pháp đánh dấu trực tiếp vị trí và

phương pháp đo phổ khối cộng hưởng thuận từ điện tử (electron paramagnetic resonance-EPR).

Phương pháp lập bản đồ epitop được mô tả như sau: khi vùng (đoạn duỗi axit amin liên tiếp) trong protein BCMA của người được trao đổi/thay thế bằng vùng tương ứng của BCMA không phải của người và không phải của động vật linh trưởng (*ví dụ*, BCMA chuột nhắt, tuy nhiên các kháng nguyên khác như của gà, chuột cống, chuột cảnh, thỏ v.v. cũng có thể chấp nhận được), thì sự giảm liên kết với vùng liên kết được cho là đã xảy ra, trừ khi vùng liên kết phản ứng chéo với BCMA không phải của người, không phải của động vật linh trưởng được sử dụng. Tốt hơn là mức giảm này ít nhất là 10%, 20%, 30%, 40%, hoặc 50%; tốt hơn nữa là ít nhất 60%, 70%, hoặc 80%, và tốt nhất là 90%, 95% hoặc thậm chí 100% so với việc liên kết với vùng tương ứng trong protein BCMA của người, do đó mức liên kết với vùng tương ứng trong protein BCMA của người được đặt bằng 100%. Được dự tính rằng các thể khảm BCMA của người/BCMA không phải của người nêu trên được biểu hiện trong các tế bào CHO. Cũng được dự tính rằng các thể khảm BCMA của người/BCMA không phải của người được dung hợp với vùng xuyên màng và/hoặc vùng tế bào chất của một protein liên kết màng khác như EpCAM.

Theo một phương pháp lập bản đồ epitop khác, một vài phiên bản cụt của vùng ngoại bào BCMA của người có thể được tạo ra để xác định vùng đặc hiệu được nhận diện bởi vùng liên kết. Trong các phiên bản cụt này, các vùng/phân vùng BCMA ngoại bào khác được loại bỏ từng bước, bắt đầu từ đầu N. Dự tính rằng các phiên bản BCMA cụt có thể được biểu hiện trong các tế bào CHO. Cũng được dự tính rằng các phiên bản BCMA cụt có thể được dung hợp với vùng xuyên màng và/hoặc vùng tế bào chất của protein liên kết màng khác như EpCAM. Cũng được dự tính rằng các phiên bản BCMA cụt bao gồm đơn vùng peptit tín hiệu ở đầu N, ví dụ peptit tín hiệu thu được từ peptit tín hiệu của chuỗi nặng IgG chuột nhắt. Hơn nữa cũng được dự tính rằng các phiên bản BCMA cụt bao gồm vùng v5 ở đầu tận cùng N (sau đó là peptit tín hiệu) mà cho phép xác nhận sự biểu hiện chính xác của chúng trên bề mặt tế bào. Giảm hoặc mất khả năng liên kết được cho là xảy ra ở các phiên bản BCMA cụt này mà không bao gồm thêm bất kỳ vùng BCMA được nhận diện bởi vùng liên kết. Tốt hơn là, mức giảm liên kết này ít nhất là 10%, 20%, 30%, 40%, 50%; tốt hơn nữa ít nhất là 60%, 70%, 80%, và tốt nhất là 90%, 95% hoặc thậm chí 100%, nhờ đó liên kết với toàn bộ protein BCMA của người (hoặc vùng ngoại bào của nó) được đặt bằng 100.

Một phương pháp khác để xác định các gốc cụ thể của BCMA góp phần vào việc nhận diện cấu trúc kháng thể hoặc vùng liên kết là sàng lọc alanin (xem tài liệu ví dụ Morrison KL & Weiss GA. Cur Opin Chem Biol. 2001 Jun;5(3):302-7), trong đó mỗi gốc phân tích được thay thế bằng alanin, ví dụ nhờ đột biến trực tiếp vị trí. Alanin được sử dụng nhờ nhóm chức metyl, trơ về mặt hóa học, nhỏ mà hơn nữa còn bắt chước phân tử tham chiếu cấu trúc bậc hai mà nhiều axit amin khác có. Đôi khi axit amin lớn như valin hoặc lơxin có thể được sử dụng trong các trường hợp mà mong muốn bảo toàn kích cỡ của các gốc đột biến. Sàng lọc alanin là công nghệ tiên tiến đã được sử dụng trong một thời gian dài.

Tương tác giữa vùng liên kết và epitop hoặc vùng chứa epitop có nghĩa là vùng liên kết thể hiện ái lực thích hợp với epitop/vùng chứa epitop trên một protein hoặc kháng nguyên cụ thể (ở đây lần lượt là: BCMA và CD3) và, nói chung, không thể hiện khả năng phản ứng nhiều với các protein hoặc kháng nguyên ngoài BCMA hoặc CD3. "Ái lực thích hợp" bao gồm liên kết với ái lực bằng 10^{-6} M (KD) hoặc lớn hơn. Tốt hơn là, việc liên kết được coi là đặc hiệu nếu ái lực liên kết nằm trong khoảng từ 10^{-12} đến 10^{-8} M, từ 10^{-12} đến 10^{-9} M, từ 10^{-12} đến 10^{-10} M, từ 10^{-11} đến 10^{-8} M, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10^{-11} đến 10^{-9} M. Vùng liên kết có phản ứng hoặc liên kết đặc hiệu với đích hay không có thể dễ dàng được kiểm tra bằng cách, *không kể các cách khác*, so sánh phản ứng giữa vùng liên kết này với protein hoặc kháng nguyên đích với phản ứng giữa vùng liên kết này với các protein hoặc kháng nguyên ngoài BCMA hoặc CD3. Tốt hơn là, vùng liên kết theo sáng chế hầu như hoặc về cơ bản không liên kết với các protein hoặc kháng nguyên ngoài BCMA hoặc CD3 (*tức là*, vùng liên kết thứ nhất không có khả năng liên kết với các protein khác ngoài BCMA và vùng liên kết thứ hai không có khả năng liên kết với các protein khác ngoài CD3). Đặc điểm được dự tính của các cấu trúc kháng thể theo sáng chế là có đặc trưng ái lực cao so với các dạng HLE khác. Kết quả là, ái lực cao này tạo ra thời gian bán thải in vivo kéo dài. Thời gian bán thải lâu hơn của các cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể làm giảm khoảng thời gian và tần số sử dụng thường sẽ góp phần cải thiện sự tuân thủ của bệnh nhân. Đây là điều quan trọng vì các cấu trúc kháng thể theo sáng chế đặc biệt có lợi đối với các bệnh nhân ung thư rất yếu hoặc thậm chí mắc nhiều bệnh.

Thuật ngữ "hầu như không/về cơ bản không liên kết" hoặc "không có khả năng liên kết" có nghĩa là vùng liên kết theo sáng chế không liên kết với protein hoặc kháng nguyên khác ngoài BCMA hoặc CD3, *tức là*, có mức phản ứng không quá 30%, tốt hơn là không

quá 20%, tốt hơn nữa là không quá 10%, đặc biệt tốt hơn là không quá 9%, 8%, 7%, 6% hoặc 5% với các protein hoặc kháng nguyên khác ngoài BCMA hoặc CD3, do đó mức liên kết với BCMA hoặc CD3, tương ứng, được đặt bằng 100%.

Liên kết đặc hiệu được tin là bị ảnh hưởng bởi các motip cụ thể trong trình tự axit amin của vùng liên kết và kháng nguyên. Do đó, việc liên kết đạt được là nhờ các cấu trúc bậc một, bậc hai và/hoặc bậc ba cũng như là nhờ các cải biến thứ cấp các cấu trúc này. Tương tác đặc hiệu giữa vị trí tương tác kháng nguyên với kháng nguyên đặc hiệu có thể dẫn đến sự liên kết đơn giản vị trí này với kháng nguyên. Hơn nữa, theo cách khác hoặc ngoài ra tương tác đặc hiệu giữa vị trí liên kết kháng nguyên với kháng nguyên đặc hiệu có thể còn dẫn đến sự khởi đầu truyền tín hiệu, *ví dụ* do sự cảm ứng thay đổi cấu hình của kháng nguyên, oligome hóa kháng nguyên, v.v..

Thuật ngữ "biến đổi" được dùng để chỉ các phần của kháng thể hoặc các vùng globulin miễn dịch thể hiện tính biến đổi trong trình tự của chúng và có liên quan đến việc quyết định tính đặc hiệu và ái lực liên kết của một kháng thể cụ thể (tức là, "các vùng biến đổi"). Việc ghép cặp chuỗi nặng biến đổi (VH) và chuỗi nhẹ biến đổi (VL) cùng nhau tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên đơn.

Tính biến đổi đều không được phân bố ở các vùng biến đổi của kháng thể; nó chỉ tập trung ở các phân vùng của mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Các phân vùng này được gọi là "vùng siêu biến" hoặc "vùng quyết định bổ trợ" (complementarity determining region-CDR). Các phần được bảo toàn hơn (tức là, không siêu biến) của các vùng biến đổi được gọi là vùng "khung" (FRM hoặc FR) và tạo ra khung protein cho sáu CDR trong không gian ba chiều để tạo ra bề mặt liên kết với kháng nguyên. Mỗi vùng biến đổi của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có nguồn gốc trong tự nhiên chứa bốn vùng FRM (FR1, FR2, FR3, và FR4), chủ yếu theo cấu hình tấm β, được nối với ba vùng siêu biến, mà tạo ra các vòng nối, và trong một vài trường hợp tạo nên một phần cấu trúc tấm β. Các vùng siêu biến trong mỗi chuỗi được bố trí gần nhau nhờ FRM và, với các vùng siêu biến từ chuỗi còn lại, góp phần tạo ra vị trí liên kết với kháng nguyên (xem tài liệu Kabat *et al.*, *loc. cit.*).

Thuật ngữ "CDR", và thuật ngữ số nhiều "các CDR", được dùng để chỉ vùng quyết định bổ trợ mà ba vùng này tạo nên đặc tính liên kết của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3) và ba vùng này tạo nên đặc tính liên kết của vùng biến đổi chuỗi

nặng (CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3). Các CDR chứa hầu hết các gốc chịu trách nhiệm cho các tương tác đặc hiệu của kháng thể với kháng nguyên và do đó góp phần tạo nên hoạt tính chức năng của phân tử kháng thể: chúng là các quyết định chính của tính đặc hiệu kháng nguyên.

Ranh giới và chiều dài CDR xác định chính xác được đánh số và phân loại theo các hệ đánh số và phân loại khác nhau. Do đó, các CDR có thể được dùng để chỉ tiếp xúc Kabat, Chothia hoặc định nghĩa ranh giới khác bất kỳ, bao gồm hệ đánh số được mô tả ở đây. Mặc dù các định nghĩa ranh giới khác nhau, nhưng mỗi hệ đánh số này có mức chồng chéo nhất định mà góp phần tạo nên vùng được gọi là "các vùng siêu biến" trong các trình tự biến đổi. Do đó, các định nghĩa CDR theo các hệ thống này có thể khác nhau về chiều dài và diện tích ranh giới đối với vùng khung liền kề. Xem ví dụ Kabat (một phương pháp dựa trên tính biến đổi trình tự chéo loài), Chothia (một phương pháp dựa trên các nghiên cứu tinh thể học của các phức hợp kháng nguyên-kháng thể), và/hoặc MacCallum (Kabat *et al.*, *loc. cit.*; Chothia *et al.*, J. MoI. Biol, 1987, 196: 901-917; và MacCallum *et al.*, J. MoI. Biol, 1996, 262: 732). Một phương pháp chuẩn khác để xác định vị trí liên kết kháng nguyên là định nghĩa AbM được sử dụng bởi phần mềm lập mô hình kháng thể AbM của công ty Oxford Molecular. Xem tài liệu, *ví dụ*, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. và Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Mặc dù hai kỹ thuật xác định gốc này xác định được các vùng chồng chéo nhau, nhưng không xác định được các vùng giống nhau, tuy nhiên chúng có thể được kết hợp với nhau để xác định CDR lai. Tuy vậy, việc đánh số theo hệ thống được gọi là Kabat được ưu tiên hơn.

Thông thường, CDR tạo ra cấu trúc vòng mà có thể được phân loại là cấu trúc chính tắc. Thuật ngữ "cấu trúc chính tắc" được dùng để chỉ cấu hình chuỗi chính mà được chấp nhận bởi các vòng liên kết kháng nguyên (CDR). Từ nghiên cứu so sánh cấu trúc, đã nhận thấy rằng chỉ năm trong số sáu vòng liên kết với kháng nguyên có kho cấu hình có thể dùng được giới hạn. Mỗi cấu trúc chính tắc có thể được đặc trưng bởi các góc xoắn của khung polypeptit. Do đó, các vòng tương ứng giữa các kháng thể có thể có cấu trúc ba chiều tương tự nhau, mặc dù hầu hết các phần của các vòng đều có tính biến đổi trình tự axit amin cao (Chothia và Lesk, J. MoI. Biol., 1987, 196: 901; Chothia *et al.*, Nature, 1989, 342: 877; Martin và Thornton, J. MoI. Biol, 1996, 263: 800). Hơn nữa, có mối

quan hệ giữa cấu trúc vòng được chấp nhận và trình tự axit amin quanh nó. Cấu trúc của lớp chính tắc cụ thể được xác định bằng chiều dài vòng và các gốc axit amin nằm ở các vị trí chính trong vòng, cũng như là trong khung được bảo toàn (*tức là*, bên ngoài vòng). Do đó việc xác định lớp chính tắc cụ thể có thể được tiến hành dựa trên sự có mặt của các gốc axit amin chính này.

Thuật ngữ "cấu trúc chính tắc" có thể cũng bao gồm cả trình tự tuyến tính của kháng thể, ví dụ, như được phân loại bởi Kabat (Kabat *et al.*, loc. cit.). Sơ đồ đánh số Kabat (hệ thống) được chấp nhận rộng rãi làm chuẩn để đánh số các gốc axit amin của vùng biến đổi kháng thể theo cách phù hợp và là sơ đồ được ưu tiên để áp dụng trong sáng chế như được đề cập ở đây. Các phương pháp nghiên cứu cấu trúc khác cũng có thể được sử dụng để xác định cấu trúc chính tắc của kháng thể. Ví dụ, các gốc khác nhau không được phản ánh đầy đủ bằng hệ đánh số Kabat có thể được mô tả bằng hệ đánh số của Chothia và các đồng tác giả và/hoặc được bộc lộ bằng các kỹ thuật khác, ví dụ, kỹ thuật tinh thể học và lập mô hình bằng máy tính cấu trúc hai chiều hoặc ba chiều. Do đó, trình tự kháng thể nhất định có thể được xếp vào lớp chính tắc mà cho phép, không kể các vấn đề khác, xác định trình tự khung thích hợp (*ví dụ*, dựa vào mong muốn bao gồm nhiều cấu trúc chính tắc trong thư viện). Đánh số Kabat trình tự axit amin của kháng thể và phương pháp nghiên cứu cấu trúc được mô tả bởi tài liệu Chothia *et al.*, *loc. cit.* và mối liên quan của chúng trong việc phân tích các khía cạnh chính của cấu trúc kháng thể, như được mô tả trong tài liệu tham khảo. Cấu trúc dưới phân tử và cấu hình ba chiều của các lớp globulin miễn dịch khác nhau là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để xem xét cấu trúc kháng thể, xem tài liệu Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, biên tập Harlow *et al.*, 1988.

CDR3 của chuỗi nhẹ và đặc biệt là CDR3 của chuỗi nặng có thể góp phần tạo nên các quyết định quan trọng nhất trong việc liên kết kháng nguyên ở các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Trong một vài cấu trúc kháng thể, CDR3 chuỗi nặng dường như là góp phần tạo nên vùng tiếp xúc chính giữa kháng thể và kháng nguyên. Sơ đồ chọn lọc *in vitro* trong đó một mình CDR3 được biến đổi có thể được sử dụng để làm thay đổi các đặc tính liên kết của kháng thể hoặc xác định các gốc góp phần cho việc liên kết của kháng nguyên. Do đó, CDR3 thường là nguồn đa dạng phân tử lớn nhất trong vị trí liên kết kháng thể. H3, ví dụ, có thể có chiều dài ngắn gồm hai gốc axit amin hoặc nhiều hơn 26 axit amin.

Trong kháng thể hoặc globulin miễn dịch có chiều dài đầy đủ cổ điển, mỗi chuỗi nhẹ (L) được liên kết với chuỗi nặng (H) bằng một liên kết disulfua cộng hóa trị, trong khi đó hai chuỗi H được liên kết với nhau bằng một hoặc nhiều liên kết disulfua tùy thuộc vào isotyp chuỗi H . Vùng CH gần nhất với VH thường được gọi là CH1. Vùng cố định ("C") không có liên quan trực tiếp đến việc liên kết kháng nguyên, nhưng thể hiện các chức năng hiệu ứng khác nhau, như tính độc tế bào qua trung gian tế bào, phụ thuộc kháng thể và hoạt hóa bổ thể. Vùng Fc của kháng thể được bao gồm trong các vùng cố định của chuỗi nặng và có thể tương tác với các thụ thể Fc trên bề mặt tế bào chẳng hạn.

Trình tự của các gen kháng thể sau khi lắp ghép và đột biến soma bị biến đổi nhiều, và các gen biến đổi này được ước tính mã hóa 10^{10} phân tử kháng thể khác nhau (Immunoglobulin Genes, 2nd ed., biên tập Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Do đó, hệ miễn dịch tạo ra kho globulin miễn dịch. Thuật ngữ "kho" được dùng để chỉ ít nhất một trình tự nucleotit thu được từ toàn bộ hoặc một phần của ít nhất một trình tự mã hóa ít nhất một globulin miễn dịch. (Các) trình tự này có thể được tạo ra bằng cách sắp xếp lại *in vivo* các đoạn V, D, và J của chuỗi nặng, và các đoạn V và J của chuỗi nhẹ. Theo cách khác, (các) trình tự có thể được tạo ra khi tế bào đáp ứng với việc sắp xếp lại, ví dụ, kích thích *in vitro*. Theo cách khác, một phần hoặc toàn bộ (các) trình tự có thể được tạo ra bằng cách tách intron ADN, tổng hợp nucleotit, gây đột biến, và các phương pháp khác, xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,565,332. Kho có thể chỉ chứa một trình tự hoặc có thể bao gồm nhiều trình tự, kể cả các trình tự trong bộ sưu tập tính đa dạng di truyền.

Thuật ngữ "phần Fc" hoặc "monome Fc" theo sáng chế nghĩa là polypeptit chứa ít nhất một vùng có chức năng của vùng CH2 và ít nhất một vùng có chức năng của vùng CH3 của phân tử globulin miễn dịch. Như rõ ràng từ thuật ngữ "monome Fc", polypeptit chứa các vùng CH đó là "monome polypeptit". Monome Fc có thể là polypeptit chứa ít nhất một đoạn của vùng cố định của globulin miễn dịch ngoại trừ vùng globulin miễn dịch không đổi của chuỗi nặng thuộc vùng thứ nhất (CH1), nhưng duy trì ít nhất một phần chức năng của một vùng CH2 và một phần chức năng của một vùng CH3, trong đó vùng CH2 là đầu tận cùng amin đối với vùng CH3. Theo một khía cạnh được ưu tiên của định nghĩa này, monome Fc có thể là vùng cố định polypeptit chứa một phần của vùng bản lề Ig-Fc, vùng CH2 và vùng CH3, trong đó vùng bản lề là đầu tận cùng amin đối với vùng CH2. Dự tính rằng vùng bản lề theo sáng chế thúc đẩy quá trình dime hóa. Các phân tử polypeptit Fc này có thể thu được nhờ sự tiêu hóa papain vùng globulin miễn dịch (tất

nhiên là tạo ra dime của hai polypeptit Fc), ví dụ và không làm giới hạn. Theo một khía cạnh khác của định nghĩa này, monome Fc có thể là vùng polypeptit chứa một phần của vùng CH2 và vùng CH3. Các phân tử polypeptit Fc này có thể thu được nhờ sự tiêu hóa pepsin phân tử globulin miễn dịch, ví dụ và không làm giới hạn. Theo một phương án, trình tự polypeptit của monome Fc gần như giống với trình tự polypeptit Fc của: vùng IgG_1 Fc, vùng IgG_2 Fc, vùng IgG_3 Fc, vùng IgG_4 Fc, vùng IgM Fc, vùng IgA Fc, vùng IgD Fc và vùng IgE Fc. *(Ví dụ, xem* Padlan, Molecular Immunology, 31(3), 169-217 (1993)). Vì có một vài biến đổi giữa các globulin miễn dịch, và chỉ để làm sáng tỏ, monome Fc dùng để chỉ hai vùng globulin miễn dịch vùng cố định chuỗi nặng sau cùng của IgA, IgD, và IgG, và ba vùng globulin miễn dịch vùng cố định chuỗi nặng sau cùng của IgE và IgM. Như được đề cập, monome Fc còn có thể bao gồm vùng bản lề linh hoạt đầu tận cùng N đối với các vùng này. Đối với IgA và IgM, monome Fc có thể bao gồm chuỗi J. Đối với IgG, phần Fc gồm các vùng globulin miễn dịch CH2 và CH3 và vùng bản lề giữa hai vùng thứ nhất và CH2. Mặc dù các ranh giới của phần Fc có thể thay đổi một ví dụ đối với phần Fc chuỗi nặng IgG người chứa vùng bản lề chức năng, vùng CH2 và CH3 có thể được định nghĩa là gồm các gốc D231 (của vùng bản lề – tương ứng với D234 trong bảng 1 dưới đây) đến P476, lần lượt là L476 (đối với IgG_4) của đầu tận cùng carboxyl của vùng CH3, trong đó việc đánh số là theo Kabat. Hai phần Fc hoặc monome Fc, mà được dung hợp với nhau nhờ trình tự liên kết peptit xác định vùng thứ ba của cấu trúc kháng thể theo sáng chế, vùng này còn có thể được xác định là vùng scFc.

Theo một phương án của sáng chế, dự tính rằng vùng scFc như được mô tả ở đây, lần lượt là các monome Fc được dung hợp với nhau chỉ được bao gồm trong vùng liên kết thứ ba của cấu trúc kháng thể.

Theo sáng chế, vùng bản lề IgG có thể được nhận dạng bởi sự tương tự bằng cách sử dụng hệ đánh số Kabat như được nêu trong Bảng 1. Theo đó, dự tính rằng vùng/miền bản lề của sáng chế gồm các gốc axit amin tương ứng với sự kéo giãn trình tự IgG_1 từ D234 đến P243 theo hệ đánh số Kabat. Tương tự, dự tính rằng vùng/miền bản lề của sáng chế gồm hoặc bao gồm trình tự bản lề IgG1 DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 99) (tương ứng với sự kéo giãn từ D234 đến P243 như được nêu trong Bảng 1 dưới đây – các biến thể của trình tự này cũng được dự tính với điều kiện là vùng bản lề vẫn thúc đẩy quá trình dime hóa). Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, vị trí glycosyl hóa ở vị trí 314 theo Kabat của vùng CH2 trong vùng liên kết thứ ba của cấu trúc kháng thể được

loại bỏ bằng cách thay thế N314X, trong đó X là axit amin bất kỳ loại trừ Q. Tốt hơn, nếu việc thay thế này là việc thay thế N314G. Theo một phương án được ưu tiên hơn, vùng CH2 còn bao gồm sự thay thế sau (vị trí theo Kabat): V321C và R309C (các thay thế này đưa cầu liên kết xystein disulfua trong vùng vào ở vị trí 309 vào 321 theo Kabat).

Cũng dự tính rằng vùng liên kết thứ ba của cấu trúc kháng thể theo sáng chế gồm hoặc bao gồm, theo thứ tự từ amin đến carboxyl: DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 99) (tức là vùng bản lề) -CH2-CH3-trình tự liên kết- DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 99) (tức là vùng bản lề) -CH2-CH3. Theo một phương án được ưu tiên, trình tự liên kết peptit của cấu trúc kháng thể nêu trên được đặc trưng bởi trình tự axit amin Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, tức là Gly_4Ser (SEQ ID NO: 1), hoặc polyme của chúng, tức là $(Gly_4Ser)x$, trong đó x là số nguyên 5 hoặc lớn hơn (ví dụ, 5, 6, 7, 8, v.v. hoặc lớn hơn), 6 là được ưu tiên ((Gly4Ser)6). Cấu trúc này còn có thể gồm các thay thế N314X nêu trên, tốt hơn là N314G, và/hoặc các thay thế khác V321C và R309C. Theo một phương án được ưu tiên của cấu trúc kháng thể theo sáng chế như được định nghĩa ở trên đây, dự tính rằng vùng liên kết thứ hai liên kết với epitop ngoại bào của chuỗi CD3ε của người và/hoặc chuỗi CD3ε của khỉ *Macaca*.

Bảng 1: Đánh số Kabat các gốc axit amin của vùng bản lề

Đánh số IMGT đối với bản lề	**Dịch mã axit amin IgG_1**	**Đánh số Kabat**
1	(E)	226
2	P	227
3	K	228
4	S	232
5	C	233
6	D	234
7	K	235
8	T	236
9	H	237
10	T	238
11	C	239
12	P	240

13	P	241
14	C	242
15	P	243

Theo các phương án khác của sáng chế, vùng/miền bản lề gồm hoặc bao gồm trình tự bản lề kiểu phụ IgG2 ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 100), trình tự bản lề kiểu phụ IgG3 ELKTPLDTTHTCPRCP (SEQ ID NO: 101) hoặc ELKTPLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO: 103), và/hoặc trình tự bản lề kiểu phụ IgG4 ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 102). Trình tự bản lề kiểu phụ IgG1 có thể là như sau: EPKSCDKTHTCPPCP (như được nêu trong Bảng 1 và SEQ ID NO: 104). Do đó, các vùng bản lề trung tâm này cũng được dự tính trong phạm vi của sáng chế.

Vị trí và trình tự của vùng IgG CH2 và IgG CD3 có thể được nhận dạng bằng sự tương tự bằng cách sử dụng hệ đánh số Kabat như được nêu trong Bảng 2:

Bảng 2: Đánh số Kabat các gốc axit amin của vùng IgG CH2 và CH3

Kiểu phụ IgG	**Dịch mã CH2 aa**	**Đánh số Kabat CH2**	**Dịch mã CH3 aa**	**Đánh số Kabat CH3**
IgG_1	AP*E*... ...*KA*K	244... ...360	GQP.....***P*GK**	361... ...478
IgG_2	AP*P*... ...*KT*K	244... ...360	GQP.....***P*GK**	361... ...478
IgG_3	AP*E*... ...*KT*K	244... ...360	GQP.....***P*GK**	361... ...478
IgG_4	AP*E*... ...*KA*K	244... ...360	GQP.....***L*GK**	361... ...478

Theo một phương án của sáng chế, các gốc axit amin được bôi đậm trong vùng CH3 của monome Fc thứ nhất hoặc cả hai monome Fc bị loại bỏ.

Trình tự liên kết peptit, mà nhờ đó các monome polypeptit ("phần Fc" hoặc " monome Fc") của vùng liên kết thứ ba được dung hợp với nhau, tốt hơn là gồm ít nhất 25 gốc axit amin (25, 26, 27, 28, 29, 30, v.v.). Tốt hơn, nếu trình tự liên kết peptit này gồm ít nhất 30 gốc axit amin (30, 31, 32, 33, 34, 35, v.v.). Cũng ưu tiên rằng trình tự liên kết gồm tới 40

gốc axit amin, tốt hơn nữa là tới 35 gốc axit amin, tốt nhất là chính xác 30 gốc axit amin. Một phương án được ưu tiên của trình tự liên kết peptit được đặc trưng bởi trình tự axit amin Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, tức là Gly_4Ser (SEQ ID NO: 1), hoặc polyme của chúng, tức là $(Gly_4Ser)x$, trong đó x là số nguyên 5 hoặc lớn hơn (ví dụ, 6, 7 hoặc 8). Tốt hơn, nếu số nguyên là 6 hoặc 7, tốt hơn nữa nếu số nguyên là 6.

Trong trường hợp mà trình tự liên kết được sử dụng để dung hợp vùng thứ nhất với vùng thứ hai, hoặc vùng thứ nhất hoặc vùng thứ hai với vùng thứ ba, tốt hơn là trình tự liên kết này có chiều dài và trình tự thích hợp để đảm bảo rằng mỗi trong số các vùng thứ nhất và thứ hai có thể, độc lập với nhau, giữ lại các tính đặc hiệu liên kết khác nhau của chúng. Đối với các trình tự liên kết peptit mà nối ít nhất hai vùng liên kết (hoặc hai vùng biến đổi) trong cấu trúc kháng thể theo sáng chế, các trình tự liên kết peptit được ưu tiên này là các trình tự chỉ chứa một vài gốc axit amin, *ví dụ* 12 gốc axit amin hoặc ít hơn. Do đó, các trình tự liên kết peptit gồm có 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 hoặc 5 gốc axit amin được ưu tiên. Trình tự liên kết peptit được dự tính có ít hơn 5 axit amin bao gồm 4, 3, 2 hoặc một axit amin, trong đó các trình tự liên kết giàu Gly được ưu tiên. Phương án được ưu tiên của trình tự liên kết peptit để dung hợp vùng thứ nhất và vùng thứ hai được nêu trong SEQ ID NO:1. Phương án của trình tự liên kết được ưu tiên của trình tự liên kết peptit để dung hợp vùng thứ hai và vùng thứ ba là trình tự liên kết $(Gly)_4$, còn được gọi là trình tự liên kết G_4.

Axit amin "đơn" đặc biệt được ưu tiên trong trường hợp của một trong các "trình tự liên kết peptit" nêu trên là Gly. Do đó, trình tự liên kết peptit này có thể gồm một axit amin Gly. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, trình tự liên kết peptit được đặc trưng bởi trình tự axit amin Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, tức là Gly_4Ser (SEQ ID NO: 1), hoặc các polyme của nó, tức là $(Gly_4Ser)x$, trong đó x là một số nguyên bằng 1 hoặc lớn hơn (ví dụ 2 hoặc 3). Trình tự liên kết được ưu tiên được mô tả trong SEQ ID NO: 1 đến 12. Các đặc tính của trình tự liên kết peptit này mà bao gồm cả việc không thúc đẩy các cấu trúc thứ cấp, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong tài liệu ví dụ Dall'Acqua at al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle at al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) và Raag và Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Các trình tự liên kết peptit mà không thúc đẩy thêm các cấu trúc thứ cấp bất kỳ được ưu tiên. Liên kết các vùng này với nhau có thể được đề cập, *ví dụ*, bằng kỹ thuật di truyền, như được mô tả trong các ví dụ. Các phương pháp tạo ra các cấu trúc chuỗi đơn đặc hiệu kép được liên kết chức năng

và được dung hợp và biểu hiện chúng trong các tế bào của động vật có vú hoặc vi khuẩn là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (*ví dụ* công bố đơn quốc tế số WO 99/54440 hoặc Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

Theo một phương án được ưu tiên của cấu trúc kháng thể hoặc theo sáng chế, vùng thứ nhất và vùng thứ hai tạo thành cấu trúc kháng thể ở dạng được chọn từ nhóm gồm có $(scFv)_2$, scFv-mAb đơn vùng, dime của một đoạn globulin miễn dịch và oligome của dạng bất kỳ trong số các dạng nêu trên.

Theo một phương án đặc biệt được ưu tiên, và như được mô tả trong các ví dụ đi kèm, vùng thứ nhất và vùng thứ hai của cấu trúc kháng thể theo sáng chế là "cấu trúc kháng thể chuỗi đơn đặc hiệu kép", tốt hơn nữa là "Fv chuỗi đơn" (scFv) đặc hiệu kép. Mặc dù hai vùng của đoạn Fv, VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng biệt, nhưng chúng có thể được nối với nhau, bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp, bằng trình tự liên kết tổng hợp – như được mô tả trên đây – mà cho phép chúng được tạo ra ở dạng chuỗi protein đơn trong đó cặp vùng VL và VH tạo ra phân tử hóa trị một; xem tài liệu *ví dụ*, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Các đoạn kháng thể này được tạo ra bằng các kỹ thuật thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và các đoạn được đánh giá chức năng theo cách giống như đánh giá chức năng của nguyên kháng thể hoặc kháng thể có chiều dài đầy đủ. Do đó, đoạn biến đổi chuỗi đơn (scFv) là một protein dung hợp của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và của chuỗi nhẹ (VL) của globulin miễn dịch, thường được nối bằng một trình tự liên kết peptit ngắn có khoảng mười đến 25 axit amin, tốt hơn là khoảng từ 15 đến 20 axit amin. Trình tự liên kết này thường giàu glyxin cần cho tính linh động, cũng như là serin hoặc threonin cần cho độ hòa tan, và có thể nối đầu tận cùng N của VH với đầu tận cùng C của VL, hoặc ngược lại. Protein này vẫn giữ lại được tính đặc hiệu của globulin miễn dịch gốc, mặc dù đã loại bỏ các vùng cố định và đưa vào trình tự liên kết.

Các cấu trúc kháng thể chuỗi đơn đặc hiệu kép là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Các kỹ thuật tổng hợp kháng thể chuỗi đơn được mô tả (xem tài liệu, *không kể các tài liệu khác*, Patent Mỹ số

4,946,778, Kontermann và Dübel (2010), *loc. cit.* và Little (2009), *loc. cit.*) có thể được tiến hành để tổng hợp cấu trúc kháng thể chuỗi đơn nhận diện đặc hiệu (các) đích được chọn.

Các đoạn biến đổi chuỗi đơn hóa trị hai (cũng được gọi là có hóa trị hai) hoặc các đoạn biến đổi chuỗi đơn đặc hiệu kép (bi-scFvs hoặc di-scFvs có dạng $(scFv)_2$ có thể được thao tác di truyền bằng cách liên kết hai phân tử scFv (*ví dụ* với các trình tự liên kết như được mô tả trên đây). Nếu hai phân tử scFv này có tính đặc hiệu liên kết như nhau, thì tốt hơn là phân tử $(scFv)_2$ tạo ra sẽ được cho là có hóa trị hai (*tức là* phân tử này có hai hóa trị đối với cùng một epitop đích). Nếu hai phân tử scFv có tính đặc hiệu liên kết khác nhau, thì phân tử $(scFv)_2$ tạo ra tốt hơn là sẽ được cho là đặc hiệu kép. Việc liên kết này có thể được tiến hành bằng cách tạo ra một chuỗi peptit đơn có hai vùng VH và hai vùng VL, thu được các scFv liên tiếp (xem tài liệu, *ví dụ* Kufer P. *et al.*, (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244). Một khả năng khác là tạo ra các phân tử scFv với các peptit liên kết mà quá ngắn để hai vùng biến đổi gấp lại với nhau (*ví dụ* khoảng năm axit amin), buộc scFv phải dime hóa. Loại này được biết đến là dime của một đoạn globulin miễn dịch (xem tài liệu *ví dụ* Hollinger, Philipp *et al.*, (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8).

Theo sáng chế, vùng thứ nhất, thứ hai hoặc vùng thứ nhất và vùng thứ hai có thể gồm kháng thể đơn vùng, lần lượt là vùng biến đổi hoặc ít nhất là các CDR của kháng thể đơn vùng. Các kháng thể đơn vùng chỉ chứa một vùng biến đổi kháng thể (dạng monome) mà có thể liên kết chọn lọc với kháng nguyên đặc hiệu, một cách độc lập với các vùng V khác. Kháng thể đơn vùng thứ nhất được thao tác di truyền từ các kháng thể chuỗi nặng được tìm thấy ở họ lạc đà, và các kháng thể này được gọi là các đoạn V_HH. Cá sụn cũng có các kháng thể chuỗi nặng (IgNAR) mà từ đó thu được các kháng thể đơn vùng được gọi là các đoạn V_{NAR}. Một phương pháp khác là tách các vùng biến đổi dạng dime ra khỏi các globulin miễn dịch thông thường *ví dụ* các globulin miễn dịch của người hoặc loài gặm nhấm thành các monome, nhờ đó thu được VH hoặc VL ở dạng Ab đơn vùng. Mặc dù hầu hết nghiên cứu về các kháng thể đơn vùng hiện nay đều dựa trên các vùng biến đổi chuỗi nặng, tuy nhiên các kháng thể nano thu được từ các chuỗi nhẹ cũng đã cho thấy liên kết đặc hiệu với các epitop đích. Ví dụ về các kháng thể đơn vùng được gọi là sdAb, kháng thể nano hoặc kháng thể một vùng biến đổi.

Do đó, (mAb đơn vùng)$_2$ là một cấu trúc kháng thể đơn dòng gồm (ít nhất) hai kháng thể đơn dòng đơn vùng, mà được chọn lọc riêng rẽ từ nhóm gồm có V_H, V_L, V_HH và V_{NAR}. Tốt hơn là, trình tự liên kết là ở dạng trình tự liên kết peptit. Tương tự, "scFv-mAb đơn vùng" là một cấu trúc kháng thể đơn dòng bao gồm ít nhất một kháng thể đơn vùng như được mô tả trên đây và một phân tử scFv như được mô tả trên đây. Tốt hơn là, trình tự liên kết này là ở dạng trình tự liên kết peptit.

Cấu trúc kháng thể có cạnh tranh để liên kết với cấu trúc kháng thể xác định khác hay không có thể được xác định theo thử nghiệm cạnh tranh như thử nghiệm cạnh tranh ELISA hoặc thử nghiệm cạnh tranh dựa trên tế bào. (Các hạt) vi hạt liên kết với avidin cũng có thể được sử dụng. Tương tự với đĩa ELISA được phủ avidin, khi được cho phản ứng với protein được biotin hóa, mỗi trong số các hạt này có thể được sử dụng ở dạng chất nền mà thử nghiệm có thể được thực hiện trên đó. Kháng nguyên được phủ trên hạt và sau đó được phủ sơ bộ bằng kháng nguyên thứ nhất. Kháng nguyên thứ hai được bổ sung vào và sự liên kết khác bất kỳ được xác định. Dụng cụ có thể để đọc bao gồm máy đếm tế bào theo dòng chảy.

Các tế bào T hoặc tế bào lympho T là loại tế bào lympho (bản thân là một loại bạch cầu) mà đóng một vai trò quan trọng trong miễn dịch qua trung gian tế bào. Có một vài tiểu quần thể tế bào T, mỗi quần thể có chức năng riêng biệt. Các tế bào T có thể được phân biệt với các tế bào lympho khác, như tế bào B và tế bào NK, bởi sự có mặt của thụ thể tế bào T (T cell receptor-TCR) trên bề mặt tế bào. TCR chịu trách nhiệm cho việc nhận diện các kháng nguyên liên kết với các phân tử phức hợp tương thích mô chính (major histocompatibility complex-MHC) và bao gồm hai chuỗi protein khác nhau. Ở 95% tế bào T, TCR bao gồm chuỗi alpha (α) và beta (β). Nếu TCR liên hợp với peptit kháng nguyên và MHC (phức hợp peptit /MHC), thì tế bào lympho T được hoạt hóa nhờ một loạt các sự kiện hóa sinh được gây ra bởi các enzym liên kết, các đồng thụ thể, các phân tử tiếp hợp chuyên dùng, và các yếu tố phiên mã được hoạt hóa hoặc được giải phóng.

Phức hợp thụ thể CD3 là một phức hợp protein và gồm bốn chuỗi. Ở động vật có vú, phức hợp này chứa một chuỗi CD3γ (gama), một chuỗi CD3δ (delta), và hai chuỗi CD3ε (epsilon). Các chuỗi này liên kết được với thụ thể tế bào T (T cell receptor-TCR) và chuỗi được gọi là ζ (zeta) để tạo ra phức hợp CD3 thụ thể tế bào T và tạo ra tín hiệu hoạt hóa ở các tế bào lympho T. Các chuỗi CD3γ (gama), CD3δ (delta), và CD3ε (epsilon) là các protein trên bề mặt tế bào có quan hệ mật thiết với nhau của siêu họ globulin miễn

dịch chứa một vùng globulin miễn dịch ngoại bào. Các đuôi nội bào của các phân tử CD3 chứa một motip được bảo toàn được biết đến là motip hoạt hóa dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch hoặc gọi tắt là ITAM, mà cần cho việc tiếp nhận tín hiệu của TCR. Phân tử CD3 epsilon là một polypeptit mà ở người được mã hóa bởi gen *CD3E* nằm trên nhiễm sắc thể 11. Epitop được ưu tiên nhất của CD3 epsilon nằm ở các gốc axit amin 1-27 của vùng ngoại bào CD3 epsilon của người. Dự tính rằng các cấu trúc kháng thể theo sáng chế thường và thuận lợi thể hiện ít sự hoạt hóa tế bào T không đặc hiệu, điều này là không mong muốn trong liệu pháp miễn dịch đặc hiệu. Điều này nghĩa là nguy cơ tác dụng phụ giảm.

Việc phân giải có chuyển hướng các tế bào đích nhờ việc tuyển chọn các tế bào T bởi cấu trúc kháng thể đa đặc hiệu, ít nhất đặc hiệu kép có liên quan đến sự tạo thành và phân phối perforin và granzym trong hệ khớp thần kinh phá hủy tế bào. Các tế bào T liên hợp có khả năng phân giải tế bào đích liên tiếp, và không bị ảnh hưởng bởi các cơ chế thoát miễn dịch can thiệp vào sự trình diện và xử lý kháng nguyên peptit, hoặc sự biệt hóa dòng tế bào T; xem, ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO 2007/042261.

Tính độc tế bào qua trung gian cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể được đánh giá bằng nhiều cách khác nhau. Các tế bào hiệu ứng có thể là các tế bào T dương tính CD8 được làm giàu (của người) được kích thích hoặc các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (của người) không được kích thích (peripheral blood mononuclear cell-PBMC). Nếu các tế bào đích có nguồn gốc từ khỉ hoặc biểu hiện hoặc được chuyển nhiễm BCMA khỉ mà được liên kết bởi vùng thứ nhất, thì các tế bào hiệu ứng cũng cần có nguồn gốc từ khỉ như dòng tế bào T khỉ, ví dụ 4119LnPx. Các tế bào đích nên biểu hiện (ít nhất vùng ngoại bào của) BCMA, ví dụ BCMA của người hoặc của khỉ. Các tế bào đích có thể là dòng tế bào (như CHO) mà được chuyển nhiễm ổn định hoặc tạm thời BCMA, ví dụ BCMA người hoặc khỉ. Theo cách khác, các tế bào đích có thể là dòng tế bào biểu hiện tự nhiên dương tính BCMA, như dòng tế bào đa u tủy xương L363 hoặc NCI-H929 của người. Các giá trị EC_{50} thông thường được cho là thấp hơn ở các dòng tế bào đích biểu hiện BCMA với lượng lớn trên bề mặt tế bào. Tỷ lệ tế bào hiệu ứng so với tế bào đích (E:T) thường bằng 10:1, nhưng cũng có thể khác. Hoạt tính độc tế bào của cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 có thể được đánh giá trong thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr (thời gian ủ là khoảng 18 giờ) hoặc trong thử nghiệm về tính độc tính tế bào dựa trên FACS (thời gian ủ là khoảng 48 giờ). Cũng có thể thay đổi thời gian ủ của thử nghiệm (phản

ứng độc tế bào). Các phương pháp khác đánh giá tính độc tế bào là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các thử nghiệm MTT hoặc MTS, các thử nghiệm dựa trên ATP bao gồm các thử nghiệm phát quang sinh học, thử nghiệm sulforhodamin B (SRB), thử nghiệm WST, thử nghiệm tạo dòng và công nghệ ECIS.

Tốt hơn là, hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 theo sáng chế được đánh giá trong thử nghiệm về tính độc tế bào trên cơ sở tế bào. Hoạt tính gây độc tế bào cũng có thể được đánh giá trong thử nghiệm giải phóng ^{51}Cr. Hoạt tính này được thể hiện bởi giá trị EC_{50}, mà tương ứng với một nửa nồng độ hữu hiệu tối đa (nồng độ của cấu trúc kháng thể mà gây ra đáp ứng độc tế bào ở mức bằng nửa mức cơ bản và mức tối đa). Tốt hơn là, giá trị EC_{50} của cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 là ≤5000 pM hoặc ≤4000 pM, tốt hơn nữa là ≤3000 pM hoặc ≤2000 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤1000 pM hoặc ≤500 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤400 pM hoặc ≤300 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤200 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤100 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤50 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤20 pM hoặc ≤10 pM, và tốt nhất là ≤5 pM.

Các giá trị EC_{50} nêu trên có thể được đo trong các thử nghiệm khác nhau. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng giá trị EC_{50} có thể được cho là thấp hơn nếu các tế bào T $CD8^+$ được làm giàu/được kích thích được sử dụng làm các tế bào hiệu ứng, so với PBMC không được kích thích. Hơn nữa được cho rằng các giá trị EC_{50} thấp hơn nếu các tế bào đích biểu hiện số BCMA cao hơn so với chuột cống biểu hiện đích ít hơn. Ví dụ, nếu các tế bào T $CD8^+$ của người được làm giàu/được kích thích được sử dụng làm các tế bào hiệu ứng (và các tế bào được chuyển nhiễm BCMA như các tế bào CHO hoặc các dòng tế bào của người dương tính BCMA được sử dụng làm các tế bào đích), tốt hơn là giá trị EC_{50} của cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 ≤1000 pM, tốt hơn nữa là ≤500 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤250 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤100 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤50 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤10 pM, và tốt nhất là ≤5 pM. Nếu các PBMC của người được sử dụng làm các tế bào hiệu ứng, tốt hơn là giá trị EC_{50} của cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 là ≤5000 pM hoặc ≤4000 pM (cụ thể là nếu các tế bào đích là các dòng tế bào của người dương tính BCMA), tốt hơn nữa là ≤2000 pM (cụ thể là nếu các tế bào đích là các tế bào được chuyển nhiễm BCMA như tế bào CHO), tốt hơn nữa là ≤1000 pM hoặc ≤500 pM, thậm

chí tốt hơn nữa là ≤200 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤150 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤100 pM, và tốt nhất là ≤50 pM, hoặc thấp hơn. Nếu dòng tế bào T khỉ như LnPx4119 được sử dụng làm tế bào hiệu ứng, và dòng tế bào được chuyển nhiễm BCMA của khỉ như các tế bào CHO được sử dụng làm dòng tế bào đích, tốt hơn là giá trị EC_{50} của cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 là ≤2000pM hoặc ≤1500pM, tốt hơn nữa là ≤1000 pM hoặc ≤500 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤300 pM hoặc ≤250 pM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤100 pM, và tốt nhất là ≤50 pM.

Tốt hơn là, cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 theo sáng chế không cảm ứng/gây ra sự phân giải hoặc gần như không cảm ứng/gây ra sự phân giải các tế bào âm tính BCMA như các tế bào CHO, hoặc các tế bào HL60, MES-SA, hoặc SNU-16. Thuật ngữ "không cảm ứng sự phân giải", "gần như không cảm ứng sự phân giải", "không gây ra sự phân giải" hoặc "gần như không gây ra sự phân giải" có nghĩa là cấu trúc kháng thể theo sáng chế không cảm ứng hoặc gây ra sự phân giải quá 30%, tốt hơn là không quá 20%, tốt hơn nữa là không quá 10%, đặc biệt tốt hơn là không quá 9%, 8%, 7%, 6% hoặc 5% tế bào âm tính BCMA, nhờ đó mức phân giải dòng tế bào người dương tính BCMA được đặt bằng 100%. Điều này thường áp dụng cho nồng độ của cấu trúc kháng thể lên đến 500nM. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết cách đánh giá sự phân giải tế bào mà không cần tiến hành thêm. Hơn nữa là, bản mô tả theo sáng chế đưa ra hướng dẫn cụ thể về cách đánh giá sự phân giải tế bào.

Độ chênh lệch về hoạt tính gây độc tế bào giữa phân tử đồng dạng dạng monome và dime của từng cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 được dùng để chỉ là "khoảng cách hiệu lực". Khoảng cách hiệu lực này có thể được tính toán là tỷ lệ giữa giá trị EC_{50} của dạng dime và monome của phân tử này. Tốt hơn là khoảng cách hiệu lực của cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 theo sáng chế là ≤ 5, tốt hơn nữa là ≤ 4, thậm chí tốt hơn nữa là ≤ 3, thậm chí tốt hơn nữa là ≤ 2 và tốt nhất là ≤ 1.

Tốt hơn là, (các) vùng liên kết thứ nhất và/hoặc thứ hai (hoặc vùng khác bất kỳ) của cấu trúc kháng thể theo sáng chế là đặc hiệu chéo loài đối với các thành viên của bộ động vật linh trưởng thuộc giới động vật có vú. Các vùng liên kết CD3 đặc hiệu chéo loài, ví dụ, được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2008/119567. Theo một phương án, vùng liên kết thứ nhất và/hoặc thứ hai, ngoài việc liên kết với BCMA của người và CD3 của người, tương ứng, cũng sẽ liên kết với BCMA/CD3 của động vật linh trưởng bao gồm (nhưng không chỉ giới hạn ở) các động vật linh trưởng thế giới mới (như *Callithrix*

jacchus, *Saguinus Oedipus* hoặc *Saimiri sciureus*), các động vật linh trưởng thế giới cổ xưa (như khỉ đầu chó và khỉ), vượn, và *homininae* không phải người.

Theo một phương án của cấu trúc kháng thể theo sáng chế, vùng liên kết thứ nhất liên kết với BCMA của người và còn liên kết với BCMA của khỉ, như BCMA của *Macaca fascicularis*, và tốt hơn là với BCMA của khỉ được biểu hiện trên bề mặt tế bào khỉ. Tốt hơn là, ái lực của vùng liên kết thứ nhất với BCMA, tốt hơn là với BCMA người, tốt hơn là ≤100 nM hoặc ≤50 nM, tốt hơn nữa là ≤25 nM hoặc ≤20 nM, tốt hơn nữa là ≤15 nM hoặc ≤10 nM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤5 nM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤2,5 nM hoặc ≤2 nM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤1 nM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤0,6 nM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤0,5 nM, và tốt nhất là ≤0,4 nM. Ví dụ, ái lực này có thể được xác định theo thử nghiệm BIAcore hoặc theo thử nghiệm Scatchard. Các phương pháp khác để xác định ái lực cũng được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình. Tốt hơn là, ái lực của vùng liên kết thứ nhất với BCMA khỉ ≤15 nM, tốt hơn nữa là ≤10 nM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤5 nM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤1 nM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤0,5nM, thậm chí tốt hơn nữa là ≤0,1 nM, và tốt nhất là ≤0,05 nM hoặc thậm chí ≤0,01 nM.

Tốt hơn là, khoảng cách ái lực của cấu trúckháng thể theo sáng chế để liên kết với BCMA khỉ so với BCMA của người [ma BCMA:hu BCMA] (như được xác định, ví dụ bằng phân tích BiaCore hoặc bằng phân tích Scatchard) là <100, tốt hơn là <20, tốt hơn nữa là <15, tốt hơn nữa là <10, thậm chí tốt hơn nữa là <8, tốt hơn nữa là <6 và tốt nhất là <2. Khoảng được ưu tiên của khoảng cách ái lực của các cấu trúc kháng thể theo sáng chế để liên kết với BCMA của khỉ so với BCMA của người là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,2 đến 10, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,3 đến 6, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 3 hoặc nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,5, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2 hoặc nằm trong khoảng từ 0,6 đến 2.

Vùng liên kết thứ hai của cấu trúc kháng thể theo sáng chế liên kết với CD3 epsilon của người và/hoặc với CD3 epsilon của khỉ *Macaca*. Theo một phương án được ưu tiên, vùng liên kết thứ hai còn liên kết với CD3 epsilon của *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* hoặc *Saimiri sciureus*. *Callithrix jacchus và Saguinus oedipus* đều là động vật linh trưởng thế giới mới thuộc họ *Callitrichidae*, trong khi đó *Saimiri sciureus* là một động vật linh trưởng thế giới mới thuộc họ *Cebidae*.

Được ưu tiên đối với cấu trúc kháng thể theo sáng chế mà vùng liên kết thứ hai liên kết với epitop ngoại bào của chuỗi CD3ε của người và/hoặc chuỗi CD3ε của khỉ *Macaca* chứa vùng VL bao gồm CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 được chọn từ:

(a) CDR-L1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 27 của WO 2008/119567, CDR-L2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 28 của WO 2008/119567 và CDR-L3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 29 của WO 2008/119567;

(b) CDR-L1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 117 của WO 2008/119567, CDR-L2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 118 của WO 2008/119567 và CDR-L3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 119 của WO 2008/119567; và

(c) CDR-L1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 153 của WO 2008/119567, CDR-L2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 154 của WO 2008/119567 và CDR-L3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 155 của WO 2008/119567.

[1] Theo một phương án được ưu tiên khác của cấu trúc kháng thể theo sáng chế, vùng liên kết thứ hai liên kết với epitop ngoại bào của chuỗi CD3ε của người và/hoặc chuỗi CD3ε của khỉ *Macaca* chứa vùng VH bao gồm CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 được chọn từ:

(a) CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 12 của WO 2008/119567, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 13 của WO 2008/119567 và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 14 của WO 2008/119567;

(b) CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 30 của WO 2008/119567, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 31 của WO 2008/119567 và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 32 của WO 2008/119567;

(c) CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 48 của WO 2008/119567, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 49 của WO 2008/119567 và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 50 của WO 2008/119567;

(d) CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 66 của WO 2008/119567, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 67 của WO 2008/119567 và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 68 của WO 2008/119567;

(e) CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 84 của WO 2008/119567, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 85 của WO 2008/119567 và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 86 của WO 2008/119567;

(f) CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 102 của WO 2008/119567, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 103 của WO 2008/119567 và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 104 của WO 2008/119567;

(g) CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 120 của WO 2008/119567, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 121 của WO 2008/119567 và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 122 của WO 2008/119567;

(h) CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 138 của WO 2008/119567, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 139 của WO 2008/119567 và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 140 của WO 2008/119567;

(i) CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 156 của WO 2008/119567, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 157 của WO 2008/119567 và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 158 của WO 2008/119567; và

(j) CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 174 của WO 2008/119567, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 175 của WO 2008/119567 và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 176 của WO 2008/119567.

Theo một phương án được ưu tiên về cấu trúc kháng thể theo sáng chế, ba nhóm VL CDR nêu trên được kết hợp với mười nhóm VH CDR nêu trên trong vùng liên kết thứ hai để tạo thành (30) nhóm, mỗi nhóm chứa CDR-L 1-3 và CDR-H 1-3.

Được ưu tiên đối với cấu trúc kháng thể theo sáng chế mà vùng liên kết thứ hai liên kết với CD3 chứa vùng VL được chọn từ nhóm gồm có vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 17, 21, 35, 39, 53, 57, 71, 75, 89, 93, 107, 111, 125, 129, 143, 147, 161, 165, 179 hoặc 183 của WO 2008/119567 hoặc như được mô tả trong SEQ ID NO: 13.

Cũng được ưu tiên là vùng liên kết thứ hai liên kết với CD3 chứa vùng VH được chọn từ nhóm gồm có vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 hoặc 181 của WO 2008/119567 hoặc như được mô tả trong SEQ ID NO: 14.

Tốt hơn nữa là, cấu trúc kháng thể theo sáng chế được đặc trưng bởi vùng liên kết thứ hai liên kết với CD3 chứa vùng VL và vùng VH được chọn từ nhóm gồm có:

(a) vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 17 hoặc 21 của WO 2008/119567 và vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 15 hoặc 19 của WO 2008/119567;

(b) vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 35 hoặc 39 của WO 2008/119567 và vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 33 hoặc 37 của WO 2008/119567;

(c) vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 53 hoặc 57 của WO 2008/119567 và vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 51 hoặc 55 của WO 2008/119567;

(d) vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 71 hoặc 75 của WO 2008/119567 và vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 69 hoặc 73 của WO 2008/119567;

(e) vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 89 hoặc 93 của WO 2008/119567 và vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 87 hoặc 91 của WO 2008/119567;

(f) vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 107 hoặc 111 của WO 2008/119567 và vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 105 hoặc 109 của WO 2008/119567;

(g) vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 125 hoặc 129 của WO 2008/119567 và vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 123 hoặc 127 của WO 2008/119567;

(h) vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 143 hoặc 147 của WO 2008/119567 và vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 141 hoặc 145 của WO 2008/119567;

(i) vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 161 hoặc 165 của WO 2008/119567 và vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 159 hoặc 163 của WO 2008/119567;và

(j) vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 179 hoặc 183 của WO 2008/119567 và vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 177 hoặc 181 của WO 2008/119567.

Cũng được ưu tiên đối với cấu trúc kháng thể theo sáng chế là vùng liên kết thứ hai liên kết với CD3 chứa vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 13 và vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 14.

Theo một phương án được ưu tiên về cấu trúc kháng thể theo sáng chế, vùng liên kết thứ nhất và/hoặc vùng liên kết thứ hai có dạng sau: các cặp vùng VH và vùng VL là ở dạng kháng thể chuỗi đơn (scFv). Các vùng VH và VL được bố trí theo thứ tự VH-VL hoặc

VL-VH. Được ưu tiên là vùng VH được bố trí ở đầu tận cùng N của trình tự liên kết, và vùng VL được bố trí ở đầu tận cùng C của trình tự liên kết.

Một phương án được ưu tiên của cấu trúc kháng thể theo sáng chế được mô tả trên đây được đặc trưng bởi vùng liên kết thứ hai liên kết với CD3 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 hoặc 187 của WO 2008/119567 hoặc như được mô tả trong SEQ ID NO: 15.

Cũng dự tính rằng vùng liên kết thứ nhất của cấu trúc kháng thể theo sáng chế chứa vùng VL chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3, và vùng VH chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-3 được chọn từ nhóm gồm có:

(a) CDR-L1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 48, CDR-L2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 49, CDR-L3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 50, CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 45, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 46, và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 47;

(b) CDR-L1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 66, CDR-L2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 67, CDR-L3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 68, CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 63, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 64, và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 65; và

(c) CDR-L1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 84, CDR-L2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 85, CDR-L3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 86, CDR-H1 như được mô tả trong SEQ ID NO: 81, CDR-H2 như được mô tả trong SEQ ID NO: 82, và CDR-H3 như được mô tả trong SEQ ID NO: 83.

[2] Cũng dự tính rằng vùng liên kết thứ nhất của cấu trúc kháng thể theo sáng chế chứa vùng VH và vùng VL được chọn từ nhóm gồm có:

(a) vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 51 và vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 52;

(b) vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 57 và vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 58;

(c) vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 69 và vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 70;

(d) vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 75 và vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 76;

(e) vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 87 và vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 88; và

(f) vùng VH như được mô tả trong SEQ ID NO: 93 và vùng VL như được mô tả trong SEQ ID NO: 94.

[3] Cũng dự tính rằng vùng liên kết thứ nhất của cấu trúc kháng thể theo sáng chế chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 53, 59, 71, 77, 89 hoặc 95.

Các cải biến cộng hóa trị của các cấu trúc kháng thể cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế, và nói chung, nhưng không phải lúc nào cũng vậy, được tiến hành sau dịch mã. Ví dụ, một vài loại cải biến cộng hóa trị của cấu trúc kháng thể được đưa vào phân tử bằng cách cho các gốc axit amin cụ thể của cấu trúc kháng thể phản ứng với chất tạo dẫn xuất hữu cơ mà có khả năng phản ứng với các chuỗi bên được chọn hoặc các gốc đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C.

Các gốc xysteinyl thường phản ứng với α-haloaxetat (và các amin tương ứng), như axit cloroaxetic hoặc cloroaxetamit, để thu được các dẫn xuất carboxymetyl hoặc carboxyamidometyl. Các gốc xysteinyl cũng được tạo dẫn xuất bằng cách phản ứng với bromotrifloaxeton, axit α-bromo-β-(5-imidozoyl)propionic, cloroaxetyl phosphat, N-alkylmaleimit, 3-nitro-2-pyridyl disulfua, metyl 2-pyridyl disulfua, p-cloromercuribenzoat, 2-cloromercuri-4-nitrophenol, hoặc cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Các gốc histidyl được tạo dẫn xuất bằng cách phản ứng với dietylpyrocacbonat ở pH = 5,5-7,0 vì tác nhân này tương đối đặc hiệu với chuỗi bên có histidyl. Para-bromophenaxyl bromua cũng hữu dụng; tốt hơn là phản ứng này được tiến hành trong 0,1M natri cacodylat ở pH = 6,0. Các gốc lysinyl và các gốc đầu amino được phản ứng với sucxinic hoặc các anhydrit của axit carboxylic khác. Quy trình tạo dẫn xuất với các tác nhân này có tác dụng làm đảo ngược điện tích của các gốc lysinyl. Các tác nhân thích hợp khác để tạo dẫn xuất các gốc chứa alpha-amino bao gồm imidoeste như metyl picolinimidat; pyridoxal phosphat; pyridoxal; cloroborohydrua; axit trinitrobenzensulfonic; O-metylisoure; 2,4-pentandion; và phản ứng với glyoxylat được xúc tác bởi transaminaza.

Các gốc arginyl được cải biến bằng phản ứng với một hoặc một vài tác nhân thông thường, trong số các tác nhân này là phenylglyoxal, 2,3-butandion, 1,2-xyclohexandion, và ninhydrin. Việc tạo dẫn xuất các gốc arginin đòi hỏi phản ứng phải được tiến hành trong các điều kiện kiềm do nhóm chức guanidin có pKa cao. Hơn nữa, các tác nhân này có thể phản ứng với các nhóm lysin cũng như là nhóm epsilon-amino arginin.

Có thể tiến hành cải biến riêng các gốc tyrosyl, trong đó đặc biệt ưu tiên đưa các phân tử đánh dấu phổ vào các gốc tyrosyl bằng cách phản ứng với các hợp chất diazoni thơm hoặc tetranitrometan. Thông thường nhất là, N-axetylimidizol và tetranitrometan được sử dụng để tạo ra các nhóm O-axetyl tyrosyl và các dẫn xuất 3-nitro, tương ứng. Các gốc tyrosyl được iot hóa bằng cách sử dụng ^{125}I hoặc ^{131}I để điều chế các protein được đánh dấu để dùng trong thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, phương pháp sử dụng cloramin T được mô tả trên đây là thích hợp.

Các nhóm bên carboxyl (aspartyl hoặc glutamyl) được cải biến chọn lọc bằng phản ứng với carbodiimit (R'—N=C=N--R'), trong đó R và R' tùy ý là các nhóm alkyl khác nhau, như 1-xyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-etyl) carbodiimit hoặc 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetylpentyl) carbodiimit. Hơn nữa, các gốc aspartyl và glutamyl được chuyển hóa thành các gốc asparaginyl và glutaminyl bằng phản ứng với ion amoni.

Việc tạo dẫn xuất bằng các chất có chức năng kép là hữu dụng để liên kết ngang cấu trúc kháng thể theo sáng chế với nền mang hoặc bề mặt không tan trong nước để dùng trong nhiều phương pháp khác nhau. Các chất liên kết ngang thường được sử dụng bao gồm, *ví dụ*, các este 1,1-bis(diazoaxetyl)-2-phenyletan, glutaraldehyt, N-hydroxysucxinimit, ví dụ, các este với axit 4-azidosalixylic, imidoeste đồng chức năng kép bao gồm các este disucxinimidyl như 3,3'-dithiobis(sucxinimidylpropionat), và maleimit chức năng kép như bis-N-maleimido-1,8-octan. Các chất tạo dẫn xuất như metyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat tạo ra các chất trung gian quang hoạt mà có khả năng tạo các liên kết ngang khi có ánh sáng. Theo cách khác, nền phản ứng không tan trong nước như carbohydrat được hoạt hóa bởi xyanogen bromua và các cơ chất phản ứng như được mô tả trong các patent Mỹ số 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; và 4,330,440 được sử dụng để cố định protein.

Các gốc glutaminyl và asparaginyl thường được loại nhóm amit thành các gốc glutamyl và aspartyl tương ứng. Theo cách khác, các gốc này được loại amit trong các điều kiện axit nhẹ. Dạng các gốc này là thuộc phạm vi của sáng chế.

Các cải biến khác bao gồm hydroxyl hóa prolin và lysin, phosphoryl hóa các nhóm hydroxyl của các gốc seryl hoặc threonyl, metyl hóa các nhóm α-amino của các chuỗi bên lysin, arginin, và histidin (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, các trang 79-86), axetyl hóa amin ở đầu N, và amit hóa nhóm carboxyl ở đầu tận cùng C.

Một loại cải biến cộng hóa trị khác của cấu trúc kháng thể được bao gồm trong phạm vi sáng chế là làm thay đổi kiểu glycosyl hóa protein. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, các kiểu glycosyl hóa có thể phụ thuộc vào cả trình tự của protein (*ví dụ*, sự có mặt hoặc không có mặt của các gốc axit amin glycosyl hóa cụ thể, được bàn luận dưới đây), hoặc tế bào hoặc sinh vật chủ trong đó protein được tổng hợp. Các hệ biểu hiện cụ thể được bàn luận dưới đây.

Glycosyl hóa polypeptit thường là loại được liên kết với N hoặc được liên kết với O. Loại liên kết với N được dùng để chỉ việc liên kết gốc carbohydrat với chuỗi bên của gốc asparagin. Các trình tự tri-peptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là các trình tự nhận diện để liên kết gốc cacbohydrat với chuỗi bên asparagin nhờ enzym. Do đó, sự có mặt của một trong hai trình tự tri-peptit này trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Loại glycosyl hóa được liên kết với O được dùng để chỉ việc liên kết một trong số các đường N-axetylgalactosamin, galactoza, hoặc xyloza, với axit hydroxyamino, thông thường nhất là serin hoặc threonin, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin có thể cũng được sử dụng.

Việc bổ sung các vị trí glycosyl hóa vào cấu trúc kháng thể được tiến hành thuận tiện bằng cách làm thay đổi trình tự axit amin sao cho nó chứa một hoặc nhiều trình tự tri-peptit được mô tả trên đây (đối với các vị trí glycosyl hóa được liên kết với N). Cũng có thể tiến hành thay đổi bằng cách bổ sung, hoặc thay thế, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin trong trình tự ban đầu (đối với các vị trí glycosyl hóa được liên kết với O). Để thuận tiện hơn, tốt hơn là trình tự axit amin của cấu trúc kháng thể được làm thay đổi nhờ các thay đổi ở cấp độ ADN, đặc biệt là bằng cách gây đột biến ADN mã hóa polypeptit ở

các bazơ đã chọn trước sao cho các codon được tạo ra sẽ dịch mã thành axit amin mong muốn.

Phương pháp khác để làm tăng số gốc cacbohydrat trên cấu trúc kháng thể là liên kết các glycozit với protein nhờ phản ứng hóa học hoặc phản ứng có xúc tác enzym. Các quy trình này có ưu điểm ở chỗ không cần tổng hợp protein trong tế bào chủ mà có khả năng glycosyl hóa đối với glycosyl hóa được liên kết với N hoặc với O. Tùy thuộc vào kiểu liên kết được sử dụng, (các) đường có thể được gắn với (a) arginin và histidin, (b) các nhóm carboxyl tự do, (c) các nhóm sulfhydryl tự do như các nhóm gồm xystein, (d) các nhóm hydroxyl tự do như các nhóm gồm serin, threonin, hoặc hydroxyprolin, (e) các gốc thơm như các gốc thơm gồm phenylalanin, tyrosin, hoặc tryptophan, hoặc (f) nhóm amit của glutamin. Các phương pháp này được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 87/05330, và trong tài liệu Aplin và Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., các trang 259-306.

Việc loại bỏ các gốc cacbohydrat có mặt trên cấu trúc kháng thể ban đầu có thể được thực hiện bằng phương pháp hóa học hoặc bằng phương pháp sử dụng enzym. Loại glycosyl hóa học đòi hỏi protein phải tiếp xúc với hợp chất axit triflorometansulfonic, hoặc hợp chất tương đương. Việc xử lý này dẫn đến phân cắt hầu hết hoặc toàn bộ các đường ngoại trừ đường liên kết (N-axetylglucosamin hoặc N-axetylgalactosamin), đồng thời tạo ra polypeptit nguyên vẹn. Loại glycosyl hóa học được mô tả trong tài liệu Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 và Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. Phân cắt các gốc cacbohydrat bằng enzym trên polypeptit có thể được thực hiện bằng cách sử dụng nhiều glycosidaza nội sinh và ngoại sinh như được mô tả bởi tài liệu Thotakura *et al.*, 1987, Meth. Enzymol.138:350. Glycosyl hóa ở các vị trí glycosyl hóa tiềm năng có thể được ngăn ngừa bằng cách sử dụng hợp chất tunicamyxin như được mô tả trong tài liệu Duskin *et al.*, 1982, J. Biol. Chem.257:3105. Tunicamyxin phong bế sự tạo thành các liên kết protein-N-glycozit.

Các cải biến khác của cấu trúc kháng thể cũng được mô tả ở đây. Ví dụ, một loại cải biến cộng hóa trị khác của cấu trúc kháng thể là liên kết cấu trúc kháng thể với các polyme không protein khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyol khác nhau như polyetylen glycol, polypropylen glycol, polyoxyalkylen, hoặc copolyme của polyetylen glycol và polypropylen glycol, theo cách như nêu trong patent Mỹ số 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 hoặc 4,179,337. Ngoài ra, như

đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, có thể tiến hành các thay thế axit amin ở các vị trí khác nhau trong cấu trúc kháng thể, ví dụ để tạo điều kiện thuận lợi cho việc bổ sung các polyme như PEG.

Theo một vài phương án, việc cải biến cộng hóa trị cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm thêm một hoặc nhiều phân tử đánh dấu. Nhóm đánh dấu có thể được liên kết với cấu trúc kháng thể nhờ các nhánh đệm có chiều dài khác nhau để làm giảm sự cản trở trong không gian tiềm ẩn. Các phương pháp khác nhau để đánh dấu protein là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế. Thuật ngữ "phân tử đánh dấu" hoặc "nhóm đánh dấu" được dùng để chỉ phân tử đánh dấu dễ phát hiện bất kỳ. Nói chung, các phân tử đánh dấu được chia thành nhiều loại khác nhau, tùy thuộc vào thử nghiệm trong đó chúng được phát hiện –ví dụ về các phân tử đánh dấu dưới đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở:

a) các phân tử đánh dấu đồng vị, mà có thể là các đồng vị phóng xạ hoặc nặng, như các đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ (*ví dụ*, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{89}Zr, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I)

b) các phân tử đánh dấu có từ tính (*ví dụ,* các hạt từ)

c) các gốc có hoạt tính oxy hóa khử

d) các thuốc nhuộm quang học (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm mang màu, các chất phát quang và nhóm huỳnh quang) như các nhóm huỳnh quang (*ví dụ*, các chất phát quang FITC, rodamin, lantanit), các nhóm phát quang hóa học, và nhóm huỳnh quang mà có thể là nhóm huỳnh quang "phân tử nhỏ" hoặc nhóm huỳnh quang có protein

e) các nhóm enzym (*ví dụ* peroxidaza cây củ cải cay, β-galactosidaza, luxiferaza, phosphataza kiềm)

f) các nhóm được biotinyl hóa

g) các epitop polypeptit được xác định trước được nhận diện bởi các phân tử thông báo thứ cấp (*ví dụ*, các trình tự bắt cặp của vùng khóa kéo leuxin, các vị trí liên kết cho kháng thể thứ cấp, các vùng liên kết kim loại, các đuôi epitop, v.v.)

Thuật ngữ "phân tử đánh dấu huỳnh quang" có nghĩa là phân tử bất kỳ mà có thể được phát hiện nhờ các đặc tính huỳnh quang vốn có. Các phân tử đánh dấu huỳnh quang thích

hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, floresxein, rodamin, tetrametylrodamin, eosin, erythrosin, cumarin, metyl-cumarin, pyren, Xanh malacit, stilben, Vàng luxifer, Xanh Cascade, Đỏ Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, xanh lá cây Oregon, các thuốc nhuộm Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Xanh Cascade, Vàng Cascade và R-phycoerythrin (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rodamin, và Đỏ Texas (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Các thuốc nhuộm quang học thích hợp, bao gồm nhóm huỳnh quang, được mô tả trong sổ tay hướng dẫn các mẫu dò phân tử của Richard P. Haugland.

Các phân tử đánh dấu huỳnh quang có protein thích hợp cũng được bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein huỳnh quang xanh lá cây, bao gồm các loài Renilla, Ptilosarcus, hoặc Aequorea có GFP (Chalfie *et al.*, 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., số đăng ký ngân hàng gen U55762), protein huỳnh quang xanh da trời (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim *et al.*, 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), protein huỳnh quang vàng được tăng cường (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luxiferaza (Ichiki *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β galactosidaza (Nolan *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) và Renilla (công bố đơn quốc tế số WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, Patent Mỹ số 5,292,658; 5,418,155; 5,683,888; 5,741,668; 5,777,079; 5,804,387; 5,874,304; 5,876,995; 5,925,558).

Cấu trúc kháng thể theo sáng chế cũng có thể chứa các vùng khác, mà *ví dụ* hữu dụng để phân lập phân tử này hoặc có liên quan đến profin dược động học thích hợp của phân tử này. Các vùng hữu dụng để phân lập cấu trúc kháng thể có thể được chọn từ các motip peptit hoặc các gốc được đưa vào thứ cấp, mà có thể được giữ lại trong phương pháp phân lập, ví dụ cột phân lập. Các phương án không giới hạn về các vùng khác này bao gồm các motip peptit được biết đến là đuôi Myc, đuôi HAT, đuôi HA, đuôi TAP, đuôi GST, vùng liên kết chitin (đuôi CBD), protein liên kết maltoza (đuôi MBP), đuôi Flag, đuôi Strep và các biến thể của chúng (ví dụ đuôi StrepII) và đuôi His. Toàn bộ các cấu trúc kháng thể được mô tả ở đây có thể chứa vùng đuôi His, mà thường được biết đến là vùng lặp gồm các gốc His liên tiếp trong trình tự axit amin của phân tử, tốt hơn là gồm

năm, và tốt hơn nữa là gồm sáu gốc His (hexa-histidin). Đuôi His có thể nằm ở đầu tận cùng N hoặc C của cấu trúc kháng thể chẳng hạn, tốt hơn là nằm ở đầu tận cùng C. Tốt nhất là, đuôi hexa-histidin (HHHHHH) (SEQ ID NO: 16) được liên kết với đầu tận cùng C của cấu trúc kháng thể theo sáng chế nhờ liên kết peptit. Ngoài ra, hệ tiếp hợp của PLGA-PEG-PLGA có thể được kết hợp với đuôi poly-histidin cho ứng dụng giải phóng kéo dài và profin dược động học cải thiện.

Các cải biến trình tự axit amin của các cấu trúc kháng thể được mô tả ở đây cũng được mô tả. Ví dụ, có thể mong muốn cải thiện ái lực liên kết và/hoặc các đặc tính sinh học khác của cấu trúc kháng thể. Các biến thể trình tự axit amin của cấu trúc kháng thể được tạo ra bằng cách tiến hành các thay đổi nucleotit thích hợp trong axit nucleic của cấu trúc kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Tất cả các cải biến trình tự axit amin được mô tả dưới đây sẽ tạo ra cấu trúc kháng thể vẫn giữ lại được hoạt tính sinh học mong muốn (liên kết với BCMA và với CD3) của phân tử gốc không được cải biến.

Thuật ngữ "axit amin" hoặc "gốc axit amin" thường được dùng để chỉ axit amin có định nghĩa đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như axit amin được chọn từ nhóm gồm có: alanin (Ala hoặc A); arginin (Arg hoặc R); asparagin (Asn hoặc N); axit aspartic (Asp hoặc D); xystein (Cys hoặc C); glutamin (Gln hoặc Q); axit glutamic (Glu hoặc E); glyxin (Gly hoặc G); histidin (His hoặc H); isoleuxin (He hoặc I): leuxin (Leu hoặc L); lysin (Lys hoặc K); methionin (Met hoặc M); phenylalanin (Phe hoặc F); prolin (Pro hoặc P); serin (Ser hoặc S); threonin (Thr hoặc T); tryptophan (Trp hoặc W); tyrosin (Tyr hoặc Y); và valin (Val hoặc V), mặc dù axit amin đã cải biến, axit amin tổng hợp hoặc axit amin hiếm có thể được sử dụng nếu muốn. Nói chung, axit amin có thể được chia thành nhóm có chuỗi bên không phân cực (ví dụ, Ala, Cys, He, Leu, Met, Phe, Pro, Val); chuỗi bên mang điện tích âm (ví dụ, Asp, Glu); chuỗi bên mang điện tích dương (ví dụ, Arg, His, Lys); hoặc chuỗi bên phân cực không mang điện tích (ví dụ, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, và Tyr).

Các cải biến axit amin bao gồm, ví dụ, loại bỏ, và/hoặc thêm, và/hoặc thay thế, các gốc trong trình tự axit amin của các cấu trúc kháng thể. Tổ hợp loại bỏ, thêm và thay thế bất kỳ có thể được tiến hành để thu được cấu trúc cuối cùng, miễn là cấu trúc cuối cùng có các đặc tính mong muốn. Các thay đổi axit amin cũng có thể làm thay đổi các quá trình sau dịch mã của cấu trúc kháng thể, như thay đổi số hoặc vị trí của các vị trí glycosyl hóa.

Ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 axit amin có thể được thêm, được thay thế hoặc loại bỏ ở mỗi trong số các CDR (tất nhiên, phụ thuộc vào chiều dài của chúng), trong khi đó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, hoặc 25 axit amin có thể được thêm, được thay thế hoặc loại bỏ ở mỗi trong số các FR. Tốt hơn là, thêm trình tự axit amin vào cấu trúc kháng thể bao gồm dung hợp đầu amino và/hoặc đầu carboxyl đoạn có chiều dài nằm trong khoảng từ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 gốc với các polypeptit chứa một trăm hoặc nhiều hơn một trăm gốc, cũng như là việc thêm một hoặc nhiều gốc axit amin vào trong trình tự. Các cải biến tương ứng cũng có thể được thực hiện trong vùng liên kết thứ ba của cấu trúc kháng thể theo sáng chế. Biến thể dạng thêm vào của cấu trúc kháng thể theo sáng chế bao gồm dung hợp enzym với đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của cấu trúc kháng thể hoặc dung hợp với polypeptit.

Các vị trí ưu tiên nhất để gây đột biến thay thế bao gồm (nhưng không giới hạn ở) các CDR của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ, cụ thể là vùng siêu biến, nhưng các thay đổi FR trong chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng cũng được mô tả. Tốt hơn là, các axit amin thay thế là các axit amin thay thế bảo toàn được mô tả ở đây. Tốt hơn là, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin có thể được thay thế trong CDR, trong khi đó 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, hoặc 25 axit amin có thể được thay thế trong vùng khung (framework region-FR), tùy thuộc vào chiều dài của CDR hoặc FR. Ví dụ, nếu trình tự CDR bao gồm 6 axit amin, được dự tính rằng một, hai hoặc ba axit amin này được thay thế. Tương tự, nếu trình tự CDR bao gồm 15 axit amin được dự tính rằng một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu axit amin trong số các axit amin này được thay thế.

Phương pháp hữu dụng để xác định các gốc hoặc các vùng nhất định của cấu trúc kháng thể mà là các vị trí được ưu tiên để gây đột biến được gọi là "gây đột biến sàng lọc alanin" như được mô tả trong tài liệu Cunningham và Wells in Science, 244: 1081-1085 (1989). Ở đây, gốc hoặc nhóm gốc đích trong cấu trúc kháng thể được xác định (*ví dụ* các gốc mang điện như arg, asp, his, lys, và glu) và được thay thế bằng axit amin trung tính hoặc axit amin mang điện tích âm (tốt nhất là alanin hoặc polyalanin) để tác động đến sự tương tác giữa axit amin với epitop.

Sau đó, các vị trí axit amin thể hiện độ nhạy chức năng với các axit amin thay thế được sàng lọc bằng cách đưa các biến thể khác ở, hoặc đối với, các vị trí thay thế. Do đó, mặc dù vị trí hoặc vùng để biến đổi trình tự axit amin được định trước, nhưng bản chất của đột biến thực chất không cần được định trước. Ví dụ, để phân tích hoặc tối ưu hóa đặc tính

của đột biến ở vị trí nhất định, sàng lọc alanin hoặc gây đột biến ngẫu nhiên có thể được tiến hành ở vùng hoặc codon đích, và các biến thể cấu trúc kháng thể biểu hiện được sàng lọc tổ hợp tối ưu có hoạt tính mong muốn. Các kỹ thuật để tiến hành các đột biến thay thế ở vị trí tiền định trong ADN có trình tự đã biết là đã biết rõ, ví dụ, gây đột biến sử dụng đoạn mồi M13 và gây đột biến PCR. Sàng lọc các thể đột biến được tiến hành bằng cách sử dụng các thử nghiệm hoạt tính liên kết kháng nguyên, như liên kết với BCMA hoặc CD3.

Nói chung, nếu axit amin được thay thế trong một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các CDR của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ, thì được ưu tiên là trình tự "thay thế" thu được sau đó có ít nhất 60% hoặc 65%, tốt hơn nữa là 70% hoặc 75%, thậm chí tốt hơn nữa là 80% hoặc 85%, và đặc biệt tốt hơn là 90% hoặc 95% tương đồng với trình tự CDR " ban đầu". Điều này có nghĩa là tùy thuộc vào chiều dài của CDR mà quyết định mức tương đồng với trình tự "thay thế". Ví dụ, tốt hơn là CDR có 5 axit amin tương đồng 80% với trình tự thay thế của nó để có ít nhất một axit amin được thay thế. Do đó, các CDR của cấu trúc kháng thể có thể có các mức tương đồng khác nhau với các trình tự thay thế của chúng, ví dụ, CDRL1 có thể có mức tương đồng bằng 80%, trong khi đó CDRL3 có thể có 90%.

Các axit amin thay thế được ưu tiên (hoặc các axit amin thay đổi) là các axit amin thay thế bảo toàn. Tuy nhiên, axit amin thay thế bất kỳ (bao gồm axit amin thay thế không bảo toàn hoặc một hoặc nhiều axit amin từ "các axit amin thay thế được lấy làm ví dụ" được liệt kê trong bảng 3, dưới đây) được xem xét miễn là cấu trúc kháng thể vẫn có khả năng liên kết với BCMA nhờ vùng liên kết thứ nhất và với CD3 epsilon nhờ vùng liên kết thứ hai và/hoặc các CDR của nó có mức tương đồng với trình tự được thay thế sau đó (ít nhất 60% hoặc 65%, tốt hơn nữa là 70% hoặc 75%, thậm chí tốt hơn nữa là 80% hoặc 85%, và đặc biệt tốt hơn là 90% hoặc 95% tương đồng với trình tự CDR "ban đầu").

Các axit amin thay thế bảo toàn được thể hiện trong bảng 3 dưới tiêu đề "các axit amin thay thế được ưu tiên". Nếu các axit amin thay thế như vậy làm thay đổi hoạt tính sinh học, sau đó là các thay đổi lớn hơn, được gọi là "các axit amin thay thế được lấy làm ví dụ" trong bảng 3, hoặc như được mô tả thêm dưới đây dựa vào các nhóm axit amin, có thể được đưa vào và các sản phẩm được sàng lọc đặc tính mong muốn.

Bảng 3: Các axit amin thay thế

Gốc Ban đầu	Các axit amin thay thế được lấy làm ví dụ	Các axit amin thay thế được ưu tiên
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys (C)	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp, gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	leu
Leu (L)	norleucine, ile, val, met, ala	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

Các cải biến đáng kể về đặc tính sinh học của cấu trúc kháng thể theo sáng chế được tiến hành bằng cách chọn lọc các axit amin thay thế mà khác biệt đáng kể về tác dụng của chúng đến việc duy trì cấu trúc khung của polypeptit ở vùng thay thế, ví dụ, ở dạng cấu

trúc tấm hoặc cấu trúc xoắn, (b) điện tích hoặc tính kỵ nước của phân tử ở vị trí đích, hoặc (c) phần lớn chuỗi bên. Các gốc có nguồn gốc trong tự nhiên được chia thành các nhóm dựa vào các đặc tính chuỗi bên thông thường: (1) tính kỵ nước: norleuxin, met, ala, val, leu, ile; (2) tính ưa nước trung tính: cys, ser, thr, asn, gln; (3) tính axit: asp, glu; (4) tính bazơ: his, lys, arg; (5) các gốc mà tác động đến định hướng chuỗi: gly, pro; và (6) tính thơm: trp, tyr, phe.

Các axit amin thay thế không bảo toàn sẽ dẫn đến việc trao đổi thành viên của một trong số các nhóm này cho nhóm khác. Gốc xystein bất kỳ không tham gia vào việc duy trì cấu hình thích hợp của cấu trúc kháng thể có thể được thay thế, thýờng bằng serin, để cải thiện tính ổn ðịnh oxy hóa của phân tử và ngăn ngừa liên kết ngang bất thýờng. Ngýợc lại, (các) liên kết xystein có thể được bổ sung vào kháng thể ðể cải thiện ðộ ổn ðịnh của nó (ðặc biệt là khi kháng thể này là ðoạn kháng thể nhý ðoạn Fv).

Đối với trình tự axit amin, tính tương đồng và/hoặc tính đồng nhất trình tự được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thuật toán xác định tính tương đồng trình tự cục bộ nêu trong tài liệu Smith và Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, thuật toán so sánh tính tương đồng trình tự nêu trong tài liệu Needlemanvà Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, phương pháp tra cứu tính tương đồng nêu trong tài liệu Pearson và Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, các phần mềm thực hiện các thuật toán này trên máy tính (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong gói chương trình phần mềm Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), chương trình khớp trình tự tốt nhất được mô tả bởi tài liệu Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395, tốt hơn là bằng cách sử dụng các thông số cài đặt mặc định, hoặc bằng cách kiểm tra. Tốt hơn là, tỷ lệ tương đồng được tính toán bằng FastDB dựa vào các thông số sau: mức phạt bắt cặp nhầm là 1; mức phạt khoảng trống là 1; mức phạt kích thước khoảng trống là 0,33; và mức phạt liên kết là 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Ví dụ về thuật toán hữu dụng là PILEUP. PILEUP tạo ra sự sắp thẳng hàng nhiều trình tự từ một nhóm các trình tự có liên quan bằng cách sử dụng sự sắp thẳng hàng từng cặp lũy tiến. Cũng có thể vẽ sơ đồ cây thể hiện các mối quan hệ cụm được sử dụng để tạo ra sự sắp thẳng hàng. PILEUP tận dụng sự đơn giản hóa của phương pháp sắp thẳng hàng lũy

tiến nêu trong tài liệu Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; phương pháp này tương tự với phương pháp được mô tả trong trong tài liệu Higgins và Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Các thông số PILEUP hữu dụng bao gồm mức khoảng trống ngầm định là 3,00, mức chiều dài khoảng trống ngầm định là 0,10, và các khoảng trống cuối có trọng lượng.

Một ví dụ khác về thuật toán hữu dụng là thuật toán BLAST, được mô tả trong tài liệu: Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; và Karin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Chương trình BLAST đặc biệt hữu dụng là chương trình WU-BLAST-2 mà được bộc lộ trong tài liệu Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. WU-BLAST-2 sử dụng một vài thông số tìm kiếm, hầu hết các thông số này được đặt bằng các giá trị mặc định. Các thông số có thể điều chỉnh được được đặt bằng các giá trị sau: khoảng chồng lợp =1, phần chồng lợp=0,125, ngưỡng từ (T)=II. Các thông số HSP S và HSP S2 là các giá trị động lực và được thiết lập bằng chính chương trình tùy thuộc vào thành phần của trình tự cụ thể và thành phần của cơ sở dữ liệu cụ thể mà trình tự quan tâm được tra cứu; tuy nhiên các giá trị này có thể được điều chỉnh để làm tăng độ nhạy.

Thuật toán hữu dụng khác là BLAST xác định khoảng trống như được bộc lộ trong tài liệu Altschul *et al.*, 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. BLAST xác định khoảng trống sử dụng các điểm số thay thế BLOSUM-62; thông số ngưỡng T được đặt bằng 9; phương pháp giả định hai lần va chạm cực mạnh để tạo ra các đoạn kéo dài không có khoảng trống, chiều dài khoảng trống mang điện bằng k một ước lượng bằng 10+k; Xu được đặt bằng 16, và Xg được đặt bằng 40 đối với giai đoạn tìm kiếm cơ sở dữ liệu và được đặt bằng 67 đối với giai đoạn tìm kiếm đầu ra của các thuật toán. Sắp xếp thẳng hàng xác định khoảng trống được bắt đầu bằng điểm số tương ứng với 22 bit.

Nói chung, tính đồng đẳng, tính đồng nhất, hoặc tính tương đồng axit amin giữa các trình tự VH / VL hoặc các CDR biến thể riêng biệt ít nhất là 60% so với trình tự được mô tả ở đây, và thông thường hơn tốt hơn là có tính đồng đẳng hoặc tính tương đồng cao ít nhất là 65% hoặc 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 75% hoặc 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, và hầu như là 100%. Theo cách tương tự, "tỷ lệ (%) tính tương đồng trình tự axit nucleic" đối với trình tự axit nucleic của các protein liên kết được mô tả ở đây được xác định là tỷ lệ các gốc nucleotit trong trình tự dự tuyển tương đồng với các gốc nucleotit trong trình tự mã hóa của cấu

trúc kháng thể. Một phương pháp cụ thể sử dụng môđun BLASTN của WU-BLAST-2 được đặt đến các thông số mặc định, với quãng chồng lợp và phần chồng lợp được đặt bằng 1 và 0,125, tương ứng.

Nói chung, tính đồng đẳng, tính đồng nhất hoặc tính tương đồng trình tự axit nucleic giữa các trình tự nucleotit mã hóa các trình tự VH / VL hoặc các CDR biến thể riêng biệt và các trình tự nucleotit được mô tả ở đây ít nhất là 60%, và thông thường hơn có tính đồng đẳng hoặc tính tương đồng cao ít nhất là 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, và hầu như 100%. Do đó, "CDR biến thể" hoặc "vùng VH / VL biến thể" là một biến thể có tính đồng đẳng, đồng nhất hoặc tương đồng được xác định rõ với CDR / VH / VL gốc theo sáng chế, và có chung chức năng sinh học, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tính đặc hiệu và/hoặc hoạt tính của CDR hoặc VH / VL gốc.

Theo một phương án, tỷ lệ tương đồng với cấu trúc kháng thể của dòng mầm của người theo sáng chế là ≥ 70% hoặc ≥ 75%, tốt hơn nữa là ≥ 80% hoặc ≥ 85%, thậm chí tốt hơn nữa là ≥ 90%, và tốt nhất là ≥ 91%, ≥ 92%, ≥ 93%, ≥ 94%, ≥ 95% hoặc thậm chí ≥ 96%. Tính tương đồng với các sản phẩm gen dòng mầm của kháng thể người được cho là đặc điểm quan trọng để làm giảm nguy cơ các protein dùng để điều trị gây ra đáp ứng miễn dịch chống lại dược chất ở bệnh nhân trong suốt quá trình điều trị. Hwang và Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) bộc lộ rằng việc làm giảm các phần không phải của người của các cấu trúc kháng thể dược chất dẫn đến làm giảm nguy cơ gây ra tình trạng kháng thể kháng thuốc ở bệnh nhân trong quá trình điều trị. Bằng cách so sánh toàn bộ số dược chất kháng thể được đánh giá lâm sàng và dữ liệu tính miễn dịch tương ứng, đã cho thấy rằng việc làm tương thích với người vùng V của các kháng thể khiến cho protein có khả năng gây miễn dịch kém hơn (trung bình 5,1% bệnh nhân) so với các kháng thể mang vùng V không phải của người không bị thay đổi (trung bình 23,59% bệnh nhân). Do đó, mức tương đồng cao hơn với các trình tự của người là mong muốn đối với các chất điều trị protein trên cơ sở vùng V dựa trên các protein điều trị ở dạng cấu trúc kháng thể. Để xác định tính tương đồng dòng mầm này, các vùng V của VL có thể được sắp thẳng hàng với các trình tự axit amin của các đoạn V và đoạn J dòng mầm của người (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) bằng cách sử dụng

phần mềm Vector NTI và trình tự axit amin được tính toán bằng cách lấy số gốc axit amin tương đồng chia cho tổng số các gốc axit amin của VL theo phần trăm. Phần mềm này có thể áp dụng cho các đoạn VH (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) với ngoại trừ là CDR3 VH có thể được loại bỏ do tính đa dạng cao và thiếu các phần tử đối tác sắp thẳng hàng CDR3 VH dòng mầm của người hiện có. Các kỹ thuật tái tổ hợp có thể được sử dụng sau đó để làm tăng tính tương đồng trình tự với các gen dòng mầm của kháng thể người.

Cũng dự tính rằng cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 theo sáng chế (về cơ bản) không liên kết với hoặc không phản ứng chéo với BAFF-R người và/hoặc TACI người. Hơn nữa, dự tính rằng cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 theo sáng chế (về cơ bản) không liên kết với hoặc không phản ứng chéo với BAFF-R khỉ/cyno và/hoặc TACI khỉ/cyno.

Theo một phương án khác, cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có hiệu suất monome cao trong các điều kiện quy mô nghiên cứu chuẩn, *ví dụ,* trong quy trình tinh chế chuẩn gồm hai bước. Tốt hơn là, hiệu suất monome của cấu trúc kháng thể theo sáng chế là ≥ 0,25mg/L dịch nổi, tốt hơn nữa là ≥ 0,5mg/L, thậm chí tốt hơn nữa là ≥ 1 mg/L, và tốt nhất là ≥ 3 mg/L dịch nổi.

Mặt khác, hiệu suất của phân tử đồng dạng cấu trúc kháng thể dạng dime và do đó tỷ lệ monome (*tức là*, monome : (monome+dime)) của cấu trúc kháng thể có thể được xác định. Hiệu suất của các cấu trúc kháng thể dạng monome và dime và tỷ lệ monome theo tính toán có thể được tính toán ở bước tinh chế SEC dịch nổi nuôi cấy từ quy trình tổng hợp ở quy mô nghiên cứu chuẩn trong các chai lăn. Theo một phương án, tỷ lệ monome của cấu trúc kháng thể là ≥ 80%, tốt hơn nữa là ≥ 85%, thậm chí tốt hơn nữa là ≥ 90%, và tốt nhất là ≥ 95%.

Theo một phương án, cấu trúc kháng thể có tính ổn định trong huyết tương được ưu tiên (tỷ lệ giữa EC50 có huyết tương so với EC50 không có huyết tương) là ≤ 5 hoặc ≤ 4, tốt hơn nữa là ≤ 3,5 hoặc ≤ 3, thậm chí tốt hơn nữa là ≤ 2,5 hoặc ≤ 2, và tốt nhất là ≤ 1,5 hoặc ≤ 1. Độ ổn định trong huyết tương của cấu trúc kháng thể có thể được thử nghiệm bằng cách ủ cấu trúc này trong huyết tương của người ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ sau đó xác định EC50 trong thử nghiệm về tính độc tế bào giải phóng ^{51}crom. Các tế bào hiệu ứng trong thử nghiệm về tính độc tế bào có thể là các tế bào T dương tính CD8 của người

được làm giàu được kích thích. Các tế bào đích có thể là các tế bào CHO được chuyển nhiễm BCMA của người. Tỷ lệ tế bào hiệu ứng so với tế bào đích (E:T) có thể được chọn là 10:1. Vốn huyết tương của người được dùng cho mục đích này được lấy từ máu của người cho khỏe mạnh được lấy bằng các bơm tiêm đã phủ EDTA. Các thành phần tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm và pha huyết tương trên được thu gom và sau đó được gộp lại. Cấu trúc kháng thể được pha loãng ngay trước thử nghiệm về tính độc tế bào trong môi trường vòng/phútI-1640 làm đối chứng. Độ ổn định trong huyết tương được tính toán là tỷ lệ giữa EC50 (sau khi ủ trong huyết tương) so với EC50 (đối chứng).

Hơn nữa được ưu tiên rằng mức chuyển hóa dạng monome sang dime của cấu trúc kháng thể theo sáng chế là thấp. Mức chuyển hóa có thể được đánh giá trong các điều kiện khác nhau và được phân tích bằng sắc ký loại trừ theo kích thước hiệu năng cao. Ví dụ, ủ các phân tử đồng dạng monome của cấu trúc kháng thể có thể được tiến hành trong 7 ngày ở nhiệt độ 37°C và nồng độ bằng 100 µg/ml hoặc 250 µg/ml chẳng hạn trong tủ ủ. Trong các điều kiện này, được ưu tiên là cấu trúc kháng thể theo sáng chế có tỷ lệ dime ≤5%, tốt hơn nữa là ≤4%, thậm chí tốt hơn nữa là ≤3%, thậm chí tốt hơn nữa là ≤2,5%, thậm chí tốt hơn nữa là ≤2%, thậm chí tốt hơn nữa là ≤1,5%, và tốt nhất là ≤1% hoặc ≤0,5% hoặc thậm chí 0%.

Cũng được ưu tiên là cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có mức chuyển hóa thành dime rất thấp sau một số chu kỳ đông lạnh/rã đông. Ví dụ, cấu trúc kháng thể dạng monome được điều chỉnh đến nồng độ bằng 250µg/ml chẳng hạn trong dung dịch đệm bào chế chung và được tiến hành ba chu kỳ đông lạnh/rã đông (đông lạnh ở nhiệt độ -80°C trong 30 phút sau đó rã đông trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng), sau đó tiến hành SEC hiệu năng cao để xác định tỷ lệ của cấu trúc kháng thể dạng monome ban đầu, mà đã được chuyển hóa thành cấu trúc kháng thể dạng dime. Tốt hơn là, tỷ lệ cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép ở dạng dime là ≤5%, tốt hơn nữa là ≤4%, thậm chí tốt hơn nữa là ≤3%, thậm chí tốt hơn nữa là ≤2,5%, thậm chí tốt hơn nữa là ≤2%, thậm chí tốt hơn nữa là ≤1,5%, và tốt nhất là ≤1% hoặc thậm chí ≤0,5%, ví dụ sau ba chu kỳ đông lạnh/rã đông.

Tốt hơn là, cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có độ ổn định nhiệt tốt với nhiệt độ kết tụ ≥45°C hoặc ≥50°C, tốt hơn nữa là ≥52°C hoặc ≥54°C, thậm chí tốt hơn nữa là ≥56°C hoặc ≥57°C, và tốt nhất là ≥58°C hoặc ≥59°C. Thông số ổn định nhiệt có thể được xác định đối với nhiệt độ kết tụ kháng thể là như sau: Dung dịch kháng thể ở

nồng độ 250µg/ml được chuyển vào cuvet sử dụng một lần và được đặt trong thiết bị tán xạ ánh sáng động lực (Dynamic Light Scattering-DLS). Mẫu được gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 70°C ở tốc độ gia nhiệt bằng 0,5°C/phút với bán kính đo được không đổi. Bán kính tăng chứng tỏ là protein nóng chảy và mức kết tụ được dùng để tính toán nhiệt độ kết tụ của kháng thể.

Theo cách khác, đường cong nhiệt độ nóng chảy có thể được xác định bằng phép đo nhiệt lượng bằng tia quét vi phân (Differential Scanning Calorimetry-DSC) để xác định độ ổn định protein sinh lý thực chất của các cấu trúc kháng thể. Các thử nghiệm này được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị MicroCal LLC (Northampton, MA, U.S.A) VP-DSC. Mức hấp thu năng lượng của mẫu chứa cấu trúc kháng thể được ghi lại ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 90°C so với mẫu chỉ chứa dung dịch đệm bào chế. Cấu trúc kháng thể được điều chỉnh đến nồng độ cuối bằng 250µg/ml *ví dụ* trong dung dịch đệm chạy SEC. Để ghi lại đường cong nóng chảy tương ứng, toàn bộ nhiệt độ của mẫu được tăng từng bậc. Ở mỗi nhiệt độ T, mức hấp thu năng lượng của mẫu và đối chứng dung dịch đệm bào chế được ghi lại. Độ chênh lệch về mức hấp thu năng lượng Cp (kcal/mol/°C) của mẫu trừ đi mẫu đối chứng được lập đồ thị theo nhiệt độ tương ứng. Nhiệt độ nóng chảy được xác định là nhiệt độ mà tại đó đạt được mức hấp thu năng lượng tối đa thứ nhất.

Cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 theo sáng chế cũng được mô tả là có độ đục (như được đo bằng OD340 sau khi nồng độ của cấu trúc kháng thể dạng monome đã tinh chế đạt đến mức bằng 2,5mg/ml và ủ qua đêm) $\leq$ 0,2, tốt hơn là $\leq$ 0,15, tốt hơn nữa là $\leq$ 0,12, thậm chí tốt hơn nữa là $\leq$ 0,1, và tốt nhất là $\leq$ 0,08.

Theo một phương án khác, cấu trúc kháng thể theo sáng chế là ổn định ở pH sinh lý hoặc hơi thấp, tức là pH khoảng 7,4 đến 6,0. Cấu trúc kháng thể hoạt động ở pH không sinh lý như pH khoảng 6,0 mà càng dung nạp tốt thì mức thu hồi cấu trúc kháng thể được giải hấp khỏi cột trao đổi ion so với tổng lượng protein được nạp càng cao. Tốt hơn là, mức thu hồi cấu trúc kháng thể từ cột trao đổi ion (*ví dụ*, cation) ở pH khoảng 6,0 là $\geq$ 30%, tốt hơn nữa là $\geq$ 40%, tốt hơn nữa là $\geq$ 50%, thậm chí tốt hơn nữa là $\geq$ 60%, thậm chí tốt hơn nữa là $\geq$ 70%, thậm chí tốt hơn nữa là $\geq$ 80%, thậm chí tốt hơn nữa là $\geq$ 90%, thậm chí tốt hơn nữa là $\geq$ 95%, và tốt nhất là $\geq$ 99%.

Ngoài ra, được dự tính rằng cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có hiệu quả điều trị hoặc hoạt tính kháng khối u. Điều này có thể được đánh giá trong nghiên cứu như được bộc lộ trong ví dụ dưới đây về mô hình ghép ngoại lai khối u người giai đoạn tiến triển:

Vào ngày 1 của nghiên cứu, $5x10^6$ tế bào của dòng tế bào ung thư dương tính kháng nguyên tế bào đích của người (ở đây là: BCMA) được tiêm dưới da vào cạnh lưng bên phải của chuột cái NOD/SCID. Khi thể tích khối u trung bình đạt đến kích thước bằng $100mm^3$, các tế bào T dương tính CD3 của người được nhân rộng in vitro được cấy ghép vào chuột bằng cách tiêm $2x10^7$ tế bào vào khoang phúc mạc của chuột. Chuột ở nhóm đối chứng dùng chất dẫn 1 không nhận tế bào hiệu ứng và được sử dụng làm đối chứng không được cấy ghép để so sánh với nhóm đối chứng dùng chất dẫn 2 (có nhận tế bào hiệu ứng) để kiểm tra tác động của một mình tế bào T đến sự phát triển khối u. Điều trị bằng kháng thể bắt đầu khi thể tích khối u trung bình đạt đến kích thước bằng $200mm^3$. Kích thước khối u trung bình của mỗi nhóm điều trị vào ngày bắt đầu điều trị không khác biệt về mặt thống kê so với nhóm còn lại bất kỳ (phân tích phương sai). Chuột được điều trị bằng 0,5mg/kg/ngày cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3 bằng cách tiêm liều lớn qua đường tĩnh mạch trong khoảng thời gian từ 15 đến 20 ngày. Kích thước khối u được đo bằng thước kẹp trong suốt nghiên cứu và sự tiến triển kích thước khối u được đánh giá bằng cách so sánh thể tích khối u (tumor volume-TV) giữa các nhóm. Mức ức chế sự phát triển khối u T/C [%] được xác định bằng cách tính toán TV bằng công thức T/C% = 100 x (TV trung bình của nhóm được phân tích) / (TV trung bình của nhóm đối chứng 2).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết cách cải biến hoặc điều chỉnh các thông số nhất định của nghiên cứu này, như số tế bào khối u được tiêm, vị trí tiêm, số tế bào T của người được cấy ghép, lượng cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép được sử dụng, và mốc thời gian, trong khi đó vẫn thu được kết quả có ý nghĩa và lặp lại. Tốt hơn là, mức ức chế sự phát triển khối u T/C [%] là ≤ 70 hoặc ≤ 60, tốt hơn nữa là ≤ 50 hoặc ≤ 40, thậm chí tốt hơn nữa là ≤ 30 hoặc ≤ 20 và tốt nhất là ≤ 10 hoặc ≤ 5 hoặc thậm chí $\leq 2,5$.

Theo một phương án của cấu trúc kháng thể theo sáng chế, cấu trúc kháng thể là cấu trúc kháng thể chuỗi đơn.

Cũng theo một phương án của cấu trúc kháng thể theo sáng chế, vùng liên kết thứ ba nói trên bao gồm, theo thứ tự từ amin đến carboxyl:

vùng bản lề-CH2-CH3-trình tự liên kết-vùng bản lề-CH2-CH3.

Theo một phương án của sáng chế, mỗi monome polypeptit nêu trên của vùng thứ ba có một trình tự axit amin mà tương đồng ít nhất 90% với trình tự được chọn từ nhóm gồm có: SEQ ID NO: 17-24. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, mỗi monome polypeptit nêu trên có một trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 17-24.

Cũng theo một phương án của sáng chế, vùng CH2 của một hoặc tốt hơn là mỗi (cả hai) monome polypeptit của vùng thứ ba gồm cầu xystein disulfua nội vùng. Như đã biết trong lĩnh vực này, thuật ngữ "cầu xystein disulfua" dùng để chỉ nhóm chức với cấu trúc chung *R–S–S–R*. Liên kết này còn được gọi là liên kết SS hoặc cầu disulfua và thu được nhờ nối hai nhóm thiol của các gốc xystein. Đặc biệt ưu tiên đối với cấu trúc kháng thể theo sáng chế là xystein tạo thành cầu xystein disulfua trong cấu trúc kháng thể thuần thục được đưa vào trình tự axit amin của vùng CH2 tương ứng với 309 và 321 (đánh số Kabat).

Theo một phương án của sáng chế, vị trí glycosyl hóa ở vị trí 314 theo Kabat của vùng CH2 được loại bỏ. Ưu tiên rằng việc loại bỏ vị trí glycosyl hóa này được thực hiện bằng cách thay thế N314X, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ Q. Tốt hơn, nếu việc thay thế này là thay thế N314G. Theo một phương án được ưu tiên hơn, vùng CH2 này còn gồm sự thay thế V321C và R309C sau đây (vị trí theo Kabat) (các thay thế này đưa cầu xystein disulfua nội vùng ở các vị trí 309 và 321 theo Kabat vào).

Giả sử rằng các dấu hiệu được ưu tiên của cấu trúc kháng thể theo sáng chế khi so sánh với cấu trúc kháng thể heteroFc đặc hiệu kép đã biết trong lĩnh vực này (fig. 1b) có thể liên quan đến thông tin về các cải biến nêu trên trong vùng CH2. Do đó, ưu tiên đối với cấu trúc theo sáng chế là các vùng CH2 trong vùng thứ ba của cấu trúc kháng thể theo sáng chế gồm cầu disulfua xystetin trong vùng ở các vị trí 309 và 321 theo Kabat và/hoặc vị trí glycosyl hóa ở vị trí 314 theo Kabat được loại bỏ bằng cách thay thế N314X như nêu trên, tốt hơn là thay thế N314G.

Theo một phương án được ưu tiên khác của sáng chế, các vùng CH2 trong vùng thứ ba của cấu trúc kháng thể theo sáng chế gồm cầu disulfua xystetin trong vùng ở các vị trí 309 và 321 theo Kabat và vị trí glycosyl hóa ở vị trí 314 theo Kabat được loại bỏ bằng

cách thay thế N314G. Tốt hơn, nếu monome polypeptit của vùng thứ ba của cấu trúc kháng thể theo sáng chế có một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17 và 18.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất cấu trúc kháng thể, trong đó:

(i) vùng thứ nhất gồm hai vùng biến đổi của kháng thể và vùng thứ hai gồm hai vùng biến đổi của kháng thể;

(ii) vùng thứ nhất gồm một vùng biến đổi của kháng thể và vùng thứ hai gồm hai vùng biến đổi của kháng thể;

(iii) vùng thứ nhất gồm hai vùng biến đổi của kháng thể và vùng thứ hai gồm một vùng biến đổi của kháng thể; hoặc

(iv) vùng thứ nhất gồm một vùng biến đổi của kháng thể và vùng thứ hai gồm một vùng biến đổi của kháng thể.

Do đó, vùng thứ nhất và vùng thứ hai có thể là các vùng liên kết mỗi vùng gồm hai vùng biến đổi của kháng thể như vùng VH và VL. Các ví dụ về vùng liên kết gồm hai vùng biến đổi của kháng thể được mô tả ở trên đây và gồm các đoạn Fv, các đoạn scFv hoặc các đoạn Fab như được nêu trên đây chẳng hạn. Theo cách khác, một hoặc cả hai vùng liên kết này có thể chỉ chứa một vùng biến đổi đơn. Ví dụ về các vùng liên kết đơn vùng mà được nêu trên và gồm các kháng thể nano hoặc các kháng thể vùng biến đổi đơn chỉ chứa một vùng biến đổi, mà có thể là VHH, VH hoặc VL, mà liên kết đặc hiệu kháng nguyên hoặc epitop độc lập với các vùng hoặc các miền V khác.

Theo một phương án được ưu tiên của cấu trúc kháng thể theo sáng chế, vùng thứ nhất và vùng thứ hai được dung hợp với vùng thứ ba nhờ trình tự liên kết peptit. Trình tự liên kết peptit được ưu tiên đã được mô tả ở trên đây và được đặc trưng bởi trình tự axit amin Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, tức là Gly_4Ser (SEQ ID NO: 1), hoặc polyme của chúng, tức là $(Gly_4Ser)x$, trong đó x là số nguyên 1 hoặc lớn hơn (ví dụ, 2 hoặc 3). Trình tự liên kết được đặc biệt ưu tiên cho sự dung hợp của vùng thứ nhất và vùng thứ hai với vùng thứ ba được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án được ưu tiên, cấu trúc kháng thể theo sáng chế được đặc trưng để gồm, theo thứ tự từ amin đến carboxyl:

(a) vùng thứ nhất;

(b) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-3;

(c) vùng thứ hai;

(d) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11 và 12;

(e) monome polypeptit thứ nhất của vùng thứ ba;

(f) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, 6, 7 và 8; và

(g) monome polypeptit thứ hai của vùng thứ ba.

Cấu trúc kháng thể theo sáng chế gồm vùng thứ nhất mà liên kết với BCMA, tốt hơn là với vùng ngoại bào (ECD) của BCMA. Cần phải hiểu rằng thuật ngữ "liên kết với vùng ngoại bào của BCMA", trong phạm vi theo sáng chế, ngụ ý rằng vùng liên kết liên kết với BCMA được biểu hiện trên bề mặt của tế bào đích. Do đó, tốt hơn nếu vùng thứ nhất theo sáng chế liên kết với BCMA khi nó được biểu hiện bằng các tế bào hoặc dòng tế bào biểu hiện tự nhiên, và/hoặc bằng các tế bào hoặc dòng tế bào được biến nạp hoặc (ổn định/tạm thời) được chuyển nhiễm bằng BCMA. Theo một phương án được ưu tiên, vùng liên kết thứ nhất còn liên kết với BCMA khi BCMA được sử dụng làm phân tử "đích" hoặc "phối tử" trong thử nghiệm liên kết *in vitro* như BIAcore hoặc Scatchard. "Tế bào đích" có thể là tế bào nhân rải rác hoặc nhân điển hình bất kỳ biểu hiện BCMA trên bề mặt của nó; tốt hơn là tế bào đích là tế bào mà là một phần của cơ thể người hoặc động vật, như tế bào ung thư hoặc u biểu hiện BCMA đặc hiệu.

Tốt hơn là, vùng thứ nhất liên kết với BCMA / BCMA ECD người. Trình tự BCMA người được ưu tiên được nêu trong SEQ ID NO: 41, và trình tự BCMA ECD người được ưu tiên được nêu trong SEQ ID NO: 42. Theo một phương án được ưu tiên khác, vùng thứ nhất liên kết với BCMA / BCMA ECD khỉ. Trình tự BCMA khỉ được ưu tiên được nêu trong SEQ ID NO: 43, và trình tự BCMA ECD khỉ được ưu tiên được nêu trong SEQ ID NO: 44. Theo một phương án được ưu tiên nhất, vùng thứ nhất liên kết với cả BCMA / BCMA ECD người và khỉ. "Vùng ngoại bào BCMA" hoặc "BCMA ECD" dùng để chỉ vùng hoặc trình tự BCMA về cơ bản không có vùng xuyên màng và vùng bào tương của BCMA. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng vùng

xuyên màng được nhận dạng đối với polypeptit BCMA theo sáng chế được nhận dạng theo tiêu chuẩn thường được sử dụng trong lĩnh vực này để nhận dạng loại vùng kị nước. Ranh giới chính xác của vùng xuyên màng có thể thay đổi nhưng có thể nhất là không lớn hơn 5 axit amin ở mỗi cuối vùng được đề cập cụ thể ở đây. Trình tự axit amin BCMA có độ dài đầy đủ được ưu tiên được nêu trong SEQ ID NO: 41. BCMA ECD được ưu tiên được nêu trong SEQ ID NO: 42.

Các vùng liên kết được ưu tiên mà liên kết với BCMA được mô tả trong WO 2013/072406, WO 2013/072415 và WO 2014/140248. Vùng liên kết bất kỳ cho BCMA được mô tả trong các đơn này có thể được sử dụng trong phạm vi theo sáng chế.

Theo một khía cạnh của sáng chế, cấu trúc kháng thể gồm, theo thứ tự từ amin đến carboxyl:

(a) vùng thứ nhất có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53, 59, 71, 77, 89 hoặc 95;

(b) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-3;

(c) vùng thứ hai có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 hoặc 187 trong WO 2008/119567, hoặc SEQ ID NO: 15;

(d) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11 và 12;

(e) monome polypeptit thứ nhất của vùng thứ ba có trình tự polypeptit được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17-24;

(f) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, 6, 7 và 8; và

(g) monome polypeptit thứ hai của vùng thứ ba có trình tự polypeptit được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17-24.

Theo phương án ưu tiên này, vùng thứ nhất và vùng thứ hai được dung hợp nhờ trình tự liên kết peptit với vùng thứ ba gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53, 59, 71, 77, 89 hoặc 95. Theo một khía cạnh, cấu trúc kháng thể

theo sáng chế được đặc trưng bởi có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55, 56, 61, 62, 73, 74, 79, 80, 91, 92, 97 và 98.

Sáng chế còn đề xuất polynucleotit/phân tử axit nucleic mã hóa cấu trúc kháng thể theo sáng chế. Polynucleotit là một polyme sinh học gồm 13 hoặc nhiều hơn 13 monome nucleotit được liên kết cộng hóa trị trong một chuỗi. ADN (như cADN) và ARN (như mARN) là các ví dụ về polynucleotit với chức năng sinh học khác biệt. Các nucleotit là các phân tử hữu cơ mà dùng làm monome hoặc cấu trúc dưới phân tử của các phân tử axit nucleic như ADN hoặc ARN. Phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit có thể là mạch kép và mạch đơn, mạch thẳng và mạch vòng. Tốt hơn là, phân tử này nằm trong vectơ mà được bao gồm trong tế bào chủ. Tế bào chủ như vậy, *ví dụ* sau khi biến nạp hoặc chuyển nhiễm vectơ hoặc polynucleotit theo sáng chế, có khả năng biểu hiện cấu trúc kháng thể. Vì mục đích đó polynucleotit hoặc phân tử axit nucleic được liên kết chức năng với các trình tự đối chứng.

Mã di truyền là bộ quy tắc mà qua đó thông tin được mã hóa trong vật liệu di truyền (các axit nucleic) được dịch mã thành protein. Giải mã sinh học trong các tế bào sống được thực hiện bởi ribosom mà liên kết axit amin theo thứ tự được quy định bởi mARN, sử dụng các phân tử tARN để mang axit amin và để đọc ba nucleotit trên mARN cùng một lúc. Mã di truyền xác định cách các trình tự gồm các bộ ba nucleotit này, được gọi là các codon, quy định axit amin nào sẽ được bổ sung tiếp theo trong quá trình tổng hợp protein. Với một vài ngoại lệ, codon ba nucleotit trong trình tự axit nucleic quy định một axit amin. Vì phần lớn các gen được mã hóa chính xác bằng cùng một mã, mã cụ thể này thường được dùng để chỉ là mã di truyền chuẩn hoặc chính tắc. Trong khi mã di truyền xác định trình tự protein cho một vùng mã hóa nhất định, thì các vùng bộ gen khác có thể bị ảnh hưởng nếu và khi các protein này được tổng hợp.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến vectơ chứa polynucleotit/phân tử axit nucleic theo sáng chế. Vectơ là một phân tử axit nucleic được sử dụng làm vật mang để chuyển vật liệu di truyền (ngoại lai) vào tế bào. Thuật ngữ "vectơ" bao gồm – nhưng không chỉ giới hạn ở – plasmit, virut, cosmit và nhiễm sắc thể nhân tạo. Nói chung, các vectơ được thao tác di truyền chứa điểm khởi đầu tái bản, vị trí đa tách dòng và chỉ thị chọn lọc. Bản thân vectơ thường là một trình tự nucleotit, phổ biến là trình tự ADN chứa trình tự cài (gen chuyển) và trình tự lớn hơn gọi là "khung" của vectơ. Các vectơ hiện đại có thể bao gồm các yếu tố khác ngoài trình tự cài gen chuyển và khung: trình tự khởi đầu, chỉ thị di truyền, đoạn

kháng kháng sinh, gen thông báo, trình tự đích, đuôi tinh chế protein. Các vectơ được gọi là vectơ biểu hiện (các cấu trúc biểu hiện) đặc biệt được dùng để biểu hiện gen chuyển trong tế bào đích, và thường có các trình tự kiểm soát.

Thuật ngữ "các trình tự kiểm soát" được dùng để chỉ các trình tự ADN cần để biểu hiện trình tự mã hóa được liên kết chức năng trong vi sinh vật chủ cụ thể. Các trình tự đối chứng mà thích hợp với sinh vật chưa có nhân điển hình, ví dụ, bao gồm trình tự khởi đầu, tùy ý trình tự điều khiển, và vị trí liên kết ribosom. Các tế bào nhân thực được biết đến để sử dụng trình tự khởi đầu, các trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, và các trình tự tăng cường.

Axit nucleic "được liên kết chức năng" nếu nó được đặt vào trong mối quan hệ chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, ADN của tiền trình tự hoặc trình tự dẫn chế tiết được liên kết chức năng với ADN của một polypeptit nếu nó được biểu hiện ở dạng tiền protein mà tham gia vào quá trình tiết polypeptit này; trình tự khởi đầu hoặc trình tự tăng cường được liên kết chức năng với trình tự mã hóa nếu nó tác động đến quá trình phiên mã của trình tự này; hoặc vị trí liên kết ribosom được liên kết chức năng với trình tự mã hóa nếu nó được bố trí để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình dịch mã. Nói chung, "được liên kết chức năng" có nghĩa là các trình tự ADN được liên kết là kế tiếp nhau, và, trong trường hợp trình tự dẫn chế tiết, là kế tiếp và nằm trong pha đọc. Tuy nhiên, các trình tự tăng cường không buộc phải kế tiếp. Việc liên kết được thực hiện bằng cách nối ở các vị trí giới hạn thích hợp. Nếu các vị trí này không có, thì các vùng thích nghi oligonucleotit tổng hợp hoặc các trình tự liên kết được sử dụng theo thực tiễn thông thường.

"Chuyển nhiễm" là một quy trình đưa phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit (kể cả vectơ) vào tế bào đích một cách có chủ ý. Thuật ngữ này hầu như được sử dụng trong các phương pháp không virut ở các tế bào có nhân thực. Tải nạp thường được sử dụng để mô tả việc chuyển phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit qua trung gian virut. Chuyển nhiễm các tế bào động vật thường có liên quan đến các khe hở mở tạm thời hoặc "các lỗ" trên màng tế bào, để cho phép hấp thu nguyên liệu. Chuyển nhiễm có thể được tiến hành bằng cách sử dụng canxi phosphat, bằng cách xung điện, bằng cách nén tế bào hoặc bằng cách trộn lipit cation với nguyên liệu để tạo ra liposom, mà dung hợp với màng tế bào và gửi phân tử chuyển nhiễm nào bên trong.

Thuật ngữ "biến nạp" được dùng để mô tả việc chuyển không virut các phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit (kể cả vectơ) vào vi khuẩn, và vào cả tế bào có nhân thực không phải của động vật, kể cả tế bào thực vật. Do đó, biến nạp là sự thay đổi di truyền tế bào vi khuẩn hoặc tế bào nhân thực không phải của động vật dẫn đến sự hấp thu trực tiếp qua màng tế bào từ môi trường xung quanh và sau đó kết hợp nguyên liệu di truyền ngoại bào (các phân tử axit nucleic). Biến nạp có thể được thực hiện bằng cách nhân tạo. Để biến nạp xảy ra, tế bào hoặc vi khuẩn phải ở trạng thái khả biến, mà có thể xảy ra đáp ứng giới hạn thời gian với các điều kiện môi trường như môi trường kiệt quệ và mật độ tế bào.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến tế bào chủ được biến nạp hoặc chuyển nhiễm polynucleotit/phân tử axit nucleic hoặc vectơ theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tế bào chủ" hoặc "tế bào nhận" được dự định để bao gồm từng tế bào hoặc chủng nuôi cấy tế bào mà có thể là hoặc đã từng là các tế bào nhận vectơ, phân tử axit nucleic ngoại sinh, và polynucleotit mã hóa cấu trúc kháng thể theo sáng chế; và/hoặc tế bào nhận chính cấu trúc kháng thể. Việc đưa nguyên liệu tương ứng vào tế bào được tiến hành bằng cách biến nạp, chuyển nhiễm và phương pháp tương tự. Thuật ngữ "tế bào chủ" cũng được dự định bao gồm thế hệ con hoặc thế hệ con tiềm ẩn của một tế bào. Do các cải biến nhất định có thể xảy ra ở các thế hệ tiếp theo bởi đột biến tự nhiên, ngẫu nhiên hoặc có chủ ý hoặc bởi tác động của môi trường, thế hệ con này thực tế có thể không giống nhau hoàn toàn (về hình thái hoặc về trình tự bổ sung ADN tổng số hoặc bộ gen) so với tế bào gốc, nhưng vẫn được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ như được sử dụng ở đây. Các tế bào chủ thích hợp bao gồm tế bào chưa có nhân điển hình hoặc tế bào nhân thực, và cũng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở vi khuẩn, tế bào nấm men, tế bào nấm, tế bào thực vật, và tế bào động vật như tế bào côn trùng và tế bào của động vật có vú, ví dụ, chuột nhắt, chuột cống, khỉ hoặc người.

Cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể được tổng hợp trong vi khuẩn. Sau khi biểu hiện, cấu trúc kháng thể theo sáng chế được phân lập từ bột nhão tế bào *E. coli* ở phân đoạn hòa tan và có thể được tinh chế bằng, ví dụ, sắc ký ái lực và/hoặc sắc ký loại trừ theo kích thước. Tinh chế lần cuối có thể được tiến hành tương tự với quy trnh tinh chế kháng thể được biểu hiện trong các tế bào CHO chẳng hạn.

Ngoài sinh vật chưa có nhân điển hình, vi sinh vật có nhân thực như nấm sợi hoặc nấm men cũng là các tế bào chủ biểu hiện hoặc tách dòng thích hợp đối với cấu trúc kháng thể theo sáng chế. *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc nấm men bánh mì thông thường, là vi

sinh vật chủ thường được sử dụng nhất trong số các vi sinh vật chủ có nhân thực bậc thấp. Tuy nhiên, số chi, loài và chủng khác là thường sẵn có và hữu dụng ở đây, như các tế bào chủ *Schizosaccharomyces pombe*, Kluyveromyces như *K. lactis, K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickeramii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilarum* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, và *K. marxianus*; yarrowia (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); Candida; *Trichoderma reesia* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; Schwanniomyces như *Schwanniomyces occidentalis*; và nấm sợi như tế bào chủ Neurospora, Penicillium, Tolypocladium, và Aspergillus như *A. nidulans* và *A. niger*.

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện cấu trúc kháng thể được glycosyl hóa theo sáng chế được lấy từ các vi sinh vật đa bào. Ví dụ về các tế bào của động vật không xương sống bao gồm các tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirut và biến thể và các tế bào chủ côn trùng chấp nhận được tương ứng như *Spodoptera frugiperda* (sâu bướm), *Aedes aegypti* (muỗi), *Aedes albopictus* (muỗi), *Drosophila melanogaster* (ruồi giấm), và *Bombyx mori* đã được xác định. Nhiều chủng virut dùng để chuyển nhiễm là sẵn có, *ví dụ*, biến thể L-1 của *Autographa californica*NPV và chủng Bm-5 của *Bombyx mori* NPV, và các virut như vậy có thể được sử dụng làm virut ở đây theo sáng chế, cụ thể là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Các chủng nuôi cấy tế bào thực vật của cây bông, cây ngô, khoai tây, đậu tương, cây thuốc lá cảnh, cây cà chua, Arabidopsis (họ cải) và thuốc lá cũng có thể được sử dụng làm các tế bào chủ. Các vectơ tách dòng và biểu hiện hữu dụng để tổng hợp protein trong chủng nuôi cấy tế bào thực vật là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem tài liệu Hiatt *et al.*, Nature (1989) 342: 76-78, Owen *et al.* (1992) Bio/Technology 10: 790-794, Artsaenko *et al.* (1995) The Plant J 8: 745-750, và Fecker *et al.* (1996) Plant Mol Biol 32: 979-986.

Tuy nhiên, được quan tâm hơn cả là các tế bào của động vật có xương sống, và quy trình nuôi cấy các tế bào của động vật có xương sống trong môi trường nuôi cấy (môi trường nuôi cấy mô) đã trở thành một quy trình thông thường. Ví dụ về các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu dụng là dòng tế bào thận khỉ CV1 được chuyển nhiễm SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); dòng tế bào thận của phôi người (293 hoặc tế bào 293 được tách dòng phụ để phát triển trong môi trường nuôi cấy huyền phù, Graham et al. , J. Gen Virol. 36 : 59 (1977)); tế bào thận của chuột cảnh con (BHK, ATCC CCL 10); tế bào trứng của

chuột cảnh Trung Quốc/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); tế bào sertoli của chuột nhắt (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); tế bào thận khỉ (CVI ATCC CCL 70); tế bào thận của khỉ xanh châu Phi (VERO-76, ATCC CRL1587); tế bào caxinom cổ tử cung của người (HELA, ATCC CCL 2); tế bào thận chó (MDCK, ATCC CCL 34); tế bào gan chuột trâu (BRL 3A, ATCC CRL 1442); tế bào phổi người (W138, ATCC CCL 75); tế bào gan người (Hep G2,1413 8065); khối u chuột nhắt có vú (MMT 060562, ATCC CCL5 1); tế bào TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y Acad. Sci. (1982) 383: 44-68); tế bào MRC 5; tế bào FS4; và dòng tế bào ung thư gan của người (Hep G2).

Theo một phương án khác sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất cấu trúc kháng thể theo sáng chế, trong đó quy trình này bao gồm nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong các điều kiện cho phép biểu hiện cấu trúc kháng thể theo sáng chế và thu hồi cấu trúc kháng thể được tổng hợp từ nuôi cấy tế bào.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "nuôi cấy" được dùng để chỉ việc duy trì, sự biệt hóa, sự phát triển, sự tăng sinh và/hoặc sự nhân giống *in vitro* các tế bào trong các điều kiện thích hợp trong môi trường. Thuật ngữ "biểu hiện" bao gồm bước bất kỳ có liên quan đến sự tổng hợp cấu trúc kháng thể theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phiên mã, cải biến sau phiên mã, dịch mã, cải biến sau dịch mã, và tiết.

Nếu sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, cấu trúc kháng thể có thể được tổng hợp trong tế bào, ở khe quanh tế bào chất, hoặc được tiết trực tiếp vào môi trường. Nếu cấu trúc kháng thể được tổng hợp trong tế bào, như là bước đầu tiên, thì mảnh vỡ hạt tế bào, tế bào chủ hoặc các đoạn phân giải, được loại bỏ, ví dụ, bằng cách ly tâm hoặc siêu lọc. Tài liệu Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) mô tả quy trình phân lập các kháng thể mà được tiết vào khe quanh tế bào chất của *E. coli*. Nói tóm lại, bột nhão tế bào được rã đông khi có mặt natri axetat (pH = 3,5), EDTA, và phenylmetylsulfonylflorua (PMSF) trong 30 phút. Mảnh vỡ tế bào có thể được loại bỏ bằng cách ly tâm. Nếu kháng thể được tiết vào môi trường, dịch nổi từ các hệ biểu hiện này thường được cô lần đầu bằng cách sử dụng thiết bị lọc cô protein sẵn có trên thị trường, ví dụ, thiết bị siêu lọc Amicon hoặc Millipore Pellicon. Chất ức chế proteaza như PMSF có thể được bao gồm trong bước bất kỳ trong số các bước nêu trên để ức chế sự phân giải protein và các kháng sinh có thể được bao gồm để ngăn ngừa sự phát triển của các tạp chất ngẫu nhiên.

Cấu trúc kháng thể theo sáng chế được tổng hợp từ các tế bào chủ có thể được thu hồi hoặc được tinh chế bằng cách sử dụng, ví dụ, sắc ký hydroxylapatit, điện di trên gel, thẩm tích, và sắc ký ái lực. Các kỹ thuật tinh chế protein khác như phân đoạn trên cột trao đổi ion, kết tủa etanol, HPLC pha đảo, sắc ký trên silica, sắc ký trên heparin SEPHAROSE™, sắc ký trên nhựa trao đổi anion hoặc cation (như cột axit polyaspartic), sắc ký tập trung, SDS-PAGE, và kết tủa bằng amoni sulfat cũng có thể dùng được tùy thuộc vào kháng thể được thu hồi. Nếu cấu trúc kháng thể theo sáng chế chứa vùng CH3, thì nhựa Bakerbond ABX (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) là hữu dụng để tinh chế.

Sắc ký ái lực là kỹ thuật tinh chế được ưu tiên. Chất nền mà phối tử ái lực gắn vào thường là agaroza, tuy nhiên các chất nền khác cũng có thể dùng được. Các chất nền ổn định về mặt cơ học như thủy tinh rỗng có kiểm soát hoặc poly (styrendivinyl)benzen cho phép tốc độ chảy nhanh hơn và thời gian xử lý ít hơn so với việc sử dụng agaroza.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế hoặc cấu trúc kháng thể được sản xuất theo quy trình của sáng chế. Được ưu tiên đối với dược phẩm theo sáng chế là tính đồng nhất của cấu trúc kháng thể là ≥ 80%, tốt hơn nữa là ≥ 81%,≥ 82%,≥ 83%,≥ 84%, hoặc ≥ 85%, tốt hơn nữa là ≥ 86%,≥ 87%,≥ 88%,≥ 89%, hoặc ≥ 90%, còn tốt hơn nữa là, ≥ 91%,≥ 92%,≥ 93%,≥ 94%, hoặc ≥ 95% và tốt nhất là ≥ 96%,≥ 97%,≥ 98% hoặc ≥ 99%.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dược phẩm" được dùng để chỉ chế phẩm thích hợp để sử dụng cho bệnh nhân, tốt hơn là cho người bệnh. Dược phẩm đặc biệt được ưu tiên theo sáng chế chứa một hoặc nhiều cấu trúc kháng thể theo sáng chế, tốt hơn là với lượng hữu hiệu để điều trị. Tốt hơn là, dược phẩm còn bao gồm các chế phẩm thích hợp chứa một hoặc nhiều chất mang, chất làm ổn định, tá dược, chất pha loãng, chất làm tan, chất hoạt động bề mặt, chất nhũ hóa, chất bảo quản và/hoặc chất bổ trợ (hữu hiệu để bào chế). Tốt hơn là, các thành phần chấp nhận được của chế phẩm không độc với người sử dụng ở liều và nồng độ được sử dụng. Dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chế phẩm dạng lỏng, đông lạnh, và đông khô.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa chất mang dược dụng. Nói chung, như được sử dụng ở đây, "chất mang dược dụng" có nghĩa là chất mang bất kỳ hay toàn bộ các dung dịch chứa nước và không chứa nước, dung dịch vô trùng, dung môi, dung dịch đệm, ví dụ dung dịch nước muối được đệm phosphat (phosphate buffered saline-PBS), nước, hỗn

dịch, nhũ tương, như nhũ tương dầu/nước, các loại khác gồm chất làm ẩm, liposom, môi trường phân tán và các chất bao, mà thích hợp để dùng trong lĩnh vực dược, cụ thể là thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa. Việc sử dụng môi trường và các chất như vậy trong dược phẩm là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và chế phẩm chứa các chất mang như vậy có thể được bào chế bằng các phương pháp thông thường đã biết rõ.

Các phương án nhất định đề xuất dược phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế và một hoặc nhiều tá dược khác như các tá dược được mô tả minh họa trong phần này và phần bất kỳ ở đây. Các tá dược có thể được sử dụng trong sáng chế theo khía cạnh này nhằm nhiều mục đích, như điều chỉnh các đặc tính vật lý, hóa học hoặc sinh học của chế phẩm, như điều chỉnh độ nhớt, và hoặc các quy trình theo sáng chế để cải thiện hiệu quả và hoặc để làm ổn định các chế phẩm và các quy trình chống lại sự thoái biến và sự phá hỏng do, ví dụ, các tác động mà xảy ra trong quá trình sản xuất, vận chuyển, bảo quản, bào chế trước khi dùng, sử dụng, và quá trình sau đó.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm có thể chứa các nguyên liệu bào chế nhằm mục đích cải biến, duy trì hoặc bảo quản, *ví dụ*, độ pH, nồng độ mol, độ nhớt, độ trong, màu, tính đẳng trương, mùi, độ vô trùng, độ ổn định, tốc độ hòa tan hoặc giải phóng, khả năng hấp thu hoặc thấm chế phẩm (xem tài liệu, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18" Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company). Theo các phương án này, các nguyên liệu bào chế thích hợp có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở:

- axit amin như glyxin, alanin, glutamin, asparagin, threonin, prolin, 2-phenylalanin, bao gồm axit amin mang điện, tốt hơn là lysin, lysin axetat, arginin, glutamat và/hoặc histidin
- các hợp chất kháng vi sinh vật như chất kháng khuẩn và kháng nấm
- chất chống oxy hóa như axit ascorbic, methionin, natri sulfit hoặc natri hydro-sulfit;
- dung dịch đệm, hệ đệm và các chất đệm mà được sử dụng để duy trì chế phẩm ở pH sinh lý hoặc ở pH thấp hơn một chút; ví dụ về các dung dịch đệm là borat, bicacbonat, Tris-HCl, xitrat, phosphat hoặc các axit hữu cơ khác, sucxinat, phosphat, và histidin; ví dụ dung dịch đệm Tris có pH nằm trong khoảng 7,0-8,5;

- các dung môi không chứa nước như propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu oliu, và este hữu cơ tiêm được như etyl oleat;
- các chất mang chứa nước bao gồm nước, dung dịch rượu/dung dịch nước, nhũ tương hoặc hỗn dịch, bao gồm dung dịch nước muối và môi trường được đệm;
- polyme dễ thoái biến sinh học như polyeste;
- chất độn như manitol hoặc glyxin;
- chất tạo chelat như axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA);
- chất đẳng trương và làm chậm hấp thu;
- các chất tạo phức như cafein, polyvinylpyrolidon, beta-xyclodextrin hoặc hydroxypropyl-beta-xyclodextrin)
- các chất độn;
- monosacarit; disacarit; và các cacbohydrat khác (như glucoza, manoza hoặc dextrin); cacbohydrat có thể là đường không khử, tốt hơn là trehaloza, sucroza, octasulfat, sorbitol hoặc xylitol;
- protein (khối lượng phân tử thấp), polypeptit hoặc chất mang có protein như albumin huyết thanh bò hoặc người, gelatin hoặc globulin miễn dịch, tốt hơn là có nguồn gốc từ người;
- chất tạo màu và chất tạo vị;
- chất khử chứa lưu huỳnh, như glutathion, axit thioctic, natri thioglycolat, thioglyxerol, [alpha]-monothioglyxerol, và natri thio sulfat
- chất pha loãng;
- chất nhũ hóa;
- polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon)
- ion đối tạo muối như natri;
- chất bảo quản như chất kháng vi sinh vật, chất chống oxy hóa, chất tạo chelat, các khí trơ và chất tương tự; ví dụ về chất bảo quản này là: benzalkoni clorua, axit benzoic, axit salicylic, thimerosal, rượu phenetyl, metylparaben, propylparaben, chlorhexidin, axit sorbic hoặc hydro peroxit);
- phức hợp kim loại như phức hợp Zn-protein;
- các dung môi và đồng dung môi (như glyxerin, propylen glycol hoặc polyetylen glycol);

- đường và rượu đường, như trehaloza, sucroza, octasulfat, manitol, sorbitol hoặc xylitol stachyoza, manoza, sorboza, xyloza, riboza, myoinisitoza, galactoza, lactitol, ribitol, myoinisitol, galactitol, glyxerol, xyclitol (ví dụ, inositol), polyetylen glycol; và rượu đường polyhydric;
- chất tạo hỗn dịch;
- chất hoạt động bề mặt hoặc chất làm ẩm như pluronic, PEG, este sorbitan, polysorbat như polysorbat 20, polysorbat, triton, trometamin, lexithin, cholesterol, tyloxapal; các chất hoạt động bề mặt có thể là chất tẩy, tốt hơn là có khối lượng phân tử >1,2 KD và/hoặc polyete, tốt hơn là có trọng lượng phân tử >3 KD; các ví dụ không giới hạn về các chất tẩy được ưu tiên là Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 và Tween 85; các ví dụ không giới hạn về các polyete được ưu tiên là PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 và PEG 5000;
- chất làm tăng độ ổn định như sucroza hoặc sorbitol;
- chất làm tăng tính trương như halogenua kim loại kiềm, tốt hơn là natri hoặc kali clorua, manitol sorbitol;
- các chất dẫn phân phối ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch natri clorua, Ringer's dextroza, dextroza và natri clorua, dung dịch Ringer lactat, hoặc dầu không bay hơi;
- các chất dẫn phân phối trong tĩnh mạch bao gồm các chất bổ sung dinh dưỡng và dạng lỏng, các chất bổ sung chất điện giải (như các chất dựa trên Ringer dextroza).

Rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng các thành phần khác nhau của dược phẩm (*ví dụ*, các thành phần được liệt kê trên đây) có thể có tác dụng khác nhau, ví dụ, và axit amin có thể hoạt động như một dung dịch đệm, chất làm ổn định và/hoặc chất chống oxy hóa; manitol có thể hoạt động như một chất độn và/hoặc chất làm tăng tính trương; natri clorua có thể hoạt động như một chất dẫn phân phối và/hoặc chất làm tăng tính trương; v.v..

Được dự tính rằng dược phẩm theo sáng chế có thể chứa thêm, ngoài polypeptit theo sáng chế được mô tả ở đây, chất có hoạt tính sinh học, tùy thuộc vào hướng sử dụng của chế phẩm. Các chất này có thể là dược chất tác dụng đến hệ dạ dày-ruột, các dược chất có tác dụng như chất kìm tế bào, các dược chất ngăn ngừa bệnh tăng axit uric huyết, dược chất ức chế các phản ứng miễn dịch (ví dụ corticosteroit), dược chất điều biến đáp ứng viêm,

dược chất tác dụng đến hệ tuần hoàn và/hoặc các chất như xytokin đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cũng được dự tính rằng cấu trúc kháng thể theo sáng chế được sử dụng trong đồng liệu pháp, *tức là*, kết hợp với thuốc chống ung thư khác.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm tối ưu sẽ được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tùy thuộc vào, ví dụ, đường dùng dự định, dạng phân phối và liều mong muốn. Ví dụ, xem REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *nêu trên*. Theo các phương án nhất định, các dược phẩm như vậy có thể tác động đến trạng thái vật lý, độ ổn định, tốc độ giải phóng *in vivo* và tốc độ thanh thải *in vivo* của cấu trúc kháng thể theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, chất mang hoặc chất dẫn cơ bản trong dược phẩm có thể có bản chất chứa nước hoặc không chứa nước. Ví dụ, chất mang hoặc chất dẫn thích hợp có thể là nước dùng để tiêm, dung dịch nước muối sinh lý hoặc dịch não tủy nhân tạo có thể được bổ sung các nguyên liệu khác phổ biến trong chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa. Dung dịch nước muối được đệm trung tính hoặc dung dịch nước muối được trộn albumin huyết thanh là các chất dẫn được lấy ví dụ thêm. Theo các phương án nhất định, các chế phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể được bào chế để bảo quản bằng cách trộn thành phần được chọn có mức độ tinh khiết mong muốn với các chất bào chế tùy ý (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *ở trên*) ở dạng bánh đông khô hoặc dung dịch chứa nước. Hơn nữa, theo các phương án nhất định, cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng bột đông khô bằng cách sử dụng các tá dược thích hợp như sucroza.

Nếu việc dùng ngoài đường tiêu hóa được đề cập, thì dược phẩm để dùng trong sáng chế có thể được đề xuất ở dạng không chứa chất gây sốt, dung dịch nước dùng được ngoài đường tiêu hóa chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế mong muốn trong chất dẫn dược dụng. Chất dẫn đặc biệt thích hợp để tiêm ngoài đường tiêu hóa là nước cất vô trùng, trong đó cấu trúc kháng thể theo sáng chế được bào chế ở dạng dung dịch đẳng trương, vô trùng, được bảo quản thích hợp. Theo các phương án nhất định, quy trình bào chế có thể bao gồm bào chế phân tử mong muốn với chất, như vi cầu tiêm được, các hạt dễ bị ăn mòn sinh học, các hợp chất polyme (như axit polylactic hoặc axit polyglycolic), các hạt hoặc liposom, mà có thể tạo ra sự giải phóng dược chất có kiểm soát hoặc kéo dài mà có thể được phân phối bằng cách tiêm ngấm dần. Theo các phương án nhất định, axit hyaluronic có thể được sử dụng, có tác dụng thúc đẩy khoảng thời gian kéo dài trong hệ

tuần hoàn. Theo các phương án nhất định, các thiết bị phân phối thuốc cấy được có thể được sử dụng để đưa cấu trúc kháng thể mong muốn vào.

Các dược phẩm khác là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các chế phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế ở dạng chế phẩm giải phóng/phân phối có kiểm soát hoặc kéo dài. Các kỹ thuật bào chế nhiều dạng dược phẩm phân phối kéo dài hoặc có kiểm soát khác, như chất mang liposom, vi hạt dễ ăn mòn sinh học hoặc hạt xốp và các thuốc tiêm ngấm dần, là cũng đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số PCT/US93/00829, mô tả quá trình giải phóng có kiểm soát các vi hạt polyme xốp để phân phối dược phẩm. Chế phẩm giải phóng kéo dài có thể chứa các chất nền polyme bán thấm ở dạng các vật được tạo hình, ví dụ, màng, hoặc vi nang. Chất nền giải phóng kéo dài có thể bao gồm polyeste, hydrogel, polylactit (như được mô tả trong Patent Mỹ số 3,773,919 và công bố đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP 058481), copolyme của axit L-glutamic và gamma etyl-L-glutamat (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poly (2-hydroxyetyl-metacrylat) (Langer *et al.*, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 và Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etylen vinyl axetat (Langer et al., 1981, nêu trên) hoặc axit poly-D(-)-3-hydroxybutyric (công bố đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP 133,988). Chế phẩm giải phóng kéo dài cũng có thể chứa liposom mà có thể được bào chế bằng phương pháp bất kỳ trong số một vài phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem tài liệu, *ví dụ*, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; công bố đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP 036,676; EP 088,046 và EP 143,949.

Cấu trúc kháng thể cũng có thể được bẫy trong các vi nang được bào chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng cách polyme hóa mặt phân giới (ví dụ, hydroxymetylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly (metylmetacylat), tương ứng), ở dạng các hệ phân phối dược chất dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano và nang nano), hoặc ở dạng nhũ tương thô. Các kỹ thuật như vậy được bộc lộ trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Dược phẩm được dùng *in vivo* thường được tạo ra ở dạng chế phẩm vô trùng. Quy trình vô trùng có thể được tiến hành bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Nếu chế phẩm được đông khô, thì quy trình vô trùng sử dụng phương pháp này có thể được tiến hành trước hoặc sau khi đông khô và hoàn nguyên. Các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa có

thể được bảo quản ở dạng đông khô hoặc ở dạng dung dịch. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa thường được đựng trong đồ chứa có lỗ nạp vô trùng, ví dụ, túi hoặc lọ dung dịch dùng qua đường tĩnh mạch có nắp mà kim tiêm dưới da có thể xuyên qua được.

Một khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế tự đệm, mà có thể được sử dụng làm dược phẩm, như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599). Nhiều tài liệu bộc lộ về các nguyên liệu bào chế và làm ổn định protein và các phương pháp hữu dụng về vấn đề này là sẵn có, như tài liệu của Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical chế phẩms," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" in: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter và Manning, biên tậpPharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), và tài liệu của Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), cụ thể là xem các phần có liên quan đến tá dược và quy trình sử dụng tá dược để bào chế chế phẩm protein tự đệm theo sáng chế, đặc biệt đối với các dược phẩm protein và quy trình sử dụng thuốc cho người và/hoặc thú y.

Các muối có thể được sử dụng theo các phương án nhất định của sáng chế, ví dụ, để điều chỉnh nồng độ ion và/hoặc tính đẳng trương của chế phẩm và/hoặc cải thiện độ hòa tan và/hoặc độ ổn định vật lý của protein hoặc thành phần khác của chế phẩm theo sáng chế. Như đã biết rõ, các ion có thể làm ổn định trạng thái tự nhiên của protein bằng cách liên kết với các gốc mang điện tích trên bề mặt protein và bằng cách che các nhóm phân cực và có điện tích trên protein và làm giảm cường độ tương tác tĩnh điện, tương tác hút và đẩy. Các ion cũng có thể làm ổn định tình trạng biến tính của protein bằng cách liên kết với, cụ thể là, các liên kết peptit biến tính (--CONH) của protein. Hơn nữa, tương tác ion với các nhóm phân cực và có điện tích trên protein cũng có thể làm giảm các tương tác tĩnh điện giữa phân tử và nhờ đó ngăn ngừa hoặc làm giảm sự kết tụ và không hòa tan của protein.

Các loại ion khác nhau một cách đáng kể về khả năng tác động đến protein. Số dãy phân loại ion và tác động của chúng đến protein đã được phát triển mà có thể được sử dụng để bào chế dược phẩm theo sáng chế. Một ví dụ về dãy phân loại là dãy Hofmeister, mà phân loại các chất tan ion và không ion phân cực theo tác động của chúng đến độ ổn định

cấu hình của các protein trong dung dịch. Các chất hòa tan làm ổn định được dùng để chỉ là "chất tạo ion làm ổn định." Các chất tan làm mất ổn định được dùng để chỉ là "chất tạo ion làm mất ổn định." Các chất tạo ion làm ổn định thường được sử dụng ở nồng độ cao (ví dụ, >1 mol amoni sulfat) để kết tủa protein trong dung dịch ("hiện tượng kết tủa kiểu tạo muối"). Các chất tan tạo ion làm mất ổn định thường được sử dụng để làm biến tính và/hoặc hòa tan protein ("hiện tượng hòa tan kiểu tạo muối"). Hiệu quả tương đối của các ion đối với "hiện tượng hòa tan kiểu tạo muối " và "hiện tượng kết tủa kiểu tạo muối" xác định vị trí của chúng trong dãy Hofmeister.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến axit amin tự do có thể được sử dụng trong các chế phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế ở dạng các chất độn, chất làm ổn định, và chất chống oxy hóa, cũng như là các cách sử dụng chuẩn khác. Lysin, prolin, serin, và alanin có thể được sử dụng để làm ổn định protein trong chế phẩm. Glyxin là hữu dụng trong quá trình đông khô để đảm bảo chính xác các đặc tính và cấu trúc bánh. Arginin có thể hữu dụng để ức chế sự kết tụ protein, ở cả chế phẩm dạng lỏng và dạng đông khô. Methionin là hữu dụng làm chất chống oxy hóa.

Polyol bao gồm đường, ví dụ, manitol, sucroza, và sorbitol và rượu polyhydric như, ví dụ, glyxerol và propylen glycol, và, đối với các mục đích bàn luận ở đây, polyetylen glycol (PEG) và các chất có liên quan. Polyol là chất tạo ion làm ổn định. Chúng là các chất làm ổn định hữu dụng trong cả chế phẩm dạng lỏng và chế phẩm đông khô để bảo vệ protein khỏi các quá trình thoái biến hóa học và vật lý. Các polyol cũng hữu dụng để điều chỉnh tính trương của chế phẩm. Trong số các polyol hữu dụng theo các phương án chọn lọc theo sáng chế, manitol thường được sử dụng để đảm bảo độ ổn định cấu trúc của bánh trong các chế phẩm đông khô. Manitol đảm bảo độ ổn định cấu trúc cho bánh. Hợp chất này thường được sử dụng với chất bảo quản đông khô, ví dụ, sucroza. Sorbitol và sucroza là các chất trong số các chất được ưu tiên để điều chỉnh tính trương và dùng làm các chất làm ổn định để bảo vệ chống lại các tác động đông lạnh-rã đông trong quá trình vận chuyển hoặc bào chế các thuốc có khối lượng lớn trong quy trình sản xuất. Các đường khử (mà chứa các nhóm aldehyt hoặc keton tự do), như glucoza và lactoza, có thể glycat hóa các gốc lysin và arginin trên bề mặt. Do đó, các đường này thường không phải là polyol được ưu tiên sử dụng trong số các polyol được ưu tiên theo sáng chế. Ngoài ra, các đường mà tạo ra loại phản ứng này, như sucroza, được thủy phân thành fructoza và glucoza trong các điều kiện axit, và do đó gây ra phản ứng glycat hóa, do đó các đường

này cũng không phải là polyol được ưu tiên trong số các polyol được ưu tiên theo sáng chế về mặt này. PEG hữu dụng để làm ổn định protein và làm chất bảo vệ đông lạnh và có thể được sử dụng trong sáng chế về mặt này.

Theo các phương án, chế phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế còn chứa chất làm ổn định bề mặt. Các phân tử protein này có thể dễ hấp thu trên bề mặt và dễ bị biến tính và kết tụ sau đó ở các bề mặt phân cách khí-lỏng, rắn-lỏng, và lỏng-lỏng. Các tác động này thường tỷ lệ nghịch với nồng độ protein. Các tương tác có hại này thường tỷ lệ nghịch với nồng độ protein và thường được tăng lên do quá trình khuấy cơ học, như các tương tác được tạo ra trong quá trình vận chuyển và xử lý sản phẩm. Chất hoạt động bề mặt thường được sử dụng để ngăn ngừa, làm giảm thiểu, hoặc làm giảm sự hấp thu bề mặt. Các chất hoạt động bề mặt hữu dụng theo sáng chế về mặt này bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80, các este axit béo khác của sorbitan polyetoxylat, và poloxame 188. Các chất hoạt động bề mặt cũng thường được sử dụng để kiểm soát độ ổn định cấu hìnhcủa protein. Sử dụng các chất hoạt động bề mặt về mặt này là đặc hiệu protein vì, chất hoạt động bề mặt nhất định bất kỳ thường sẽ làm ổn định một vài protein và làm mất ổn định một vài protein khác.

Các polysorbat rất dễ bị thoái biến do oxy hóa và thường, nếu được cung cấp, chứa peroxit với lượng đủ để làm oxy hóa các mạch bên của gốc protein, đặc biệt là methionin. Do đó, polysorbat cần được sử dụng cẩn thận, và nếu được sử dụng, cần được sử dụng ở nồng độ hữu hiệu thấp nhất. Về mặt này, các polysorbat chứng minh cho quy tắc chung rằng các tá dược nên được sử dụng ở nồng độ hữu hiệu thấp nhất.

Theo các phương án khác, chế phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế còn chứa một hoặc nhiều chất chống oxy hóa. Ở chừng mực nào đó quá trình oxy hóa protein gây hại có thể được ngăn ngừa ở dược phẩm bằng cách duy trì lượng oxy trong không khí và nhiệt độ thích hợp và bằng cách tránh tiếp xúc với ánh sáng. Các tá dược chống oxy hóa cũng có thể được sử dụng để ngăn ngừa sự thoái biến protein do oxy hóa. Các chất chống oxy hóa hữu dụng trong số các chất chống oxy hóa hữu dụng về mặt này là các chất khử, chất khử oxy/gốc tự do, và chất tạo chelat. Các chất chống oxy hóa dùng trong các chế phẩm protein dùng để điều trị theo sáng chế tốt hơn là hòa tan trong nước và duy trì hoạt tính của chúng trong suốt thời hạn sử dụng của một sản phẩm. EDTA là một chất chống oxy hóa được ưu tiên theo sáng chế về mặt này. Các chất chống oxy hóa có thể làm phá hủy protein. Ví dụ, chất khử, như cụ thể là glutathion, có thể phá vỡ liên kết disulfua

trong phân tử. Do đó, các chất chống oxy hóa dùng trong sáng chế được chọn, trong số các chất chống oxy hóa khác, để loại bỏ hoặc đủ làm giảm khả năng protein tự phá hủy trong chế phẩm.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể chứa ion kim loại mà là các đồng yếu tố protein và cần để tạo ra phức hợp phối hợp protein, như kẽm cần để tạo ra các hỗn dịch insulin nhất định. Các ion kim loại cũng có thể ức chế một vài quy trình mà làm thoái biến protein. Tuy nhiên, các ion kim loại cũng xúc tác các quy trình vật lý và hóa học mà làm thoái biến protein. Các ion magie (10-120 mM) có thể được sử dụng để ức chế quá trình đồng phân hóa axit aspartic thành axit isoaspartic. Các ion Ca^{+2} (lên đến 100mM) có thể làm tăng độ ổn định của deoxyribonucleaza của người. Tuy nhiên Mg^{+2}, Mn^{+2}, và Zn^{+2}, có thể làm mất ổn định rhDNaza. Tương tự, Ca^{+2} và Sr^{+2} có thể làm ổn định yếu tố VIII, yếu tố này có thể bị làm mất ổn định bởi Mg^{+2}, Mn^{+2} và Zn^{+2}, Cu^{+2} và Fe^{+2}, và có thể được làm tăng kết tụ bởi ion Al^{+3}.

Theo các phương án, chế phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế còn chứa một hoặc một vài chất bảo quản. Các chất bảo quản này là cần thiết khi phát triển các chế phẩm đa liều dùng ngoài đường tiêu hóa mà bao gồm nhiều hơn một lần rút chế phẩm từ cùng một đồ chứa. Chức năng chủ yếu của các chất bảo quản này là ức chế sự phát triển vi khuẩn và đảm bảo độ vô trùng cho chế phẩm trong suốt thời hạn sử dụng hoặc thời gian sử dụng sản phẩm dược phẩm. Các chất bảo quản thường được sử dụng bao gồm rượu benzyl, phenol và m-cresol. Mặc dù các chất bảo quản có lịch sử sử dụng lâu dài với các thuốc dùng ngoài đường tiêu hóa phân tử nhỏ, nhưng việc phát triển các chế phẩm protein mà chứa các chất bảo quản có thể vẫn là thách thức. Hầu hết các chất bảo quản luôn có tác dụng làm mất ổn định (gây kết tụ) đối với protein, và điều này đã trở thành yếu tố chính làm hạn chế việc sử dụng chúng trong các chế phẩm protein đa liều. Cho đến nay, hầu hết các dược phẩm protein đã được bào chế để chỉ sử dụng một lần. Tuy nhiên, nếu các chế phẩm đa liều có thể bào chế được thì các chế phẩm này có thêm ưu điểm là làm tiện lợi cho bệnh nhân, làm tăng tính thương mại của chế phẩm. Một ví dụ rõ về chế phẩm này là hocmon tăng trưởng của người (human growth hormone-hGH) mà việc phát triển các chế phẩm của chúng chứa chất bảo quản đã dẫn đến việc thương mại hóa của dạng trình bày bút tiêm sử dụng nhiều lần, tiện lợi hơn. Ít nhất bốn thiết bị bút tiêm như vậy chứa các chế phẩm hGH có chất bảo quản hiện nay đã được bán trên thị trường. Norditropin (dạng lỏng, Novo Nordisk), Nutropin AQ (dạng lỏng, Genentech) & Genotropin (hộp hai ngăn-

dạng đông khô, Pharmacia & Upjohn) chứa phenol trong khi Somatrope (Eli Lilly) được bào chế với m-cresol. Một vài khía cạnh cần được xem xét trong quá trình bào chế và phát triển các dạng liều chứa chất bảo quản. Nồng độ chất bảo quản hữu hiệu trong sản phẩm dược phẩm phải được làm tối ưu. Điều này đòi hỏi phải thử nghiệm chất bảo quản nhất định trong dạng liều với khoảng nồng độ tạo ra hiệu quả kháng khuẩn mà không làm ảnh hưởng đến độ ổn định protein.

Tất nhiên là, việc phát triển các chế phẩm dạng lỏng chứa các chất bảo quản vẫn còn có nhiều thách thức hơn so với các chế phẩm đông khô. Các chế phẩm đông khô có thể được đông khô mà không cần chất bảo quản và được hoàn nguyên bằng chất pha loãng chứa chất bảo quản ở thời điểm sử dụng. Điều này giúp làm rút ngắn thời gian mà chất bảo quản tiếp xúc với protein, làm giảm thiểu đáng kể các rủi ro về độ ổn định có liên quan. Với các chế phẩm dạng lỏng, hiệu lực bảo quản và độ ổn định cần được duy trì trong suốt thời hạn sử dụng chế phẩm (khoảng từ 18 đến 24 tháng). Một điểm quan trọng cần lưu ý đó là hiệu lực bảo quản cần được chứng minh ở chế phẩm cuối chứa dược chất và toàn bộ các thành phần tá dược.

Các cấu trúc kháng thể được bộc lộ ở đây cũng có thể được bào chế ở dạng liposom-miễn dịch. "Liposom" là một túi nhỏ gồm nhiều loại lipit, phospholipit và/hoặc chất hoạt động bề mặt mà hữu dụng để phân phối dược chất tới động vật có vú. Các thành phần của liposom thường được bố trí trong chế phẩm hai lớp, tương tự với sự bố trí lipit của màng sinh học. Liposom chứa cấu trúc kháng thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như các phương pháp được mô tả trong tài liệu Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.* , Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Patent Mỹ số 4,485,045 và 4,544,545; và công bố đơn quốc tế số WO 97/38731. Liposom có thời gian tuần hoàn kéo dài được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,013, 556. Các liposom đặc biệt hữu dụng có thể được tạo ra bằng phương pháp bay hơi pha đảo với chế phẩm lipit chứa phosphatidylcholin, cholesterol và phosphatidyletanolamin được tạo dẫn xuất PEG (PEG-PE). Liposom được ép đùn qua các thiết bị lọc có cỡ lỗ xác định để thu được các liposom có đường kính mong muốn. Đoạn Fab' của cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể được tiếp hợp với liposom như được mô tả trong tài liệu Martin *et al.* J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) thông qua phản ứng trao đổi disulfua. Chất hóa trị liệu tùy ý được bao gồm trong liposom. Xem tài liệu Gabizon *et al.* J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

Một khi dược phẩm được bào chế, dược phẩm này có thể được bảo quản trong các lọ vô trùng ở dạng dung dịch, hỗn dịch, gel, nhũ tương, chất rắn, tinh thể, hoặc ở dạng bột được khử nước hoặc bột đông khô. Các chế phẩm như vậy có thể được bảo quản ở dạng chuẩn bị sẵn để dùng hoặc ở dạng (*ví dụ*, đông khô) mà được hoàn nguyên trước khi dùng.

Hoạt tính sinh học của dược phẩm được mô tả ở đây có thể được xác định bằng các thử nghiệm về tính độc tế bào chẳng hạn, như được mô tả trong các ví dụ dưới đây, trong công bố đơn quốc tế số WO 99/54440 hoặc được mô tả bởi Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). "Hiệu quả" hay "hiệu quả *in vivo*" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ đáp ứng với liệu pháp sử dụng dược phẩm theo sáng chế, bằng cách sử dụng các tiêu chuẩn đáp ứng NCI chuẩn. Thành công hoặc hiệu quả *in vivo* của liệu pháp sử dụng dược phẩm theo sáng chế được dùng để chỉ hiệu quả của dược phẩm đối với mục đích dùng dự định, *tức là* khả năng dược phẩm gây ra tác dụng mong muốn, tức là làm suy yếu các tế bào bệnh học, ví dụ các tế bào khối u. Hiệu quả *in vivo* có thể được kiểm tra bằng các phương pháp chuẩn được thiết lập cho các thực thể bệnh tương ứng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở số đếm bạch cầu, số tế bào biệt hóa, phân tích tế bào hoạt hóa có đánh dấu huỳnh quang, hút tế bào tủy xương. Ngoài ra, các thông số hóa học lâm sàng đặc hiệu bệnh khác nhau và các phương pháp chuẩn được thiết lập khác có thể được sử dụng. Hơn nữa, phương pháp chụp cắt lớp có hỗ trợ bằng máy tính, chụp tia X, chụp cắt lớp cộng hưởng từ hạt nhân (ví dụ để đánh giá đáp ứng dựa trên tiêu chí-viện nghiên cứu ung thư quốc gia [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr;17(4):1244]), sàng lọc chụp cắt lớp phát xạ positron, số đếm bạch cầu, số tế bào biệt hóa, phân tích tế bào hoạt hóa có đánh dấu huỳnh quang, hút tủy xương, sinh thiết/mô học hạch lympho, và các thông số hóa học lâm sàng đặc hiệu u lympho khác nhau (ví dụ lactat dehydrogenaza) và các phương pháp chuẩn được thiết lập khác có thể được sử dụng.

Một thách thức lớn khác trong quá trình phát triển các dược phẩm như dược phẩm theo sáng chế là việc điều chỉnh có thể dự đoán được các đặc tính dược động học. Cuối cùng, profin dược động học của dược chất dự tuyển, tức là profin của các thông số dược động

học mà tác động đến khả năng điều trị tình trạng bệnh nhất định của một dược chất cụ thể, có thể được thiết lập. Các thông số dược động học của dược chất tác động đến khả năng điều trị một bệnh nhất định của một dược chất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: thời gian bán thải, thể tích phân bố, chuyển hóa qua gan lần đầu và mức liên kết trong huyết thanh máu. Hiệu quả của dược chất nhất định có thể bị tác động bởi mỗi thông số trong số các thông số nêu trên. Đó là đặc trưng được dự tính của cấu trúc kháng thể theo sáng chế được tạo ra với dạng Fc đặc hiệu mà chúng liên quan, ví dụ, sự khác biệt về đặc tính dược động học. Cấu trúc kháng thể nhắm đích được kéo dài thời gian bán thải theo sáng chế tốt hơn là thể hiện thời gian lưu in vivo tăng bất ngờ khi so với phiên bản không HLE "chính tắc" của cấu trúc kháng thể này.

"Thời gian bán thải" có nghĩa là thời gian mà 50% lượng dược chất được sử dụng được thải trừ qua các quá trình sinh học, ví dụ chuyển hóa, bài tiết, v.v.. Thuật ngữ "chuyển hóa qua gan lần đầu" có nghĩa là khả năng dược chất được chuyển hóa sau khi tiếp xúc lần đầu với gan, tức là khi dược chất này đi qua gan lần đầu. "Thể tích phân bố" có nghĩa là lượng dược chất được giữ lại qua các khoang khác nhau của cơ thể, như ví dụ các khoang nội bào và ngoại bào, mô và cơ quan, v.v. và mức phân bố dược chất trong các khoang này. "Mức liên kết trong huyết thanh máu" có nghĩa là khả năng dược chất tương tác và liên kết với các protein trong huyết thanh máu, như albumin, dẫn đến làm giảm hoặc làm mất hoạt tính sinh học của dược chất.

Các thông số dược động học cũng bao gồm sinh khả dụng, thời gian trễ (Tlag), Tmax, tốc độ hấp thu, mức xâm nhập nhiều hơn và/hoặc Cmax đối với một lượng dược chất nhất định được sử dụng. "Sinh khả dụng" có nghĩa là lượng dược chất trong khoang máu. "Thời gian trễ" có nghĩa là thời gian trễ giữa việc sử dụng dược chất và việc đo và phát hiện dược chất trong máu hoặc huyết tương. "Tmax" là thời gian sau khi mà nồng độ dược chất trong máu đạt tối đa, và "Cmax" là nồng độ tối đa trong máu thu được của một dược chất nhất định. Thời gian đạt được nồng độ dược chất trong máu hoặc mô mà cần để tạo ra tác dụng sinh học bị ảnh hưởng bởi tất cả các thông số. Các thông số dược động học của cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép có tính đặc hiệu chéo loài, có thể được xác định trong thử nghiệm tiền lâm sàng ở động vật linh trưởng không phải tinh tinh như được nêu trên đây, cũng như được nêu trong công bố của Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12) chẳng hạn.

Theo một khía cạnh được ưu tiên của sáng chế, dược phẩm là ổn định trong ít nhất bốn tuần ở khoảng -20°C. Như rõ rằng từ các ví dụ kèm theo, chất lượng của cấu trúc kháng thể theo sáng chế so với chất lượng của cấu trúc kháng thể trong tình trạng kỹ thuật của sáng chế tương ứng có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng các hệ khác nhau. Các thử nghiệm này được hiểu là đi đôi với "Hướng dẫn được thống nhất bởi ba bên ICH: *Thử nghiệm tính ổn định của các sản phẩm sinh học/công nghệ sinh học Q5C* và *Đặc điểm kỹ thuật: Các quy trình thử nghiệm và các tiêu chuẩn chấp nhận đối với các sản phẩm sinh học/công nghệ sinh học Biotech Q6B"* và, do đó được chọn để tạo ra profin chỉ rõ tính ổn định để tạo ra sự chắc chắn mà những thay đổi về tính đồng nhất, độ tinh khiết và hiệu lực của sản phẩm được phát hiện. Chấp nhận rằng thuật ngữ độ tinh khiết là thuật ngữ tương đối. Do tác dụng của quá trình glycosyl hóa, sự khử amit, hoặc các tính không đồng nhất khác, độ tinh khiết tuyệt đối của sản phẩm sinh học/công nghệ sinh học thường được đánh giá bằng nhiều hơn một phương pháp và giá trị độ tinh khiết thu được là phụ thuộc vào phương pháp. Đối với mục đích thử nghiệm tính ổn định, các thử nghiệm độ tinh khiết sẽ tập trung vào các phương pháp xác định các sản phẩm thoái hóa.

Để đánh giá chất lượng của dược phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể được phân tích bằng cách phân tích hàm lượng của các chất kết tụ hòa tan trong dung dịch (HMWS trên một lần loại bỏ theo kích thước). Ưu tiên rằng tính ổn định trong ít nhất bốn tuần ở -20°C được đặc trưng bởi hàm lượng nhỏ hơn 1,5% HMWS, tốt hơn là nhỏ hơn 1% HMWS.

Chế phẩm được ưu tiên đối với cấu trúc kháng thể làm dược phẩm có thể chứa các thành phần trong chế phẩm được mô tả dưới đây chẳng hạn:

- Chế phẩm A:
  kali phosphat, L-arginin hydroclorua, trehaloza dihydrat, polysorbat 80 ở pH = 6,0

Các ví dụ khác để đánh giá tính ổn định của cấu trúc kháng thể theo sáng chế ở dạng dược phẩm được đề xuất trong các ví dụ 4-12 kèm theo. Theo các phương án ví dụ về cấu trúc kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm đối với các điều kiện áp lực khác nhau trong các dược phẩm khác nhau và các kết quả được so sánh với các dạng kéo dài thời gian bán thải khác (half-life extending: HLE) của cấu trúc kháng thể liên hợp tế bào T đặc hiệu kép đã biết từ lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, dự tính rằng cấu trúc kháng thể được tạo ra với dạng Fc đặc hiệu theo sáng chế thường ổn định hơn đối với khoảng

rộng các điều kiện áp lực như áp lực về nhiệt độ và ánh sáng, cả hai được so sánh với cấu trúc kháng thể được tạo ra với các dạng HLE khác nhau và không có dạng HLE bất kỳ (tức là cấu trúc kháng thể "chính tắc"). Tính ổn định nhiệt độ này có thể đề cập đến cả nhiệt độ giảm (dưới nhiệt độ trong phòng bao gồm đông lạnh) và tăng (trên nhiệt độ trong phòng bao gồm nhiệt độ lên tới hoặc trên nhiệt độ cơ thể). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rằng, tính ổn định đối với áp lực được cải thiện, là khó tránh trong thực hành lâm sàng, làm cho cấu trúc kháng thể an toàn hơn vì các sản phẩm ít thoái hóa hơn sẽ xuất hiện trong thực hành lâm sàng. Do đó, tính ổn định tăng nghĩa là độ an toàn tăng.

Một phương án đề xuất cấu trúc kháng thể theo sáng chế hoặc cấu trúc kháng thể được tạo ra theo quy trình của sáng chế dùng để ngăn ngừa, điều trị hoặc cải thiện rối loạn tế bào B có liên quan đến sự biểu hiện BCMA hoặc sự biểu hiện quá mức BCMA, rối loạn bạch cầu, và bệnh tự miễn.

Các chế phẩm được mô tả ở đây là hữu dụng làm dược phẩm để điều trị, cải thiện và/hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh lý như được mô tả ở đây ở bệnh nhân cần điều trị. Thuật ngữ "điều trị" được dùng để chỉ cả phương pháp điều trị chữa bệnh và điều trị phòng ngừa hoặc ngăn ngừa bệnh. Điều trị bao gồm cho cơ thể, mô phân lập, hoặc tế bào thu được từ bệnh nhân mà bị bệnh/rối loạn, có triệu chứng của bệnh/rối loạn, hoặc dễ mắc bệnh/rối loạn sử dụng chế phẩm nhằm mục đích chữa trị, làm lành, làm giảm bớt, làm dịu, làm thay đổi, chữa khỏi, cải thiện, làm thuyên giảm, hoặc tác động đến bệnh, triệu chứng bệnh hoặc khả năng dễ mắc bệnh.

Thuật ngữ "cải thiện" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ việc làm thuyên giảm tình trạng bệnh của bệnh nhân mắc bệnh như được mô tả dưới đây, bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng cấu trúc kháng thể theo sáng chế. Việc làm thuyên giảm như vậy cũng có thể được nhận thấy là làm chậm hoặc ngừng sự tiến triển bệnh ở bệnh nhân. Thuật ngữ "ngăn ngừa" như được sử dụng ở đây có nghĩa là tránh xuất hiện hoặc tái phát bệnh ở bệnh nhân bị khối u hoặc bệnh ung thư hoặc bệnh ung thư di căn như được mô tả dưới đây, bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng cấu trúc kháng thể theo sáng chế.

Thuật ngữ "bệnh" được dùng để chỉ tình trạng bệnh bất kỳ mà thu được lợi từ việc điều trị bằng cấu trúc kháng thể hoặc dược phẩm được mô tả ở đây. Thuật ngữ bệnh này bao

gồm cả bệnh hoặc rối loạn cấp tính và mạn tính kể cả các tình trạng bệnh lý mà động vật có vú dễ mắc.

"U tân sinh" là một tình trạng phát triển bất thường của mô, tuy nhiên không phải lúc nào cũng tạo thành khối. Khi tạo thành khối, u tân sinh thường được gọi là "khối u". U tân sinh hoặc khối u có thể là lành tính, ác tính tiềm ẩn (tiền ung thư), hoặc ác tính. U tân sinh ác tính thường được gọi là bệnh ung thư. U tân sinh ác tính thường xâm lấn và phá hủy mô xung quanh và có thể dẫn đến di ăn, tức là, chúng lan sang các phần, các mô hoặc các cơ quan khác của cơ thể. Do đó, thuật ngữ "bệnh ung thư di căn" bao gồm cả các tình trạng di căn tới các mô hoặc cơ quan khác ngoài mô của khối u ban đầu. U lympho và bệnh bạch cầu là các u tân sinh lympho. Đối với các mục đích theo sáng chế, các u tân sinh lympho này cũng được bao gồm trong các thuật ngữ "khối u" hoặc "bệnh ung thư".

Thuật ngữ "bệnh do virut" mô tả bệnh, là kết quả của việc nhiễm virut của đối tượng.

Thuật ngữ "rối loạn miễn dịch học" như được sử dụng ở đây mô tả đi đôi với định nghĩa thông thường của thuật ngữ rối loạn miễn dịch này như các bệnh tự miễn, tính quá mẫn cảm, tình trạng thiếu hụt miễn dịch.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc cải thiện rối loạn tế bào B có liên quan đến sự biểu hiện BCMA hoặc sự biểu hiện quá mức BCMA, rối loạn bạch cầu, và bệnh tự miễn, bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị sử dụng cấu trúc kháng thể theo sáng chế hoặc cấu trúc kháng thể được tổng hợp bằng quy trình theo sáng chế.

Trong rối loạn bạch cầu, một dòng vô tính của bạch cầu nhân lên không kiểm soát được. Do đó, dòng vô tính này tạo ra lượng lớn kháng thể đơn (đơn dòng) được biết là M-protein. Trong một vài trường hợp, như bệnh lý gamma đơn dòng, kháng thể được tạo ra là chưa đầy đủ, chỉ gồm các chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng. Các bạch cầu bất thường này và các kháng thể mà chúng tạo ra thường bị giới hạn ở một kiểu.

Tốt hơn, nếu rối loạn bạch cầu được chọn từ nhóm gồm có bệnh đa u tủy xương, u tương bào, bệnh bạch cầu tương bào, bệnh tăng globulin đại phân tử, bệnh thoái hóa tinh bột, bệnh tăng globulin đại phân tử Waldenstrom, ung thư tế bào plasma xương đơn độc, ung thư tế bào plasma ngoài tủy, bệnh u tủy xơ cứng xương, các bệnh chuỗi nặng, bệnh lý gamma đơn dòng có ý nghĩa không xác định, và bệnh đa u tủy xương tiềm tàng. Các rối loạn tế bào B còn có thể được chọn từ nhóm gồm có u lympho không Hodgkin tế bào B, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính, và u lympho Hodgkin.

Ví dụ, bệnh tự miễn là bệnh lupus ban đỏ hệ thống (systemic lupus erythematosus: SLE) hoặc viêm đa khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis: RA).

Thuật ngữ "đối tượng cần điều trị" hoặc đối tượng "có nhu cầu điều trị" bao gồm các đối tượng đã mắc rối loạn, cũng như là các đối tượng trong đó rối loạn được ngăn ngừa. Đối tượng cần điều trị hoặc "bệnh nhân" bao gồm người và các đối tượng động vật có vú khác mà được điều trị để chữa bệnh hoặc điều trị để phòng bệnh.

Cấu trúc kháng thể theo sáng chế thường được bào chế theo đường dùng và phương pháp dùng cụ thể, theo dạng liều và tần suất dùng cụ thể, theo các phương pháp điều trị bệnh cụ thể, với khoảng sinh khả dụng và lượng tồn lưu, trong số các yếu tố khác. Tốt hơn là, các nguyên liệu của chế phẩm được bào chế ở nồng độ mà chấp nhận được với vị trí dùng.

Do đó chế phẩm và dược phẩm có thể được bào chế theo sáng chế để phân phối bằng đường dùng thích hợp bất kỳ. Trong phạm vi sáng chế, đường dùng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở

- đường dùng khu trú (như trên da, xông hít, mũi, mắt, tai/qua tai, âm đạo, niêm mạc);
- các đường qua đường tiêu hóa (như đường miệng, đường dạ dày ruột, dưới lưỡi, dưới môi, trong má, đường trực tràng); và
- các đường ngoài đường tiêu hóa (như đường tĩnh mạch, đường trong động mạch, đường trong xương, đường trong cơ, đường trong não, đường trong não thất, trên màng cứng, nội tủy mạc, đường dưới da, đường trong màng bụng, trong màng ối, trong khớp, trong tim, trong da, trong thương tổn, trong tử cung, trong bàng quang, trong dịch kính, qua da, trong mũi, qua niêm mạc, trong bao hoạt dịch, trong gian miệng ống).

Dược phẩm và cấu trúc kháng thể theo sáng chế đặc biệt hữu dụng để dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, phân phối dưới da hoặc trong tĩnh mạch, ví dụ bằng cách tiêm như tiêm lượng lớn, hoặc bằng cách truyền như truyền liên tục. Dược phẩm có thể được sử dụng bằng thiết bị y tế. Ví dụ về các thiết bị y tế để dùng dược phẩm được mô tả trong các patent Mỹ số 4,475,196; 4,439,196; 4,447,224; 4,447,233; 4,486,194; 4,487,603; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 5,064,413; 5,312,335; 5,312,335; 5,383,851; và 5,399,163.

Cụ thể là, sáng chế đề cập đến việc sử dụng không đứt quãng chế phẩm thích hợp. Theo một ví dụ không giới hạn, sử dụng không đứt quãng hoặc hầu như không đứt quãng, tức là sử dụng liên tục có thể được thực hiện bởi hệ thống bơm nhỏ được mang bởi bệnh nhân để đo dòng chất điều trị đi vào cơ thể bệnh nhân. Dược phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng bằng cách sử dụng hệ bơm này. Hệ bơm như vậy thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và thường phụ thuộc vào việc đổi định kỳ các hộp chứa chất điều trị được truyền. Khi đổi hộp trong hệ bơm này, thì có thể làm gián đoạn tạm thời dòng liên tục của chất điều trị đi vào cơ thể bệnh nhân. Trong trường hợp này, giai đoạn sử dụng trước khi thay hộp và giai đoạn sử dụng sau khi thay hộp vẫn sẽ được coi là có nghĩa một lần "sử dụng không đứt quãng" chất điều trị này trong phương pháp và phương tiện điều trị theo sáng chế.

Việc sử dụng liên tục hoặc không đứt quãng cấu trúc kháng thể theo sáng chế có thể là trong tĩnh mạch hoặc dưới da bằng cách sử dụng thiết bị phân phối chất lỏng hoặc hệ thống bơm nhỏ có cơ cấu dẫn động chất lỏng để dẫn động chất lỏng ra khỏi bình chứa và cơ cấu khởi động để khởi động cơ cấu dẫn động. Hệ thống bơm để sử dụng dưới da có thể bao gồm một kim tiêm hoặc ống thông để xuyên qua da của bệnh nhân và phân phối chế phẩm thích hợp vào cơ thể của bệnh nhân. Hệ thống bơm này có thể được cố định trực tiếp hoặc được gắn vào da của bệnh nhân độc lập với tĩnh mạch, động mạch hoặc mạch máu, nhờ đó cho phép hệ thống bơm tiếp xúc trực tiếp với da của bệnh nhân. Hệ thống bơm này có thể gắn vào da của bệnh nhân trong 24 giờ đến vài ngày. Hệ thống bơm có thể có kích cỡ nhỏ với bình chứa có thể tích nhỏ. Theo một ví dụ không giới hạn, thể tích của bình chứa dùng để chứa dược phẩm thích hợp được sử dụng có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50ml.

Sử dụng liên tục cũng có thể là sử dụng qua da bằng cách sử dụng miếng dán lên da và thay miếng dán ở các khoảng thời gian. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng các hệ miếng dán để phân phối dược chất là thích hợp cho mục đích này. Cần lưu ý rằng việc sử dụng qua da đặc biệt thích hợp với việc sử dụng không đứt quãng, vì việc thay miếng dán đã cạn thuốc thứ nhất có thể được thực hiện thích hợp đồng thời với việc đặt một miếng dán mới thứ hai, ví dụ lên bề mặt da liền kề ngay với miếng dán đã cạn thuốc thứ nhất và ngay trước khi loại miếng dán đã cạn thuốc thứ nhất. Các vấn đề về ngắt quãng dòng chảy hoặc phá hủy tế bào gốc không nảy sinh.

Nếu dược phẩm được đông khô, thì trước tiên dược phẩm đông khô được hoàn nguyên trong một chất lỏng thích hợp trước khi dùng. Dược phẩm đông khô có thể được hoàn nguyên trong, ví dụ, nước kìm khuẩn để tiêm (bacteriostatic water for injection-BWFI), dung dịch nước muối sinh lý, dung dịch nước muối được đệm phosphat (phosphate buffered saline-PBS), hoặc dung dịch tương tự mà protein đã được đông khô trước đó.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng ở liều thích hợp mà có thể được xác định ví dụ bằng các nghiên cứu tăng dần liều bằng cách sử dụng các liều tăng dần của cấu trúc kháng thể theo sáng chế có tính đặc hiệu chéo loài được mô tả ở đây cho động vật linh trưởng không phải tinh tinh, ví dụ khỉ. Như nêu trên đây, cấu trúc kháng thể theo sáng chế có tính đặc hiệu chéo loài được mô tả ở đây có thể được sử dụng thích hợp ở dạng tương tự trong thử nghiệm tiền lâm sàng ở động vật linh trưởng không phải tinh tinh và được sử dụng làm thuốc ở người. Phác đồ dùng liều sẽ được quyết định bởi thầy thuốc và các yếu tố lâm sàng. Như đã biết rõ trong lĩnh vực y học, các liều dùng cho một bệnh nhân bất kỳ sẽ tùy thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm kích thước của bệnh nhân, diện tích bề mặt cơ thể, độ tuổi, hợp chất cụ thể được sử dụng, giới tính, thời gian và đường dùng, tình trạng sức khỏe chung, và các dược chất khác được sử dụng đồng thời.

Thuật ngữ "liều hữu hiệu" hoặc "liều dùng hữu hiệu" được xác định là lượng đủ để đạt được hoặc ít nhất đạt được một phần tác dụng mong muốn. Thuật ngữ "liều hữu hiệu điều trị" được xác định là lượng đủ để chữa trị hoặc ít nhất một phần kìm hãm bệnh và biến chứng của bệnh ở bệnh nhân đã bị bệnh. Lượng hoặc liều hữu hiệu cho mục đích sử dụng này sẽ tùy thuộc vào tình trạng bệnh được điều trị (chỉ định), cấu trúc kháng thể được phân phối, phạm vi và mục đích điều trị, mức độ nghiêm trọng của bệnh, liệu pháp điều trị trước đó, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với chất điều trị, đường dùng, kích thước (thể trọng, bề mặt cơ thể và kích thước cơ quan) và/hoặc tình trạng bệnh (độ tuổi và tình trạng sức khỏe chung) của bệnh nhân, và tình trạng chung của hệ miễn dịch riêng của bệnh nhân. Liều thích hợp có thể được điều chỉnh theo đánh giá của thầy thuốc sao cho liều này có thể được sử dụng cho bệnh nhân một lần hoặc qua một loạt lần sử dụng, và để thu được tác dụng điều trị tối ưu.

Liều thông thường có thể nằm trong khoảng từ 0,1μg/kg đến 30mg/kg hoặc lớn hơn, tùy thuộc vào các yếu tố nêu trên. Theo các phương án cụ thể, liều dùng có thể nằm trong

khoảng từ 1,0μg/kg đến 20 mg/kg, tùy ý nằm trong khoảng từ 10μg/kg đến 10mg/kg hoặc từ 100μg/kg đến 5mg/kg.

Tốt hơn là lượng hữu hiệu để điều trị của cấu trúc kháng thể theo sáng chế làm giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng bệnh, làm tăng tần suất hoặc thời gian không mang triệu chứng bệnh hoặc ngăn ngừa tình trạng suy yếu hoặc ốm yếu do đau đớn của bệnh tật. Để điều trị các bệnh có liên quan đến sự biểu hiện BCMA như nêu trên đây, lượng hữu hiệu để điều trị của cấu trúc kháng thể theo sáng chế, ở đây là: cấu trúc kháng thể kháng BCMA/kháng CD3, tốt hơn là ức chế sự phát triển tế bào hoặc sự phát triển khối u ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, hoặc ít nhất khoảng 90% so với các bệnh nhân không được điều trị. Khả năng hợp chất ức chế sự phát triển khối u có thể được đánh giá trên mô hình dự đoán hiệu quả ở động vật.

Dược phẩm có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chất điều trị khác như các chất điều trị chống ung thư nếu cần, ví dụ các dược chất có protein và không có protein khác. Các dược chất này có thể được sử dụng đồng thời với chế phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế như được mô tả ở đây hoặc sử dụng riêng biệt trước hoặc sau khi sử dụng cấu trúc kháng thể này ở các liều và các khoảng cách được xác định hợp lý.

Thuật ngữ "liều hữu hiệu và không độc" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ liều dung nạp của cấu trúc kháng thể theo sáng chế mà đủ mạnh để làm suy yếu các tế bào bệnh học, triệt tiêu khối u, co khối u hoặc làm ổn định bệnh mà không hoặc hầu như không gây ra các tác dụng độc đáng kể. Các liều không độc và hữu hiệu như vậy có thể được xác định *ví dụ* bằng cách nghiên cứu tăng dần liều được mô tả trong giải pháp đã biết và cần thấp hơn liều gây ra các phản ứng phụ có hại nghiêm trọng (độc tính giới hạn liều (dose limiting toxicity-DLT)).

Thuật ngữ "độc tính" như được sử dụng ở đây được dùng để chỉ các tác dụng độc của thuốc được thể hiện ở các phản ứng có hại hoặc các phản ứng có hại nghiêm trọng. Các phản ứng phụ này có thể được dùng để chỉ việc không có khả năng dung nạp thuốc nói chung và/hoặc không có khả năng dung nạp cục bộ sau khi dùng thuốc. Tính độc cũng có thể bao gồm các tác dụng sinh quái thai hoặc tác dụng tạo chất gây ung thư do thuốc gây ra.

Thuật ngữ "độ an toàn", "độ an toàn *in vivo*" hoặc "khả năng dung nạp" như được sử dụng ở đây được hiểu là việc sử dụng thuốc mà không trực tiếp gây ra các phản ứng có hại nghiêm trọng sau khi dùng (dung nạp khu trú) và trong suốt khoảng thời gian dùng thuốc kéo dài. "Độ an toàn", "độ an toàn *in vivo*" hoặc "khả năng dung nạp" có thể được đánh giá ví dụ ở các thời điểm cách đều trong suốt thời gian điều trị và giai đoạn tiếp theo. Các biện pháp đánh giá bao gồm đánh giá lâm sàng, các biểu hiện ở cơ quan chẳng hạn, và sàng lọc các bất thường trong thí nghiệm. Đánh giá lâm sàng có thể được tiến hành và các độ lệch so với các phát hiện bình thường được ghi lại/ký hiệu theo các tiêu chuẩn NCI-CTC và/hoặc MedDRA. Các biểu hiện ở cơ quan có thể bao gồm các tiêu chí như dị ứng/tính miễn dịch, máu/tủy xương, chứng loạn nhịp tim, tình trạng đông máu và tiêu chí tương tự, như nêu trong *ví dụ* bộ tiêu chuẩn thuật ngữ chung về các phản ứng có hại v3.0 (Common terminology criteria for adverse events-CTCAE). Các thông số thí nghiệm mà có thể được kiểm tra bao gồm ví dụ huyết học, hóa học lâm sàng, profin đông máu và phân tích nước tiểu và xét nghiệm các thể dịch khác như huyết thanh, huyết tương, hệ bạch huyết hoặc dịch tủy sống, chất lỏng và dịch lỏng khác. Do đó, độ an toàn có thể được đánh giá ví dụ bằng cách kiểm tra thể chất, các kỹ thuật hiện ảnh (tức là siêu âm, chụp tia x, chụp cắt lớp CT, chụp cộng hưởng từ (Magnetic Resonance Imaging-MRI)), các biện pháp khác bằng các thiết bị kỹ thuật (tức là điện tâm đồ), các dấu hiệu sinh tồn, bằng cách đo các thông số thí nghiệm và ghi lại các phản ứng bất lợi. Ví dụ, các phản ứng bất lợi ở động vật linh trưởng không phải tinh tinh trong phương pháp và sử dụng theo sáng chế có thể được kiểm tra bằng các phương pháp mô bệnh học và/hoặc mô hóa học.

Các thuật ngữ trên đây cũng được đề cập *ví dụ* trong tài liệu Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee meeting on July 16, 1997.

Cuối cùng, sáng chế đề cập đến kit chứa cấu trúc kháng thể theo sáng chế hoặc được tạo ra bằng quy trình theo sáng chế, dược phẩm theo sáng chế, polynucleotit theo sáng chế, vectơ theo sáng chế và/hoặc tế bào chủ theo sáng chế.

Trong phạm vi sáng chế, thuật ngữ "kit" có nghĩa là hai hoặc nhiều thành phần – một trong số các thành phần này tương ứng với cấu trúc kháng thể, dược phẩm, vectơ hoặc tế bào chủ theo sáng chế – được đóng gói cùng nhau trong một đồ chứa, đồ dựng hoặc

tương tự. Do đó, kit có thể được mô tả là một bộ sản phẩm và/hoặc dụng cụ mà thích hợp để đạt được mục tiêu nhất định, mà có thể đưa ra thị trường dưới dạng một bộ sản phẩm.

Kit có thể chứa một hoặc nhiều đồ đựng (như lọ, ampun, đồ chứa, bơm tiêm, bình, túi) có hình dạng, kích thước và vật liệu thích hợp bất kỳ (tốt hơn là không thấm nước, *ví dụ* nhựa hoặc thủy tinh) chứa cấu trúc kháng thể hoặc dược phẩm theo sáng chế ở liều dùng thích hợp (xem trên đây). Kit có thể chứa thêm hướng dẫn sử dụng (*ví dụ* ở dạng tờ in rời hoặc sổ hướng dẫn), các dụng cụ để sử dụng cấu trúc kháng thể theo sáng chế như bơm tiêm, bơm, cốc pha hoặc dụng cụ tương tự, các dụng cụ để hoàn nguyên cấu trúc kháng thể theo sáng chế và/hoặc dụng cụ để pha loãng cấu trúc kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến kit cho bộ sử dụng đơn liều. Kit theo sáng chế cũng có thể chứa đồ đựng thứ nhất chứa cấu trúc kháng thể khô/đông khô và đồ đựng thứ hai chứa chế phẩm chứa nước. Theo các phương án nhất định của sáng chế, kit chứa các bơm tiêm đã nạp trước nhiều ngăn và một ngăn (*ví dụ*, bơm tiêm chất lỏng và bơm tiêm đông khô) được đề xuất.

*****

Cần lưu ý rằng như được sử dụng ở đây, các dạng số ít "một", "này", và "đó" bao gồm cả nghĩa số nhiều trừ khi được quy định rõ ràng theo cách khác. Do đó, ví dụ, khi đề cập đến "tác nhân phản ứng" bao gồm cả một hoặc nhiều tác nhân phản ứng khác nhau như vậy và khi đề cập đến "phương pháp" bao gồm cả việc đề cập đến các bước và các phương pháp tương đương đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này mà có thể được thay đổi hoặc thay thế cho các phương pháp được mô tả ở đây.

Trừ khi được quy định theo cách khác, thuật ngữ "ít nhất" đứng trước một loạt các yếu tố được hiểu là đề cập đến mọi yếu tố trong loạt yếu tố này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng, hoặc có thể biết chắc ngoài việc chỉ sử dụng thử nghiệm thông thường, có thể sử dụng nhiều thử nghiệm tương đương với các phương án cụ thể theo sáng chế được mô tả ở đây. Các thử nghiệm tương đương này được dự định là được bao gồm trong sáng chế.

Thuật ngữ "và/hoặc" bất kể ở đoạn nào đều có nghĩa là "và", "hoặc" và "toàn bộ hoặc tổ hợp khác bất kỳ của các yếu tố đi kèm với thuật ngữ này".

Thuật ngữ "khoảng" hay "xấp xỉ" như được sử dụng ở đây có nghĩa là trong khoảng 20%, tốt hơn là trong khoảng 10%, và tốt hơn nữa là trong khoảng 5% của giá trị hoặc khoảng giá trị nhất định. Tuy nhiên, nó bao gồm, cả con số cụ thể, ví dụ, khoảng 20 bao gồm 20.

Thuật ngữ "nhỏ hơn" hoặc "lớn hơn" bao gồm con số cụ thể. Ví dụ, nhỏ hơn 20 nghĩa là nhỏ hơn hoặc bằng. Tương tự, nhiều hơn hoặc lớn hơn lần lượt nghĩa là nhiều hơn hoặc bằng, hoặc lớn hơn hoặc bằng.

Trong bản mô tả này và yêu cầu bảo hộ đi kèm, trừ khi có quy định theo cách khác, thuật ngữ "chứa", và các thuật ngữ biến thể của nó "gồm" và "chứa", sẽ được hiểu là chỉ việc bao gồm số nguyên hoặc bước hoặc nhóm số nguyên hoặc bước nhưng không loại trừ số nguyên hoặc bước hoặc nhóm số nguyên hoặc bước khác bất kỳ. Nếu được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chứa" có thể được thay thế bằng thuật ngữ "gồm có" hoặc "bao gồm" hoặc đôi khi được sử dụng ở đây với nghĩa là "có".

Nếu được sử dụng ở đây thuật ngữ "chỉ gồm" loại trừ yếu tố, bước, hoặc thành phần bất kỳ không được nêu trong yếu tố yêu cầu bảo hộ. Nếu được sử dụng ở đây, thuật ngữ "về cơ bản chỉ gồm" không loại trừ các nguyên liệu hoặc các bước mà cốt yếu không làm ảnh hưởng đến các đặc điểm mới và cơ bản của yêu cầu bảo hộ.

Trong mỗi trường hợp ở đây thuật ngữ bất kỳ trong số các thuật ngữ "chứa", "về cơ bản chỉ gồm" và "bao gồm" có thể được thay thế bằng một trong hai thuật ngữ còn lại.

Cần phải hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở hệ phương pháp, quy trình, nguyên liệu, tác nhân phản ứng, và các chất, v.v., được mô tả ở đây và có thể thay đổi. Thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không được dự định giới hạn phạm vi của sáng chế, phạm vi của sáng chế chỉ được xác định bởi yêu cầu bảo hộ.

Tất cả các công bố và sáng chế được viện dẫn trong phần mô tả này (bao gồm tất cả các sáng chế, đơn sáng chế, công bố khoa học, các đặc tính kỹ thuật của nhà sản xuất, hướng dẫn sử dụng, v.v.), trên đây hoặc dưới đây, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Ở đây không được hiểu rằng sáng chế không được quyền đề lùi ngày bản mô tả theo sáng chế đã biết. Đối với nguyên liệu được đưa vào bằng cách viện dẫn mà trái với hoặc mâu thuẫn với phần mô tả này, thì bản mô tả sẽ không dùng nguyên liệu bất kỳ như vậy.

Sáng chế và các ưu điểm của sáng chế sẽ được hiểu hơn từ các ví dụ sau, các ví dụ này được đưa ra chỉ để minh họa. Các ví dụ này không được dự định giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Các ví dụ được mô tả dưới đây có thể được thực hiện theo cách tương tự, tức là theo các quy trình tương tự, với các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép khác theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sự biểu hiện CD69 do BiTE® gây ra ở tế bào T khi không có tế bào đích

PBMC đã phân lập từ người cho khỏe mạnh được nuôi cấy cùng với việc tăng dần cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép Đích B/CD3 hoặc Đích A/CD3 HLE trong 48 giờ. Sự biểu hiện gen đánh dấu hoạt hóa CD69 ở tế bào T được xác định bằng cách nhuộm miễn dịch và đếm tế bào theo dòng chảy và mAb tiếp hợp đặc hiệu kháng nguyên.

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích theo sự điều hòa ngược CD69 được quan sát đối với tất cả các cấu trúc kháng CDH 19 nhưng là không rõ rệt nhất đối với các phân tử heteroFc và thể lai. Sự điều hòa ngược CD69 bằng kháng thể kháng Đích B-scFc xảy ra ở nồng độ cao hơn và biên độ phần nào thấp hơn so với hai cấu trúc dựa trên Fc khác.

Đối với kháng thể kháng Đích A, gần như không có sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích được quan sát đối với phân tử chứa scFc, trong khi cấu trúc heteroFc gây ra sự điều hòa ngược CD69 mạnh trên bề mặt tế bào T khi không có tế bào đích.

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích do cấu trúc BiTE® chứa Fc chuỗi đơn, hoặc thể dung hợp hetero-Fc ở đầu tận cùng C gây ra được đánh giá đối với cấu trúc sau:

Cấu trúc BiTE® (pha loãng theo dãy: 0,1 pM – 2 µM)

a. Đích A-I2C scFc; 1,14 mg/mL;
b. Đích A Hetero Fc; 1,02 mg/

Tế bào hiệu ứng PBMC người (3 thể cho; #065, #823, #836 (scFc) #401, #415, #433 (heteroFc); #590, #595, 598, #605 (Thể X)).

thời gian ủ 48 giờ.

Xác định sự biểu hiện CD69 trên tế bào T CD4+ và CD8+ với máy đếm tế bào theo dòng và mAb tiếp hợp đặc hiệu kháng nguyên. Các kết quả xem Fig. 2.

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích do cấu trúc kháng thể BiTE® chứa Fc chuỗi đơn, hetero-Fc hoặc thể dung hợp thể lai ở đầu tận cùng C gây ra được đánh giá đối với cấu trúc sau:

Cấu trúc BiTE® (pha loãng theo dãy: 0,1 pM – 2 μM)

c. Đích B x I2C-scFc; 245,3 μg/mL
d. Đích B Hetero FC; 1 mg/mL
e. Đích B thể lai; 6,3 mg/mL

Tế bào hiệu ứng PBMC người (3 đến 4 thể cho; #386, #392, #401 (scFc) #282, #284, #287 (heteroFc)).

thời gian ủ 48 giờ.

Xác định sự biểu hiện CD69 trên tế bào T CD4+ và CD8+ với máy đếm tế bào theo dòng và mAb tiếp hợp đặc hiệu kháng nguyên. Các kết quả xem Fig. 3.

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích theo sự điều hòa ngược CD69 được quan sát đối với vài cấu trúc đặc hiệu kép được thử nghiệm trong thử nghiệm này. Sự điều hòa ngược CD69 thường là rõ rệt hơn đối với cấu trúc kháng thể BiTE® chính tắc, các phân tử heteroFc và thể lai khi so sánh với cấu trúc scFc tương ứng. Sự điều hòa ngược CD69 bởi cấu trúc scFc thường xảy ra ở nồng độ hơi cao hơn, và biên độ phần nào thấp hơn so với hai cấu trúc dựa trên Fc khác.

Đối với cấu trúc kháng thể kháng Đích B scFc, không quan sát thấy sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích , trong khi cấu trúc heteroFc và thể X gây ra sự điều hòa ngược CD69 mạnh trên bề mặt tế bào T khi không có tế bào đích.

Ngoài ra, không có sự điều hòa ngược CD69 không phụ thuộc tế bào đích được quan sát trong thử nghiệm sử dụng cấu trúc kháng thể kháng Đích C và kháng Đích G. Do sự biểu hiện đích ở các tế bào dòng tủy, các tế bào này đã được loại bỏ trước khi thử nghiệm được thiết lập. Các số liệu này chỉ ra rằng sự tương tác của vùng Fc của cấu trúc đặc hiệu kép với tế bào biểu hiện FcγR có thể chịu trách nhiệm cho sự kích thích CD69 ở tế bào T không phụ thuộc đích.

Sự điều hòa ngược CD69 mạnh ở tế bào T bởi cấu trúc kháng thể kháng-Đích H-scFc khi không có tế bào u là do sự biểu hiện của Đích H ở tế bào T.

Nguyên liệu và phương pháp

1. **Đích I**

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích do phân tử BiTE® chứa Fc chuỗi đơn gây ra đối với cấu trúc sau:

1. Cấu trúc kháng thể BiTE® (pha loãng theo dãy: 1,3 pM – 20 nM)
    1. Đích I-scFc
2. Tế bào hiệu ứng PBMC người (3 thể cho)
3. thời gian ủ 48 giờ
4. Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy đối với sự biểu hiện CD69 trên tế bào T CD4+ và CD8+ bằng cách sử dụng mAb được tiếp hợp với PE-Cy7 đặc hiệu đối với CD69.

2. **Đích D**

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích do các phân tử BiTE® chứa Fc chuỗi đơn, hetero-Fc hoặc thể dung hợp thể lai ở đầu tận cùng C gây ra được đánh giá đối với cấu trúc sau:

1. Cấu trúc kháng thể BiTE® (pha loãng theo dãy: 1,3 pM – 20 nM)
    1. Đích D-hetFc (hetero-Fc)
    2. Đích D-scFc
    3. Đích D-Thể X (Đích D Thể lai)
2. Tế bào hiệu ứng PBMC người (3 thể cho)
3. thời gian ủ 48 giờ
4. Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy đối với sự biểu hiện CD69 trên tế bào T CD4+ và CD8+ bằng cách sử dụng mAb được tiếp hợp với PE-Cy7 đặc hiệu đối với CD69.

3. **Đích C**

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích do các phân tử BiTE® chứa Fc chuỗi đơn, hetero-Fc hoặc thể dung hợp thể lai ở đầu tận cùng C gây ra được đánh giá đối với cấu trúc sau:

1. Cấu trúc kháng thể BiTE® (pha loãng theo dãy: 1,3 pM – 20 nM)

1. Đích C-chính tắc
2. Đích C-scFc
3. Đích C-hetFc
4. Đích C-Thể X

2. Tế bào hiệu ứng PBMC người (3 thể cho)
3. thời gian ủ 48 giờ
4. Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy đối với sự biểu hiện CD69 trên tế bào T CD4+ và CD8+ bằng cách sử dụng mAb được tiếp hợp với PE-Cy7 đặc hiệu đối với CD69.

4. Đích B

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích do các phân tử BiTE® chứa Fc chuỗi đơn, hetero-Fc hoặc thể dung hợp thể lai ở đầu tận cùng C gây ra được đánh giá đối với cấu trúc sau:

1. Cấu trúc kháng thể BiTE® (pha loãng theo dãy: 1,3 pM – 20 nM)
    1. Đích B-scFc
    2. Đích B-hetFc
    3. Đích B-Thể X
2. Tế bào hiệu ứng PBMC người (3 thể cho)
3. thời gian ủ 48 giờ
4. Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy đối với sự biểu hiện CD69 trên tế bào T CD4+ và CD8+ bằng cách sử dụng mAb được tiếp hợp với PE-Cy7 đặc hiệu đối với CD69.

5. Đích A

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích do các phân tử BiTE® chứa Fc chuỗi đơn, hetero-Fc hoặc thể dung hợp thể lai ở đầu tận cùng C gây ra được đánh giá đối với cấu trúc sau:

1. Cấu trúc kháng thể BiTE® (pha loãng theo dãy: 1,3 pM – 20 nM)
    1. Đích A-scFc
    2. Đích A-hetFc
    3. Đích A-Thể X
2. Tế bào hiệu ứng PBMC người (3 thể cho)

3. thời gian ủ 48 giờ
4. Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy đối với sự biểu hiện CD69 trên tế bào T CD4+ và CD8+ bằng cách sử dụng mAb được tiếp hợp với PE-Cy7 đặc hiệu đối với CD69.

6. Đích F

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích do các phân tử BiTE® chứa Fc chuỗi đơn hoặc hetero-Fc gây ra được đánh giá đối với cấu trúc sau:

1. Cấu trúc kháng thể BiTE® (pha loãng theo dãy: 1,3 pM – 20 nM)
    1. Đích F-chính tắc
    2. Đích F-scFc
    3. Đích F-hetFc
2. Tế bào hiệu ứng PBMC người (3 thể cho)
3. thời gian ủ 48 giờ
4. Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy đối với sự biểu hiện CD69 trên tế bào T CD4+ và CD8+ bằng cách sử dụng mAb được tiếp hợp với PE-Cy7 đặc hiệu đối với CD69.

7. Đích E

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích do các phân tử BiTE® chứa Fc chuỗi đơn hoặc hetero-Fc gây ra được đánh giá đối với cấu trúc sau:

1. Cấu trúc kháng thể BiTE® (pha loãng theo dãy: 1,3 pM – 20 nM)
    1. Đích E-chính tắc
    2. Đích E-scFc
    3. Đích E-hetFc
2. Tế bào hiệu ứng PBMC người (3 thể cho)
3. thời gian ủ 48 giờ
4. Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy đối với sự biểu hiện CD69 trên tế bào T CD4+ và CD8+ bằng cách sử dụng mAb được tiếp hợp với PE-Cy7 đặc hiệu đối với CD69.

8. Đích H

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích do phân tử BiTE® chứa Fc chuỗi đơn gây ra được đánh giá đối với cấu trúc sau:

1. Cấu trúc kháng thể BiTE® (pha loãng theo dãy: 1,3 pM – 20 nM)
    1. Đích H-scFc
2. Tế bào hiệu ứng PBMC người (3 thể cho)
3. thời gian ủ 48 giờ
4. Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy đối với sự biểu hiện CD69 trên tế bào T CD4+ và CD8+ bằng cách sử dụng mAb được tiếp hợp với PE-Cy7 đặc hiệu đối với CD69.

9. Đích G

Sự hoạt hóa tế bào T không phụ thuộc đích do phân tử BiTE® chứa Fc chuỗi đơn gây ra được đánh giá đối với cấu trúc sau:

1. Cấu trúc kháng thể BiTE® (pha loãng theo dãy: 1,3 pM – 20 nM)
    1. Đích G-scFc
2. Tế bào hiệu ứng PBMC người (3 thể cho; tế bào $CD14^+/CD33^+$ suy kiệt)
3. thời gian ủ 48 giờ
4. Phân tích đếm tế bào theo dòng chảy đối với sự biểu hiện CD69 trên tế bào T CD4+ và CD8+ bằng cách sử dụng mAb được tiếp hợp với PE-Cy7 đặc hiệu đối với CD69.

[4] Ví dụ 2:

Cấu trúc kháng thể BiTE® đã tinh chế được phủ lên đĩa Maxisorb với nồng độ giảm dần (100nM, tỷ lệ pha loãng 1:4). Sau 3x rửa bằng PBS-T và chặn bằng PBS/3% (trọng lượng/thể tích) BSA (60 phút, 37°C), huyết thanh người thu gom được ủ trong 60 phút, 80 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau 3x rửa, kháng thể đơn dòng chuột đặc hiệu với A (CC1q) dưới đơn vị C1q người được bổ sung vào (Thermo MA1-83963, 1:500) trong 60 phút, 80 vòng/phút, nhiệt độ trong phòng, sau bước rửa được mô tả, mAb kháng Fc-POX chuột của dê (1:5.000) được ủ trong 60 phút, 80 vòng/phút, nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa thêm, chất nền TMB được ủ và làm ngừng sau phản ứng đo màu bằng cách bổ sung H_2SO_4. Độ hấp thụ được xác định ở 450 nm.

Kết quả: Như được thể hiện trên Fig. 4 ở nồng độ cao, cấu trúc BiTE® hetero Fc (hình vuông) thể hiện tín hiệu liên kết cao hơn đối với CC1q người so với cấu trúc BiTE® Fc chuỗi đơn (hình tam giác). Được lấy làm mẫu đối chứng âm, BiTE®chính tắc (hình tròn) được sử dụng, không thể hiện sự liên kết CC1q đáng kể.

Ví dụ 3: Dược động học của cấu trúc kháng thể BiTE® được dung hợp với các dạng kéo dài thời gian bán thải

Các cấu trúc kháng thể BiTE® liên kết đích khác nhau được dung hợp với bốn dạng kéo dài thời gian bán thải khác nhau. Tất cả các biến thể HLE khác nhau có sẵn trên mỗi kháng thể BiTE® được thử nghiệm ở khỉ cynomolgus trong phạm vi thử nghiệm dược động học (pharmacokinetic: PK). Sau đó, chúng được gọi là BiTE®-scFc, BiTE®-hetFc, BiTE®-HALB, BiTE®-thể X, theo dạng kéo dài thời gian bán thải được gắn với chất liên kết đích. Phân tử BiTE® không HLE được gọi là BiTE® "chính tắc". Danh pháp tương ứng của các phân tử này được tóm tắt trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4 Danh pháp hợp chất của các phân tử BiTE® liều đơn

Từ đồng nghĩa của hợp chất	Tên hợp chất thử nghiệm
Hợp chất 1a	Đích C -scFc
Hợp chất 1b	Đích C -hetFc
Hợp chất 1c	Đích C-HALB
Hợp chất 2a	Đích A -scFc
Hợp chất 2b	Đích A -hetFc
Hợp chất 2c	Đích A-HALB
Hợp chất 2d	Đích A-thể X
Hợp chất 3a	Đích B-scFc
Hợp chất 3b	Đích B -hetFc

Từ đồng nghĩa của hợp chất	Tên hợp chất thử nghiệm
Hợp chất 3c	Đích B-HALB
Hợp chất 3d	Đích B-H6
Hợp chất 4a	Đích D-scFc
Hợp chất 4b	Đích D-hetFc
Hợp chất 5a	Đích E -scFc
Hợp chất 5b	Đích E -hetFc
Hợp chất 5c	Đích E-HALB
Hợp chất 6a	Đích F-scFc
Hợp chất 6b	Đích F-HALB
Hợp chất 7	Đích G-scFc
Hợp chất 8	Đích H-scFc
Hợp chất 9	Đích I cc-scFc
Hợp chất 10a	BCMA (cc)-scFc
Hợp chất 10b	BCMA (BiTE® chính tắc)

Các phân tử BiTE® được sử dụng ở dạng liều lớn trong tĩnh mạch (các hợp chất 1b, 2a-d, 3a/b, 4a/b, 5a-5c, 7-9) và truyền trong tĩnh mạch (các hợp chất 1a, 1c, 3c/d, 6a/b, mỗi loại truyền 30 phút). Các phân tử BiTE® được sử dụng theo khoảng liều tuyến tính có liên quan về dược động học lần lượt từ 3 µg/kg đến 6 µg/kg, 12 µg/kg và 15 µg/kg. Hợp chất 10a được sử dụng ở dạng tiêm liều lớn trong tĩnh mạch thời gian ngắn, cấu trúc chính tắc (hợp chất 10b) ở dạng truyền trong tĩnh mạch liên tục. Để so sánh các thông số dược động học của cả hai hợp chất 10a và 10b, chỉ pha cuối bắt đầu ngay sau khi kết thúc việc truyền được thể hiện trên Fig. 5 đối với BCMA-BiTE® chính tắc. Các phân tử BCMA

BiTE® được sử dụng theo khoảng liều tuyến tính có liên quan về dược động học lần lượt là 15 µg/kg. Đối với các lý do về khả năng so sánh các nồng độ huyết thanh được nêu trên Fig. 5 được chuẩn hóa liều và chuẩn hóa theo trọng lượng phân tử (được mô tả ở dạng nmol). Đối với mỗi hợp chất có tên nêu trên, một nhóm gồm ít nhất hai đến ba con vật được sử dụng. Các mẫu máu được thu gom và huyết thanh được chuẩn bị để xác định nồng độ huyết thanh. Các mức kháng thể BiTE® trong huyết thanh được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch. Mức BCMA BiTE® trong huyết thanh được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch mà sử dụng một cặp kháng thể idiotyp kháng CD3 để phủ và phát hiện các phân tử BiTE®. Profin nồng độ huyết thanh-thời gian được sử dụng để xác định các thông số PK. Thiết lập thử nghiệm thích hợp được điều chỉnh theo các đặc tính của các phân tử BiTE®: khoảng thời gian 1 tuần hoặc 2 tuần. Các thời điểm lấy mẫu máu có thể thay đổi nhẹ và được liệt kê về cả hai mức thiết lập trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5 Thời điểm lấy mẫu máu trong thử nghiệm PK. Thời điểm này có thể thay đổi giữa các thử nghiệm riêng lẻ. Thời điểm được đánh dấu hoa thị là áp lực và thông thường đối với tất cả các thử nghiệm

	thời điểm lấy mẫu máu trong khoảng thời gian thử nghiệm 1 tuần [giờ]	thời điểm lấy mẫu máu trong khoảng thời gian thử nghiệm 2 tuần [giờ]	thời điểm lấy mẫu máu đối với hợp chất 10a; [giờ] sau khi bắt đầu truyền	thời điểm lấy mẫu máu đối với hợp chất 10b; [giờ] sau khi bắt đầu truyền
	0,05 / 0,085*	0,05 / 0,085*	0,085	
	0,25	0,25	0,25	
	0,5	0,5	0,5	
	1	1	1	
	2	2		
	4*	4*	4	
	8	8	8	

	24 16	16		
	24*	24*	24	
	48*	48*	48	
	72*	72*	72	
	96	96		
	120	120		
	144	144		
	168*	168*	168	168,00
		216		169,01
		240	240	172,01
		264		175,99
		336*	336	180,00

Dược động học của phân tử BiTE®-HLE được minh họa trong Bảng 6. Mỗi nhóm hợp chất là cho cùng một protein BiTE® được dung hợp với dạng scFc-, hetFc-, HSA- (albumin huyết thanh người, HALB) hoặc thể lai-Fc, hoặc để ở dạng phân tử BiTE® chính tắc. Đối với tất cả các protein, các mức huyết thanh có thể được định lượng đối với tất cả các thời điểm ở tất cả các con vật sau khi sử dụng phân tử BiTE®. Profin PK mô tả đường giảm theo hàm mũ, hai pha sau mỗi lần sử dụng một mục thử nghiệm.

Các thông số dược động học được xác định bằng cách sử dụng phương pháp phân tích không khoanh vùng (non-compartmental analysis: NCA) tiêu chuẩn. Sử dụng phân tích không khoanh vùng, các thông số PK sau đây được đánh giá: AUC_{inf} (diện tích dưới đường cong nồng độ huyết thanh- thời gian), Vss (thể tích phân bố ở trạng thái ổn định), CL (độ thanh thải toàn thân) và t1/2 cuối (thời gian bán thải cuối).

Các thông số PK cho mỗi hợp chất thử nghiệm được tóm tắt ở dạng giá trị trung bình của lần lượt n=2 và n=3, trong Bảng 6 dưới đây.

Bảng 6 Các thông số dược động học của các biến thể HLE từ các chất kết dính BiTE®-đích khác nhau ở khỉ cynomolgus.

Mục thử nghiệm	$t_{1/2}$ cuối [h]	AUC_{inf} chuẩn hóa đến 15 µg/kg [h*ng/mL]	Cl [mL/h/kg]	Vss [mL/kg]
Hợp chất 1a	167	9981	1,4	256
Hợp chất 1b	95	6159	2,4	235
Hợp chất 1c	47	4498	3,3	161
Hợp chất 2a	213	41173	0,4	89
Hợp chất 2b	116	18745	0,8	78
Hợp chất 2c	77	28928	1,0	65
Hợp chất 2d	77	9825	1,5	112
Hợp chất 3a	61	4109	3,7	129
Hợp chất 3b	59	4561	3,3	78
Hợp chất 3c	51	2769	6,8	299
Hợp chất 3d	3	510	30,0	653
Hợp chất 4a	97	7816	1,9	181
Hợp chất 4b	62	3606	4,2	292
Hợp chất 5a	234	30954	0,5	144
Hợp chất 5b	173	18299	0,8	166

Mục thử nghiệm	$t_{1/2}$ cuối [h]	AUC_{inf} chuẩn hóa đến 15 µg/kg [h*ng/mL]	Cl [mL/h/kg]	Vss [mL/kg]
Hợp chất 5c	142	26418	0,6	103
Hợp chất 6a	97	15854	1,0	103
Hợp chất 6b	48	77271	1,0	64
Hợp chất 7	64	1971	7,6	395
Hợp chất 8	122	17093	0,9	119
Hợp chất 9	210	6729	2,2	540
Hợp chất 10a	112	18772	0,8	110
Hợp chất 10b	3	1677	62,6	5268

Thông thường, profin PK đối với các phân tử BCMA-BiTE® chính tắc mô tả profin nồng độ huyết thanh giảm dần rất dốc liên quan đến cơ chế thanh thải của các protein chính tắc này. BiTE®-scFc nhắm đích BCMA được kéo dài thời gian bán thải thể hiện đường giảm theo hàm mũ, hai pha sau mỗi lần sử dụng một mục thử nghiệm ở khỉ cynomolgus.

Tóm lại, phân tử BCMA-BiTE® được dung hợp với dạng scFc HLE (Hợp chất 10a) thể hiện AUC_{inf} trung bình là 18772 h*ng/mL, độ thanh thải toàn thân là 0,8 mL/h/kg, cũng như thể tích tương ứng của sự phân bố là 110 mL/kg. Hợp chất 10b, BiTE® nhắm đích BCMA không kéo dài thời gian bán thải, chính tắc thể hiện độ thanh thải cao là 62,6 mL/h/kg dẫn đến sự tiếp xúc huyết thanh thấp là 1677 h*ng/mL.

Sự khác biệt về đặc tính dược động học của hai dạng BCMA BiTE® khác nhau được thử nghiệm toàn diện mô tả ưu điểm của BiTE®-scFc nhắm đích BCMA được kéo dài thời

gian bán thải hơn bản chính tắc tương ứng, đặc biệt là về mặt thời gian lưu của chất trong cơ thể.

Tóm lại, AUC_{inf} của các chất liên kết đích BiTE® khác nhau được dung hợp lần lượt với mỗi dạng –scFc, –hetFc, HAS hoặc thể lai HLE nằm trong khoảng từ 1971 h*ng/mL đến 77271 h*ng/mL, tùy thuộc vào phạm vi đích BiTE®. Tất cả các thể dung hợp HLE được phân tích đạt được độ thanh thải toàn thân là 0,4 đến 7,6 mL/h/kg. Thể tích tương ứng của sự phân bố nằm trong khoảng từ 68 đến 540 mL/kg. Hợp chất 3d, chất liên kết đích BiTE® hợp chất 3 không được kéo dài thời gian bán thải, chính tắc, được lấy được lấy làm mẫu đối chứng. Các phân tử BiTE® không được kéo dài thời gian bán thải thể hiện độ thanh thải cao, sự tiếp xúc huyết thanh giảm và kết quả là thời gian bán thải cuối ngắn. Sự so sánh thời gian bán thải cuối bởi dạng được tóm tắt trong Bảng 7.

Bảng 7 So sánh thời gian bán thải cuối bởi dạng được nghiên cứu ở khỉ cynomolgus.

Dạng HLE	$t_{1/2}$ **[giờ]**
BiTE® chính tắc	3
BiTE®-scFc	61-234
BiTE®-hetFc	48-173
BiTE®-HALB	47-142
BiTE®-Thể lai	77

Nghiên cứu tới bốn nhóm kéo dài thời gian bán thải (half-life-extending: HLE) khác nhau trên một BiTE® nhắm đích, rõ ràng rằng nhóm -scFc thể hiện sự tăng $t_{1/2}$ so với các nhóm kéo dài thời gian bán thải tương ứng khác sau khi sử dụng liều đơn thấp là 6, 10, 12 và 15 µg/kg (xem Fig. 6).

Ví dụ 4:

Các dược chất được bào chế sơ bộ lần lượt chứa Đích A-hALB, Đích A-hFc, và Đích A-scFc đã được tinh chế được trao đổi đệm bằng cách siêu lọc / lọc tuần hoàn có pha loãng bằng cách sử dụng màng có trọng lượng phân tử cắt (molecular weight cut-off: MWCO) là 10 kDa. Thành phẩm đạt được bằng cách bổ sung dung dịch gốc cô đặc. Các chế phẩm thu được cho mỗi cấu trúc được liệt kê trong Bảng 8. Nồng độ protein đích là 1,0 mg/mL. Cấu trúc Đích A tạo ra được nạp đến 1 mL vào lọ thủy tinh loại I mà được đậy bằng nút cao su butyl và được gấp nếp bằng lớp đệm nhôm. Lọ đã được nạp được ủ ở -20, 5, 25 và 37°C. Một lọ chứa mỗi phiên bản được xử lý bằng năm chu kỳ đông lạnh và tan giá (F/T). Nhiệt độ đông lạnh đích là -29°C. Nhiệt độ tan giá đích là 2°C. Tốc độ thay đổi là khoảng 0,3 K/phút.

Các hạt nhìn thấy được đánh giá theo phương pháp được mô tả bởi Ph Eur 2.9.20 bởi người vận hành đã được đào tạo. Lượng hạt nhìn thấy được trong mỗi lọ được nêu trong Bảng 8. Số lượng các hạt có protein nhìn thấy được (lớn hơn 125 µm) là cao hơn đối với Đích A-hFc khi so với cả Đích A-hALB và Đích A-scFc.

Bảng 8: Số lượng các hạt có protein nhìn thấy được trong mỗi lọ đối với các mẫu chịu áp lực và không chịu áp lực (T0) chứa các cấu trúc kháng thể kháng Đích A BiTE® kéo dài thời gian bán thải khác nhau.

Cấu trúc	**hALB**	**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
Số lượng các hạt có protein nhìn thấy được (>125 µm) trong mỗi lọ					
T0	0	0	1	0	0
5 chu kỳ F/T	0	2	2	0	1
2 tuần 5°C	0	2	2	0	0
2 tuần 25°C	0	2	1	0	0
2 tuần 37°C	0	2	2	0	0
4 tuần - 20°C	0	2	1	0	0
4 tuần 5°C	0	1	2	0	0

4 tuần 25°C	0	2	2	0	0
4 tuần 37°C	0	2	2	0	0

Các mẫu nêu trên cũng được phân tích bằng sắc ký tính năng siêu cao loại trừ theo kích thước (size exclusion ultra-high performance chromatography: SE-UPLC) để định lượng tỷ lệ phần trăm của các loại có trọng lượng phân tử cao (high molecular weight species: HMWS). SE-UPLC được thực hiện trên hệ AcquityH-Class UPLC (Waters) sử dụng cột Acquity UPLC BEH200 SEC 150 mm (Waters). Nhiệt độ cột được đặt ở 25°C. Việc tách các biến thể kích thước đạt được bằng cách sử dụng phương pháp isocratic với tốc độ chảy là 0,4 mL/phút. Pha động gồm 100 mM natri phosphat, 250 mM NaCl ở pH = 6,8. Tổng thời gian chạy là 6,0 phút. Các mẫu được giữ ở 8°C trong dụng cụ lấy mẫu tự động cho đến khi phân tích. Tổng lượng 3 µg protein được tiêm. Để tránh việc tiêu tán, việc tiêm trung gian với 40% axetonitril được thực hiện sau mỗi mẫu. Việc phát hiện được dựa vào sự phát huỳnh quang (kích thích ở 280 nm, phát sáng ở 325 nm). Tích hợp đỉnh được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm Empower®. Diện tích tương đối dưới đường cong HMWS được ghi lại (Bảng 9).

Các cấu trúc dựa trên Fc thể hiện hàm lượng HMWS thấp hơn trong chế phẩm biến thể G40MSuT so với trong K60RTrT độc lập với điều kiện áp lực. Rõ ràng là Đích A-scFc chứa ít HMWS hơn so với Đích A-hFc ở cả chế phẩm G40MSuT lẫn K60RTrT. Đích A-scFc trong chế phẩm được ưu tiên của nó (G40MSuT) ít tạo thành HMWS hơn so với Đích A-hALB được tạo ra trong K60RTrT. Trong các thử nghiệm trước đó, dung dịch đệm này thể hiện điện thế làm ổn định được cải thiện đối với cấu trúc dựa trên hALB.

Bảng 9: Phân tích hàm lượng HMWS trong các chế phẩm chịu áp lực và không chịu áp lực (T0) chứa Đích A-hALB, -hFc, và -scFc được xác định nhờ SE-UPLC

Cấu trúc	**hALB**	**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
%HMWS					
T0	1,8	6,7	3,3	2,5	1,3
5 chu kỳ	2,0	7,2	4,1	3,0	1,5

F/T					
2 tuần 5°C	n.t.	n.t.	n.t.	2,9	1,1
2 tuần 25°C	n.t.	6,6	2,7	2,4	0,5
2 tuần 37°C	2,6	6,3	2,1	2,7	0,3
4 tuần -20°C	5,9	8,7	1,6	6,6	0,3
4 tuần 5°C	2,0	8,2	2,8	3,6	0,6
4 tuần 25°C	2,2	6,8	2,6	2,7	0,4
4 tuần 37°C	3,5	7,6	1,9	4,3	0,3

n.t. = không được thử nghiệm

Độ phong phú về biến đổi hóa học do áp lực nhiệt (ủ ở 37°C) được kiểm tra bằng ánh xạ peptit. Các mẫu protein được tiêu hóa bằng enzym và các peptit thu được được tách bằng cách sử dụng sắc ký pha đảo. Nước giải hấp ở cột được tiêm trực tiếp vào nguồn ion của khối phổ kế để nhận dạng và định lượng peptit.

Để đạt được sự bao phủ tối đa, tiến hành tiêu hóa bằng enzym hai lần riêng biệt: một lần bằng trypsin và một lần bằng chymotrypsin. Trong mỗi trường hợp, các protein được làm biến tính bằng guanidin clorua và sau đó khử bằng dithiothreitol (DTT). Sau khi ủ trong DTT, các gốc xystein tự do được alkyl hóa bằng cách bổ sung axit iodoaxetic. Sau đó, các mẫu được trao đổi đệm trong 50 mM Tris pH = 7,8 để tiêu hóa. Trypsin và chymotrypsin được bổ sung vào các ống phản ứng riêng biệt với mỗi tỷ lệ 1:10 (mẫu:enzym). Các mẫu được tiêu hóa trong 30 phút ở 37°C và phản ứng được dừng bằng cách bổ sung axit trifloaxetic.

Lượng nạp 5 µg mỗi lần tiêu hóa được tiêm riêng biệt lên cột pha đảo Zorbax SB-C18 (Agilent #859700-902) được làm cân bằng trong 0,1% (thể tích/thể tích) axit formic (FA). Gradien 156 phút của tối đa 90% axetonitril chứa 0,1% FA được sử dụng để tách rửa các peptit trực tiếp trong nguồn ion phun điện tử của khối phổ kế Q-Exactive Plus (Thermo Scientific). Số liệu được thu gom theo cách phụ thuộc dữ liệu bằng cách sử dụng phương pháp đỉnh 12 trong đó sự quét đầy đủ (độ phân giải 70 000; khoảng quét

200-2000 m/z) được tiếp theo bởi sự phân ly va chạm năng lượng cao (high energy collision dissociation: HCD) của 12 ion phong phú nhất (độ phân giải 17 500).

Các peptit được nhận dạng dựa vào phổ khối chính xác và phổ khối nối tiếp bằng cách sử dụng phần mềm nội bộ. Việc nhận dạng được thử lại bằng tay. Lượng tương đối của các peptit đã biến đổi và chưa biến đổi được tính toán dựa vào độ phong phú ion bằng cách sử dụng phần mềm Pinpoint (Thermo Scientific).

Tỷ lệ phần trăm biến đổi hóa học của các vùng quyết định bổ trợ (complement determining region: CDR) và phần kéo dài thời gian bán thải (hALB hoặc Fc) được phát hiện trong các chế phẩm Đích A-hALB, -hFc, và -scFc được nêu bởi Bảng 10. Khi so sánh các điều kiện tạo ra giống nhau, hiển nhiên là nói chung biến đổi hóa học là ít phong phú nhất ở cấu trúc scFc.

Bảng 10: Phân tích biến đổi hóa học trong các chế phẩm chịu áp lực và không chịu áp lực chứa (T0) Đích A-hALB, -hFc, và -scFc được xác định nhờ ánh xạ peptit

Cấu trúc	**hALB**	**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
%N101 khử amit (CDR)					
T0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
2 tuần 37°C	0,7	0,8	3,0	0,7	3,2
4 tuần 37°C	1,3	n.t.	8,5	n.t.	6,4
%N162 khử amit (CDR)					
T0	3,0	1,7	1,9	2,3	2,5
2 tuần 37°C	15,9	11,6	2,7	15,0	3,3
4 tuần 37°C	26,8	n.t.	3,7	n.t.	4,1
%M279 oxy hóa (CDR)					
T0	0,6	1,4	1,6	0,6	1,0
2 tuần 37°C	1,2	0,8	0,8	0,6	1,0
4 tuần 37°C	0,9	n.t.	0,8	n.t.	0,6

Cấu trúc	hALB	hFc		scFc	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
%N348 khử amit (CDR)					
T0	0,5	3,2	3,3	0,5	0,9
2 tuần 37°C	20,5	21,6	1,9	9,4	1,3
4 tuần 37°C	22,8	n.t.	2,0	n.t.	2,9
%N351 khử amit (CDR)					
T0	0,2	2,9	2,6	0,5	1,0
2 tuần 37°C	6,6	12,7	0,9	3,8	0,4
4 tuần 37°C	8,7	n.t.	0,8	n.t.	0,8
%M530 oxy hóa (Fc)					
T0	n.a.	3,9	4,1	2,6	3,2
2 tuần 37°C	n.a.	9,0	3,1	4,0	4,3
4 tuần 37°C	n.a.	n.t.	3,4	n.t.	3,5
% N603 khử amit (Fc)					
T0	n.a.	1,3	1,9	1,3	1,4
2 tuần 37°C	n.a.	7,9	4,6	7,0	5,6
4 tuần 37°C	n.a.	n.t.	6,9	n.t.	8,1
%M706 oxy hóa (Fc)					
T0	n.a.	3,2	3,6	1,5	2,1
2 tuần 37°C	n.a.	6,0	2,8	2,1	2,5
4 tuần 37°C	n.a.	n.t.	2,6	n.t.	2,0
%M587 oxy hóa (hALB)					
T0	1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 tuần 37°C	2,2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Cấu trúc	hALB	hFc		scFc	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
4 tuần 37°C	2,3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%M623 oxy hóa (hALB)					
T0	1,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 tuần 37°C	2,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4 tuần 37°C	3,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%M798 oxy hóa (hALB)					
T0	1,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 tuần 37°C	3,3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4 tuần 37°C	3,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%M829 oxy hóa (hALB)					
T0	8,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2 tuần 37°C	42,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4 tuần 37°C	44,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. = không có; n.t. = không được thử nghiệm

Ví dụ 5:

Đích A-hALB, -hFc, -scFc được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 4 được xử lý bằng thử nghiệm tăng độ pH. Nồng độ của nguyên liệu ban đầu là 1,0 mg/mL. Thể tích 0,38 mL mỗi nguyên liệu ban đầu được nạp vào lọ thủy tinh. Sau khi xử lý sơ bộ ở 37°C, dung dịch được tăng đột ngột bằng nước muối đệm phosphat (phosphate buffered saline: PBS) gấp 20 lần gồm 0,090 M kali phosphat, 0,480 M natri phosphat (cả hai là điaxit), 0,052 M kali clorua và 2,76 M NaCl. Các mẫu đã được tăng đột ngột này được ủ ở 37°C trong hai tuần. Sau khi ủ, chúng được phân tích bằng SE-UPLC bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4 và tỷ lệ phần trăm của HMWS được ghi lại (bảng 11). Khi so sánh tất cả cấu trúc được tạo ra trong K60RTrT, hàm lượng HMWS được tăng theo thứ

tự sau: hALB < scFc < hFc. Đích A-scFc cũng thể hiện hàm lượng HMWS thấp hơn so với Đích A-hFc khi được tạo ra trong G40MSuT.

Bảng 11: Phân tích hàm lượng HMWS trong các chế phẩm chịu áp lực (tăng độ pH + 2 tuần 37°C) chứa Đích A-hALB, -hFc, và -scFc được xác định nhờ SE-UPLC

Cấu trúc	**hALB**	**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
%HMWS					
2 tuần 37°C	1,5	8,3	7,1	5,4	5,1

Ví dụ 6:

Đích A-hALB, -hFc, và -scFc được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 4 được xử lý bằng áp lực khuấy. Nồng độ của nguyên liệu ban đầu là 1,0 mg/mL. Thể tích 0,5 mL của mỗi dung dịch được lọc qua bộ lọc thích hợp 0,22 µm và được nạp vào lọ thủy tinh 3cc. Các lọ được đặt trong hộp nhựa đảm bảo rằng các lọ không bị dịch chuyển trong hộp trong quá trình khuấy. Hộp được đặt trên máy lắc theo quỹ đạo. Các mẫu được khuấy ở 500 vòng/phút trong 65 giờ. Các hạt nhìn thấy được được đánh giá theo phương pháp được mô tả bởi Ph Eur 2.9.20. Phương pháp này được thực hiện bởi người vận hành đã được đào tạo. Lượng hạt nhìn thấy được trong mỗi lọ được nêu trong bảng 12. Các hạt có protein nhìn thấy được chỉ được quan sát ở chế phẩm Đích A-hFc.

Bảng 12: Số lượng các hạt có protein nhìn thấy được trong mỗi lọ trong các mẫu được khuấy

Cấu trúc	**hALB**	**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
Số lượng các hạt có protein nhìn thấy được (>125 µm) trong mỗi lọ					
65h, 500 vòng/phút	0	1	1	0	0

Các mẫu nêu trên cũng được phân tích bằng sắc ký tính năng siêu cao loại trừ theo kích thước (SE-UPLC) để định lượng tỷ lệ phần trăm của các loại có trọng lượng phân tử cao (HMWS). Phương pháp giống như vậy như được mô tả trong Ví dụ 4 được áp dụng. Hàm lượng HMWS của các mẫu được khuấy được nêu bởi Bảng 13. Sự tạo thành HMWS là rõ rệt nhất trong Đích A-hFc khi so sánh các chế phẩm K60RTrT. HMWS là phong phú hơn trong Đích A-hFc so với trong Đích A-scFc.

Bảng 13: Phân tích hàm lượng HMWS trong chế phẩm chịu áp lực (tăng độ pH + 2 tuần 37°C) chứa Đích A-hALB, -hFc, và -scFc được xác định nhờ SE-UPLC

Cấu trúc	**hALB**	**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
%HMWS					
65h, 500 vòng/phút	1,8	5,8	2,4	1,8	0,3

Ví dụ 7:

Đích A-hALB, -hFc, và -scFc được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 4 được tiếp xúc với ánh sáng nhìn thấy được và ánh sáng UVA (áp lực quang). Nồng độ protein tổng là 1 mg/mL ở tất cả các chế phẩm. Dung dịch protein được lọc bằng cỡ lỗ 0,22 µm và được nạp đến 0,5 mL trong lọ thủy tinh loại I. Đích A-hALB và -scFc được xử lý bằng hai thử nghiệm khác nhau bao gồm lần lượt là 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 25 W*h/m^2 ánh sáng UVA và 1,2MLux ánh sáng nhìn thấy / 173 W*h/m^2. Đích A-hFc được xử lý bằng hai thử nghiệm khác nhau bao gồm lần lượt là 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy mà không có ánh sáng UVA và 1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 30 W*h/m^2 ánh sáng UVA. Nhiệt độ buồng được điều chỉnh đến 25°C. Sau khi tiếp xúc ánh sáng, các mẫu được phân tích bằng cách xem xét bằng mắt (Bảng 14), SE-UPLC (Bảng 15) và ánh xạ peptit (Bảng 16). Các phương pháp nêu trên được thực hiện theo các quy trình được mô tả trong Ví dụ 4. Mặc dù Đích A-hALB, và -scFc được tiếp xúc với lượng ánh sáng UVA cao hơn, song không quan sát thấy các hạt có protein nhìn thấy được trong khi mẫu Đích A-hFc thể hiện một hạt có protein nhìn thấy được trong mỗi lọ cho cả hai thử nghiệm không kể chế phẩm.

Bảng 14: Phân tích số lượng các hạt có protein nhìn thấy được trong mỗi lọ trong chế phẩm Đích A-hALB, -hFc, và -scFc được xác định sau khi tiếp xúc ánh sáng

Cấu trúc	**hALB**	**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
Số lượng các hạt có protein nhìn thấy được (>125 µm) trong mỗi lọ					
T0	0	0	1	0	0
Thử nghiệm 1	0[1)]	1[2)]	1[2)]	0[1)]	0[1)]
Thử nghiệm 2	0[3)]	1[4)]	1[4)]	0[3)]	0[3)]

[1)] 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 25 W*h/m^2 ánh sáng UVA, [2)] 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy mà không có ánh sáng UVA,

[3)] 1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 173 W*h/m^2, [4)] 1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 30 W*h/m^2

HMWS tăng theo thứ tự sau Đích A-hALB < -scFc < -hFc khi protein được tạo ra trong K60RTrT. HMWS có thể giảm đối với cấu trúc dựa trên Fc khi được tạo ra trong G40MSuT. Tuy nhiên, HMWS là ít rõ ràng hơn đối với Đích A-scFc. Đích A-hFc thể hiện là đặc biệt nhạy với sự tiếp xúc ánh sáng UVA.

Bảng 15: Phân tích hàm lượng HMWS trong chế phẩm Đích A-hALB, -hFc, và -scFc được xác định sau khi tiếp xúc ánh sáng nhờ SE-UPLC

Cấu trúc	**hALB**	**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
%HMWS					
T0	1,8	6,7	3,3	2,5	1,3
Thử nghiệm 1	1,8[1)]	6,3[2)]	2,5[2)]	2,1[1)]	0,4[1)]
Thử	2,0[3)]	11,0[4)]	2,1[4)]	2,4[3)]	0,3[3)]

nghiệm 2					

[1)] 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 25 W*h/m^2 ánh sáng UVA, [2)] 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy mà không có ánh sáng UVA,

[3)] 1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 173 W*h/m^2, [4)] 1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 30 W*h/m^2

Tỷ lệ phần trăm của biến đổi hóa học của vùng quyết định bổ trợ (CDR) và của phần kéo dài thời gian bán thải (hALB hoặc Fc) được phát hiện ở chế phẩm Đích A-hALB, -hFc, và -scFc được nêu bởi Bảng 16. Khi so sánh các điều kiện tạo ra như nhau, rõ ràng rằng nói chung biến đổi hóa học ít phong phú nhất ở cấu trúc scFc.

Bảng 16: Phân tích biến đổi hóa học ở chế phẩm Đích A-hALB, -hFc, và -scFc được xác định sau khi tiếp xúc ánh sáng bằng ánh xạ peptit

Cấu trúc	**hALB**	**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
%N101 khử amit (CDR)					
T0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
Thử nghiệm 1	0,2[1)]	n.t.	0,3[2)]	n.t.	0,5[1)]
Thử nghiệm 2	0,2[3)]	n.t.	0,6[4)]	n.t.	0,7[3)]
%N162 khử amit (CDR)					
T0	3,0	1,7	1,9	2,3	2,5
Thử nghiệm 1	3,0[1)]	n.t.	2,1[2)]	n.t.	2,7[1)]
Thử nghiệm 2	3,6[3)]	n.t.	3,1[4)]	n.t.	2,8[3)]
%M279 oxy hóa (CDR)					
T0	0,6	1,4	1,6	0,6	1,0

Cấu trúc	hALB	hFc		scFc	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
Thử nghiệm 1	0,8[1)]	n.t.	2,6[2)]	n.t.	0,6[1)]
Thử nghiệm 2	1,0[3)]	n.t.	6,3[4)]	n.t.	0,7[3)]
%N348 khử amit (CDR)					
T0	0,5	3,2	3,3	0,5	0,9
Thử nghiệm 1	0,4[1)]	n.t.	2,7[2)]	n.t.	0,2[1)]
Thử nghiệm 2	0,9[3)]	n.t.	3,9[4)]	n.t.	0,2[3)]
%N351 khử amit (CDR)					
T0	0,2	2,9	2,6	0,5	1,0
Thử nghiệm 1	0,4[1)]	n.t.	2,0[2)]	n.t.	0,3[1)]
Thử nghiệm 2	0,5[3)]	n.t.	2,6[4)]	n.t.	0,3[3)]
%M530 oxy hóa (Fc)					
T0	n.a.	3,9	4,1	2,6	3,2
Thử nghiệm 1	n.a.	n.t.	7,6[2)]	n.t.	3,1[1)]
Thử nghiệm 2	n.a.	n.t.	21,8[4)]	n.t.	4,1[3)]
%M706 oxy hóa (Fc)					
T0	n.a.	3,2	3,6	1,5	2,1

Cấu trúc	hALB	hFc		scFc	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
Thử nghiệm 1	n.a.	n.t.	6,5[2)]	n.t.	1,8[1)]
Thử nghiệm 2	n.a.	n.t.	17,8[4)]	n.t.	2,7[3)]
%M587 oxy hóa (hALB)					
T0	1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 1	1,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 2	2,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%M623 oxy hóa (hALB)					
T0	1,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 1	4,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 2	4,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%M798 oxy hóa (hALB)					
T0	1,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 1	2,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 2	3,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%M829 oxy hóa (hALB)					
T0	8,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Cấu trúc	hALB	hFc		scFc	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
Thử nghiệm 1	31,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 2	25,2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. = không có; n.t. = không được thử nghiệm

Ví dụ 8:

Đích A-hALB được tạo ra trong K60RTrT và Đích A-scFc được tạo ra trong G40MSuT theo quy trình được mô tả trong Ví dụ 4. Nồng độ protein tổng là 0,05 mg/mL. Dụng cụ chứa thử nghiệm bằng thủy tinh (borosilicat, loại I, lọ 3cc 13 mm từ West, Art. No. 68000375) và polypropylen (2 mL với vòng O, ví dụ từ Sarstedt, Art No. 72.694.005) được nạp 500 µL dung dịch thử nghiệm. Dung dịch thử nghiệm được để trong năm phút trong dụng cụ chứa thử nghiệm thứ nhất. Sau đó, phần phân ước 150 µL được lấy mẫu để phân tích. Dung dịch thử nghiệm còn lại (350 µL) được chuyển liên tục từ dụng cụ chứa thử nghiệm này sang dụng cụ chứa thử nghiệm tiếp theo (tổng cộng năm dụng cụ chứa). Trong mỗi lọ, dung dịch được để trong năm phút trước khi chuyển tiếp. Đầu pipet giống nhau được sử dụng cho mỗi bước chuyển. Thử nghiệm giống nhau được thực hiện bằng cách sử dụng lọ polycacbonat 30 mL (Nalgene, PCS-000295 có nắp đậy, PP/20-415/ZTPE). Đối với loại dụng cụ chứa này, dụng cụ chứa thứ nhất được nạp 5 mL. Sau khi phần phân ước 150 µL được lấy mẫu, thể tích còn lại được chuyển từ dụng cụ chứa thử nghiệm này sang dụng cụ chứa tiếp theo (theo quy trình nêu trên). Các mẫu được lấy ra từ dụng cụ chứa #1 và #5 được phân tích bằng SE-UPLC (phương pháp như được mô tả trong Ví dụ 4). Ngoài ra, sự phát hiện protein được thực hiện bằng máy phát hiện PDA (280 nm) để xác định nồng độ protein. Thu hồi phần trăm protein từ mỗi dụng cụ chứa thử nghiệm được nêu bởi Bảng 17. Thấy rằng sự thu hồi protein là rõ rệt hơn đối với Đích A-scFc so với đối với Đích A-hALB không kể loại dụng cụ chứa.

Bảng 17: Thu hồi protein từ các loại dụng cụ chứa khác nhau đối với Đích A-hALB, và -scFc được xác định bằng SE-UPLC

Cấu trúc	**hALB**	**scFc**
Chế phẩm	**K60RTrT**	**G40MSuT**
% protein thu hồi (từ danh định)		
Thủy tinh loại I	80,0	92,0
Polypropylen	87,0	97,3
Polycacbonat	87,0	96,0

Ví dụ 9:

[5] Đích A-hALB được tạo ra trong K60RTrT và Đích A-scFc được tạo ra trong K60RTrT và G40MSuT theo quy trình được mô tả trong Ví dụ 4. Nồng độ protein tổng là 1,0 mg/mL. 1950 µL mỗi dung dịch thử nghiệm được làm tăng đột ngột bằng 50 µL dung dịch chuẩn 1000 ppm silic (Specpure từ AlfaAesar, Art.No. 38717) dẫn đến tăng đột ngột 25 ppm. Dung dịch thử nghiệm chưa được làm tăng đột ngột được lấy làm mẫu đối chứng. Dung dịch thử nghiệm được tăng đột ngột cũng như mẫu đối chứng được nạp vào lọ thủy tinh loại I 3cc và được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Tất cả các mẫu được phân tích bằng SE-UPLC theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4 để định lượng HMWS (Bảng 18). Khi được tạo ra trong K60RTrT, Đích A-hALB và -scFc thể hiện sự tăng tương tự HMWS khi tăng đột ngột silic.

Bảng 18: Phân tích hàm lượng HMWS trong chế phẩm Đích A-hALB, và -scFc được xác định nhờ SE-UPLC sau khi tăng đột ngột bằng silic 25 ppm

Cấu trúc	**hALB**	**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
Δ %HMWS (so với mẫu đối chứng chưa được tăng đột ngột)			

Tăng đột ngột 25 ppm	1,0	1,0	0,2

Ví dụ 10:

Dược chất được bào chế sơ bộ lần lượt chứa Đích C (cc)-hALB, Đích C (cc)-hFc, và Đích C (cc)-scFc đã tinh chế được trao đổi đệm bằng cách siêu lọc / lọc tuần hoàn có pha loãng sử dụng màng có trọng lượng phân tử cắt (MWCO) là 10 kDa. Thành phẩm đạt được bằng cách bổ sung dung dịch gốc cô đặc. Chế phẩm thu được đối với mỗi cấu trúc được nêu trong Bảng 19. Nồng độ protein đích là 1,0 mg/mL. Cấu trúc đích C (cc)- đã tạo ra được nạp đến 1 mL vào lọ thủy tinh loại I được đậy bằng nút cao su butyl và được gấp nếp bằng lớp đệm nhôm. Các lọ đã nạp được ủ ở -20, 5, 25 và 37°C. Một lọ chứa mỗi phiên bản được xử lý bằng năm chu kỳ đông lạnh và tan giá (F/T). Nhiệt độ đông lạnh đích là -29°C. Nhiệt độ làm tan giá đích là 2°C. Tốc độ biến đổi là khoảng 0,3 K/phút. Các mẫu nêu trên cũng được phân tích bằng sắc ký tính năng siêu cao loại trừ theo kích thước (SE-UPLC) để định lượng tỷ lệ phần trăm các loại có trọng lượng phân tử cao (HMWS). SE-UPLC được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4. Khi được tạo ra trong K60RTrT, HMWS tăng theo thứ tự sau trong các mẫu không chịu áp lực: scFc < hALB < hFc. Sự tăng ít rõ rệt nhất về HMWS khi có áp lực tan giá được quan sát đối với cấu trúc scFc. Cấu trúc hFc tỏ ra dễ tạo thành HMWS nhất ở -20°C. Hàm lượng HMWS tăng sau bốn tuần bảo quản ở 5°C. Sự tạo thành HMWS trong các điều kiện này là rõ rệt hơn đối với cấu trúc dựa trên Fc so với cấu trúc dựa trên albumin. Trong K60RTrT, sự tăng không đáng kể về HMWS được quan sát ở nhiệt độ bảo quản tăng (25 và 37°C). Khi được tạo ra trong G40MSuT, tất cả các cấu trúc bộc lộ hàm lượng HMWS giống nhau trong các mẫu không chịu áp lực. Sự tăng trong quá trình làm tan giá là rõ rệt hơn đối với cấu trúc dựa trên Fc khi so với cấu trúc dựa trên albumin. Trong G40MSuT, cấu trúc hFc ít ổn định nhất trong quá trình bảo quản ở -20°C. Sự tăng đáng kể về HMWS trong quá trình bảo quản lỏng chỉ được quan sát đối với cấu trúc hALB.

Bảng 19: Phân tích hàm lượng HMWS trong các chế phẩm chịu áp lực và không chịu áp lực (T0) chứa Đích C (cc)-hALB, -hFc, và -scFc được xác định nhờ SE-UPLC

Cấu trúc	hALB		hFc		scFc	
Chế phẩm	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS						
T0	1,5	0,3	2,7	0,3	1,3	0,3
5 chu kỳ F/T	2,0	0,5	3,1	0,7	1,6	0,7
2 tuần - 20°C	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	1,5	0,5
2 tuần 5°C	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	1,8	0,2
2 tuần 25°C	1,7	0,6	2,3	0,2	1,3	0,2
2 tuần 37°C	1,9	0,7	1,8	0,2	1,2	0,2
4 tuần - 20°C	1,6	0,4	4,2	1,5	1,7	0,9
4 tuần 5°C	1,9	0,3	3,3	0,3	2,1	0,4
4 tuần 25°C	1,4	0,6	2,2	0,2	1,4	0,4
4 tuần 37°C	1,3	0,7	2,0	0,1	1,4	0,3

n.t. = không được thử nghiệm

Độ phong phú về biến đổi hóa học khi có áp lực nhiệt (ủ ở 37°C) được kiểm tra bằng ánh xạ peptit theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4. Tỷ lệ phần trăm của biến đổi hóa học của vùng quyết định bổ trợ (CDR) phát hiện các chế phẩm Đích C (cc)-hALB, -hFc, và -scFc được nêu bởi Bảng 20. Nói chung, Đích C (cc)-scFc thể hiện lượng biến đổi hóa học thấp nhất trong CDR. Đặc biệt rõ ràng là việc khử amit CDR là ít rõ rệt nhất đối với cấu trúc scFc.

Bảng 20: Phân tích biến đổi hóa học trong các chế phẩm chịu áp lực và không chịu áp lực (T0) chứa Đích C (cc)-hALB, -hFc, và -scFc được xác định nhờ ánh xạ peptit

Cấu trúc	**hALB**		**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
%M34 oxy hóa (CDR)						
T0	1,0	1,8	1,0	1,4	1,7	1,9
2 tuần 37°C	0,9	1,3	0,9	1,1	1,0	1,7
4 tuần 37°C	n.t.	n.t.	n.t.	1,6	n.t.	1,8
%D103 đồng phân hóa (CDR)						
T0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6
2 tuần 37°C	4,0	4,6	4,5	4,4	5,8	7,3
4 tuần 37°C	n.t.	n.t.	n.t.	8,0	n.t.	12,4
%M290 oxy hóa (CDR)						
T0	0,7	1,4	0,8	1	1,3	1,4
2 tuần 37°C	0,7	1,0	0,8	0,8	0,8	1,3

Cấu trúc	hALB		hFc		scFc	
Chế phẩm	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
4 tuần 37°C	n.t.	n.t.	n.t.	1,2	n.t.	1,6
%N359 khử amit (CDR)						
T0	5,8	11,4	5,3	6,3	0,4	0,5
2 tuần 37°C	19,3	5,8	11,2	2,8	7,0	0,9
4 tuần 37°C	n.t.	n.t.	n.t.	2,9	n.t.	2,2
%N362 khử amit (CDR)						
T0	5,4	8,7	3,9	4,0	0,2	0,3
2 tuần 37°C	13,5	3,6	6,7	1,2	3,1	0,3
4 tuần 37°C	n.t.	n.t.	n.t.	1,4	n.t.	0,7

n.a. = không có; n.t. = không được thử nghiệm

Ví dụ 11:

Đích C (cc)-hALB, -hFc, và -scFc được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 4 được xử lý bằng thử nghiệm tăng độ pH. Nồng độ của nguyên liệu ban đầu là 1,0 mg/mL. Thể tích 0,38 mL của mỗi nguyên liệu ban đầu được nạp vào lọ thủy tinh. Sau khi xử lý sơ bộ ở 37°C, dung dịch được tăng đột ngột bằng nước muối đệm phosphat (PBS) gấp 20 lần gồm 0,090 M kali phosphat, 0,480 M natri phosphat (cả hai là điaxit), 0,052 M kali clorua và 2,76 M NaCl. Các mẫu được tăng đột ngột được ủ ở 37°C trong hai tuần. Sau khi ủ, chúng được phân tích bằng SE-UPLC bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4 và tỷ lệ phần trăm của HMWS được ghi lại (Bảng 21). Các cấu trúc Đích C

(cc)-scFc thể hiện hàm lượng HMWS thấp nhất sau khi tăng độ pH nếu so sánh với Đích C (cc)-hALB và -hFc không kể chế phẩm.

Bảng 21: Phân tích hàm lượng HMWS trong chế phẩm chịu áp lực (tăng độ pH + 2 tuần 37°C) chứa Đích C (cc)-hALB, -hFc, và -scFc được xác định nhờ SE-UPLC

Cấu trúc	hALB		hFc		scFc	
Chế phẩm	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS						
2 tuần 37°C	1,7	4,8	1,6	1,8	1,1	1,5

Ví dụ 12:

Đích C (cc)-hALB, -hFc, và -scFc được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 4 được xử lý bằng áp lực khuấy. Nồng độ của nguyên liệu ban đầu là 1,0 mg/mL. Thể tích 0,5 mL của mỗi dung dịch được lọc qua bộ lọc 0,22 µm thích hợp và được nạp vào lọ thủy tinh loại I 3cc. Lọ được đặt trong hộp nhựa đảm bảo rằng lọ không dịch chuyển trong hộp trong khi khuấy. Hộp được đặt lên máy lắc theo quỹ đạo. Các mẫu được khuấy ở 500 vòng/phút trong 65 giờ. Các mẫu được phân tích bằng SE-UPLC để định lượng tỷ lệ phần trăm của các loại có trọng lượng phân tử cao (HMWS). Phương pháp giống như vậy như được mô tả trong Ví dụ 4 được áp dụng. Hàm lượng HMWS của các mẫu được khuấy được nêu bởi Bảng 22. Sự tạo thành HMWS là rõ rệt nhất đối với Đích C (cc)-scFc trong chế phẩm.

Bảng 22: Phân tích hàm lượng HMWS trong chế phẩm chịu áp lực (tăng độ pH + 2 tuần 37°C) chứa Đích C (cc)-hALB, -hFc, và -scFc được xác định nhờ SE-UPLC

Cấu trúc	hALB		hFc		scFc	
Chế phẩm	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS						

65h, 500 vòng/phút	2,1	0,8	2,3	0,4	1,3	0,2

Ví dụ 13:

Đích C (cc)-hALB, -hFc, và -scFc được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 4 được tiếp xúc với ánh sáng nhìn thấy và ánh sáng UVA (áp lực quang). Nồng độ protein tổng là 1 mg/mL trong tất cả các chế phẩm. Dung dịch protein được lọc qua bộ lọc có cỡ lỗ 0,22 µm và được nạp đến 0,5 mL trong lọ thủy tinh loại I. Đích C (cc)-hALB và -scFc được xử lý bằng hai thử nghiệm khác nhau bao gồm lần lượt là 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 25 W*h/m^2 ánh sáng UVA và 1,2MLux ánh sáng nhìn thấy / 173 W*h/m^2. Đích C (cc)-hFc được xử lý bằng hai thử nghiệm khác nhau bao gồm lần lượt là 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy mà không có ánh sáng UVA và 1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 30 W*h/m^2 ánh sáng UVA. Nhiệt độ buồng được điều chỉnh đến 25°C. Sau khi tiếp xúc ánh sáng các mẫu được phân tích bằng SE-UPLC (Bảng 23) ánh xạ peptit (Bảng 24). Các phương pháp nêu trên được thực hiện theo các quy trình trong Ví dụ 4. Mặc dù cường độ ánh sáng UVA cao được dùng cho Đích C (cc)-scFc, song cấu trúc này ổn định chống lại sự tạo thành HMWS. Trái lại, Đích C (cc)-hFc và Đích C (cc)-hALB thể hiện sự tăng HMWS khi thử nghiệm 2 điều kiện.

Bảng 23: Phân tích hàm lượng HMWS trong các chế phẩm Đích C (cc)-hALB, -hFc, và -scFc được xác định sau khi tiếp xúc ánh sáng nhờ SE-UPLC

Cấu trúc	**hALB**		**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
%HMWS						
T0	1,5	0,3	2,7	0,3	1,3	0,3
Thử nghiệm 1	1, 8[1]	0, 3[1]	2, 5[2]	0, 3[2]	1, 4[1]	0, 3[1)]
Thử nghiệm 2	4,6[3)]	1,1[3)]	6,0[4)]	0,7[4)]	1,5[3)]	0,3[3)]

[1)] 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 25 W*h/m^2 ánh sáng UVA, [2)] 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy mà không có ánh sáng UVA,
[3)] 1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 173 W*h/m^2, [4)] 1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 30 W*h/m^2

Nói chung, biến đổi hóa học khi tiếp xúc ánh sáng ít rõ rệt nhất đối với Đích C (cc)-scFc. Đặc biệt là sự khử amit CDR được tạo ra đến mức cao hơn ở Đích C (cc)-hALB và Đích C (cc)-hFc. Khi so sánh cấu trúc dựa trên Fc thấy rằng Đích C (cc)-scFc ít bị biến đổi hóa học phần Fc hơn mặc dù cấu trúc scFc được tiếp xúc với lượng ánh sáng UVA cao hơn so với cấu trúc hFc. Bảng 24 còn liệt kê sự biến đổi hóa học phong phú nhất của phần albumin ở Đích C (cc)-hALB chứng minh rằng phần kéo dài thời gian bán thải của cấu trúc này bị thoái biến hóa học nhiều hơn so với phần Fc của Đích C (cc)-hFc và -scFc.

Bảng 24: Phân tích biến đổi hóa học trong các chế phẩm Đích C (cc)-hALB, -hFc, và -scFc được xác định sau khi tiếp xúc ánh sáng bằng ánh xạ peptit

Cấu trúc	**hALB**		**hFc**		**scFc**	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
%M34 oxy hóa (CDR)						
T0	1,0	1,8	1,0	1,4	1,7	1,9
Thử nghiệm 1	1,5[1)]	n.t.	0,7[2)]	4,2[2)]	1,4[1)]	1,2[1)]
Thử nghiệm 2	1,7[3)]	n.t.	1,1[4)]	4,2[4)]	1,3[3)]	1,7[3)]
%D103 đồng phân hóa (CDR)						
T0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,6
Thử nghiệm 1	0,8[1)]	n.t.	0,9[2)]	0,9[2)]	0,8[1)]	1,0[1)]
Thử nghiệm 2	1,1[3)]	n.t.	1,2[4)]	1,4[4)]	1,0[3)]	1,3[3)]
%M290 oxy hóa (CDR)						

Cấu trúc	hALB		hFc		scFc	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
T0	0,7	1,4	0,8	1	1,3	1,4
Thử nghiệm 1	1,1[1)]	n.t.	0,5[2)]	3,3[2)]	1,0[1)]	0,9[1)]
Thử nghiệm 2	1,4[3)]	n.t.	1,1[4)]	4,2[4)]	1,0[3)]	1,4[3)]
%N359 khử amit (CDR)						
T0	5,8	11,4	5,3	6,3	0,4	0,5
Thử nghiệm 1	10,8[1)]	n.t.	4,5[2)]	5,6[2)]	0,4[1)]	0,2[1)]
Thử nghiệm 2	12,4[3)]	n.t.	10,3[4)]	3,6[4)]	0,6[3)]	0,2[3)]
%N362 khử amit (CDR)						
T0	5,4	8,7	3,9	4,0	0,2	0,3
Thử nghiệm 1	8,8[1)]	n.t.	3,4[2)]	3,5[2)]	0,3[1)]	0,3[1)]
Thử nghiệm 2	9,8[3)]	n.t.	6,4[4)]	2,3[4)]	0,5[3)]	0,3[3)]
%D510 đồng phân hóa (Fc)						
T0	n.a.	n.a.	0,4	0,4	0,5	0,4
Thử nghiệm 1	n.a.	n.a.	0,4[2)]	0,6[2)]	0,6[1)]	0,5[1)]
Thử nghiệm 2	n.a.	n.a.	0,7[4)]	0,7[4)]	0,7[3)]	0,7[3)]
%M541 oxy hóa (Fc)						

Cấu trúc	hALB		hFc		scFc	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
T0	n.a.	n.a.	2,8	3	3,7	4,1
Thử nghiệm 1	n.a.	n.a.	5,0[2)]	0,7[2)]	3,8[1)]	3,8[1)]
Thử nghiệm 2	n.a.	n.a.	17,5[4)]	18,4[4)]	4,8[3)]	5,5[3)]
%N614 khử amit (Fc)						
T0	n.a.	n.a.	1,2	1,2	1,6	1,5
Thử nghiệm 1	n.a.	n.a.	1,3[2)]	1,7[2)]	2,8[1)]	2,2[1)]
Thử nghiệm 2	n.a.	n.a.	6,1[4)]	1,9[4)]	1,9[3)]	2,3[3)]
%N673 khử amit (Fc)						
T0	n.a.	n.a.	0,3	0,3	0,0	0,0
Thử nghiệm 1	n.a.	n.a.	0,5[2)]	0,6[2)]	0,5[1)]	0,6[1)]
Thử nghiệm 2	n.a.	n.a.	0,5[4)]	0,6[4)]	0,5[3)]	1,5[3)]
%M717 oxy hóa (Fc)						
T0	n.a.	n.a.	2,1	2,4	2,5	2,8
Thử nghiệm 1	n.a.	n.a.	4,1[2)]	7,3[2)]	2,2[1)]	2,3[1)]
Thử nghiệm 2	n.a.	n.a.	13,7[4)]	13,5[4)]	2,8[3)]	3,8[3)]
%M598 oxy hóa (hALB)						

Cấu trúc	hALB		hFc		scFc	
Chế phẩm	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**	**K60RTrT**	**G40MSuT**
T0	1,0	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 1	2,3[1)]	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 2	6,4[3)]	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%M809 oxy hóa (hALB)						
T0	1,8	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 1	3,5[1)]	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 2	8,3[3)]	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%M840 oxy hóa (hALB)						
T0	12,8	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 1	32,0[1)]	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 2	61,7	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%K1036 glycat hóa (hALB)						
T0	10,1	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 1	10,2[1)]	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Thử nghiệm 2	9,9[3)]	n.t.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

[1)] 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 25 W*h/m^2 ánh sáng UVA, [2)] 0,2 MLux ánh sáng nhìn thấy mà không có ánh sáng UVA,

[3] 1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 173 W*h/m^2, [4] 1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 30 W*h/m^2

Ví dụ 14

Cấu trúc kháng thể BiTE® khác nhau được tạo ra để nhắm đích Đích F bao gồm Đích F-không kéo dài thời gian bán thải (không HLE, chính tắc), Đích F-hALB, và Đích F-scFc được kiểm tra. Nồng độ protein đích là 1,0 mg/mL đối với hALB và scFc và 0,4 mg/mL đối với dạng không HLE. Cấu trúc kháng thể BiTE® được tạo ra được nạp đến 1 mL vào lọ thủy tinh loại I được đậy bằng nút cao su butyl và được gấp nếp bằng miếng đệm nhôm. Các lọ đã nạp được ủ ở -20°C và 37°C (không có và có 25 ppm silic mà được biết về khả năng làm giảm sự kết tụ protein của nó) trong 4 tuần. Các cấu trúc nêu trên còn được tiếp xúc với ánh sáng (1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy / 173 W*h/m2 ánh sáng UVA). Đối với áp lực ánh sáng, nhiệt độ buồng được đặt đến 25°C. Các mẫu được bảo quản ở -70°C được lấy làm mẫu đối chứng (T0).

Các mẫu nêu trên được phân tích gồm hai bản bằng sắc ký tính năng siêu cao loại trừ theo kích thước (SE-UPLC) để định lượng tỷ lệ phần trăm của các loại có trọng lượng phân tử cao (HMWS). SE-UPLC được thực hiện trên hệ Aquity H-Class UPLC (Waters) sử dụng cột Acquity UPLC BEH200 SEC 150 mm (Waters). Nhiệt độ cột được đặt ở 25°C. Việc tách các biến thể kích thước được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp isocratic với tốc độ chảy là 0,4 mL/phút. Pha động gồm 100 mM natri phosphat, 250 mM NaCl pH = 6,8. Thời gian chạy tổng cộng 6,0 phút. Các mẫu được giữ ở 8°C trong quá trình dụng cụ lấy mẫu tự động cho đến khi phân tích. Tổng lượng là 3 µg protein được tiêm vào. Để tránh tiêu tán, việc tiêm trung gian với 40% ACN được thực hiện sau mỗi mẫu. Việc phát hiện dựa trên sự phát huỳnh quang (kích thích ở 280 nm, phát sáng ở 325 nm). Tích hợp đỉnh được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm Empower®. Diện tích tương đối dưới đường cong HMWS được ghi lại (Bảng 25).

Trong các mẫu không chịu áp lực, HMWS là ít rõ rệt nhất đối với cấu trúc scFc. Sự tạo thành HMWS được quan sát riêng biệt trong 4 tuần bảo quản ở -20°C. Hàm lượng HMWS trong các điều kiện này tăng theo thứ tự sau scFc < hALB < không HLE.

Bảng 25: Phân tích hàm lượng HMWS trong các chế phẩm chịu áp lực và không chịu áp lực (T0) chứa Đích F-không HLE, -hALB, và -scFc được xác định nhờ SE-UPLC.

Cấu trúc	Không HLE (chính tắc)	hALB	scFc
T0	1,3%	1,3%	1,0%
4 tuần -20°C	4,6%	1,8%	1,6%
4 tuần 37°C	0,9%	0,6%	0,5%
4 tuần 37°C (25 ppm silic)	1,1%	0,8%	0,8%
Tiếp xúc ánh sáng	1,0%	0,9%	0,5%

Ngoài ra, các mẫu thu được chịu áp lực nhiệt không có và có mặt silic được đánh giá về độ phong phú về các hạt nhìn thấy được bằng phương pháp tạo ảnh vi chất lưu (Microfluid Imaging: MFI) sử dụng Flowcam từ Fluid Imaging Technologies, Inc. Thiết bị này được trang bị tế bào dòng chảy FC80FV. Khuếch đại quang gấp mười lần được sử dụng. Tính thích hợp của hệ thống được kiểm tra bằng nước không có hạt. Tốc độ tự tạo ảnh là 20 khung trên một giây được sử dụng. Ngưỡng tối và sáng được đặt lần lượt ở 25 và 20 ảnh điểm. Thể tích mẫu cho một lần xác định tổng cộng là 0,25 mL. Các mẫu được xác định gồm ba bản. Trước mỗi bản sao ba, hệ này được rửa bằng 0,5 mL dung dịch mẫu tương ứng. Lúc bắt đầu và giữa mỗi bản sao ba, rửa bằng 1,0 mL nước không có hạt được thực hiện. Đánh giá số liệu được thực hiện bằng phần mềm Visual Spreadsheet. Các mẫu được xác định gồm ba bản. Các kết quả được nêu trong Bảng 26.

Áp lực nhiệt dẫn đến sự tạo thành hạt có thể nhìn thấy được trong các chế phẩm chứa cấu trúc không HLE và hALB. Trái lại, cấu trúc scFc vẫn ổn định. Sự tạo thành hạt có thể nhìn thấy được không được thúc đẩy khi bổ sung silic độc lập với bản chất của cấu trúc kháng thể BiTE®.

Bảng 26: Đánh giá các hạt nhìn thấy được bằng MFI trong chế phẩm Đích F-không HLE (chính tắc), -hALB, và –scFc sau khi chịu áp lực nhiệt không có và có silic.

Cấu trúc	Không HLE (chính tắc)				hALB				scFc			
Cỡ hạt [µm]	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25
T0	146	35	12	0	281	71	35	0	298	150	33	0
4 tuần 37°C	410	163	23	0	742	225	11	0	110	44	0	0
4 tuần 37°C (25 ppm silic)	69	35	11	0	272	91	34	0	146	55	11	0

Các mẫu chịu áp lực nhiệt cũng được phân tích bằng sắc ký trao đổi cation yếu (Weak Cation Exchange: WCX) để định lượng tỷ lệ phần trăm của các biến thể điện tích bằng cách sử dụng UPLC Aquity H-Class từ Waters. Cột protein-Pak Hi Res CM 7µm 4,6 x 100 mm (Waters, cat No. 186004929) được sử dụng. Nhiệt độ cột được điều chỉnh đến 30°C. Tốc độ dòng chảy được đặt ở 0,65 mL/phút. Gradien sử dụng được tạo ra như sau (Bảng 27). Nhiệt độ của dụng cụ lấy mẫu tự động được giữ ở 2-8°C.

Bảng 27: Gradien sử dụng cho sắc ký WCX

Thời gian [phút:giây]	% A 20 mM natri phosphat, pH = 6,5	% B 20 mM natri phosphat, 250 mM natri clorua, pH = 6,5
00:00	100	0
04:00	100	0
25:00	50	50
25:01	0	100
29:00	0	100
29:01	100	0

33:00	100	0

Tổng lượng 3 µg protein được tiêm vào. Việc phát hiện dựa vào sự phát huỳnh quang (kích thích ở 280 nm, phát sáng ở 325 nm). Tích hợp đỉnh được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm Empower®. Diện tích tương đối dưới đường cong của đỉnh chính cũng như các biến thể axit và bazơ được ghi lại (Bảng 28).

Áp lực nhiệt dẫn đến sự giảm tỷ lệ phần trăm đỉnh chính mà phải được cho là do sự tạo thành chủ yếu các biến thể điện tích axit. Sự giảm tỷ lệ phần trăm đỉnh chính là ít rõ rệt nhất đối với cấu trúc scFc (7,5%). Các biến thể điện tích bazơ được tạo ra ở cả hai cấu trúc với thời gian bán thải kéo dài khi tiếp xúc ánh sáng. Sự tăng các biến thể điện tích bazơ nằm trong khoảng từ 5 đến 6% ở cấu trúc hALB và scFc.

Bảng 28: Đánh giá các biến thể điện tích bằng sắc ký WCX trong các chế phẩm Đích F-không HLE (chính tắc), -hALB, và –scFc sau áp lực do nhiệt và ánh sáng gây ra.

Cấu trúc	**Không HLE (chính tắc)**			**hALB**			**scFc**		
Tỷ lệ	% chính	% axit	% bazơ	% chính	% axit	% bazơ	% chính	% axit	% bazơ
T0	89,9	3,6	6,5	83,3	0,7	16,0	74,5	3,4	22,1
4 tuần 37°C	79,3	11,1	9,5	75,6	9,8	14,6	67,0	11,2	21,8

Ngoài ra, độ tinh khiết mẫu được định lượng ở các mẫu chịu áp lực nhiệt và ánh sáng bằng cách sử dụng thử nghiệm natri dodexylsulphat điện di mao quản vi chất lưu (microfluidic capillary electrophoresis sodium dodecylsulphate: CE-SDS) dựa trên hệ LabChip GXII (Perkin Elmer). Dung dịch làm biến tính mẫu gồm đệm mẫu biểu hiện protein HT (được cung cấp bởi Perkin Elmer) được bổ sung 34 mM dithiothreitol. Mỗi mẫu được pha loãng theo tỷ lệ 1:8 với dung dịch làm biến tính và gia nhiệt tới 70°C trong 10 phút cùng với thang biểu hiện protein. 35 µL nước để tiêm (WFI) được bổ sung vào 40 µL mẫu đã biến tính. 120 µL WFI được bổ sung vào 12 µL thang. Mẫu, thang, đệm

rửa biểu hiện protein, thuốc nhuộm gel và dung dịch làm mất màu được chuyển vào bình chứa tương ứng. Các mẫu được nạp điện động học từ đĩa vi chuẩn trên chip tích hợp quá trình tách, nhuộm màu, làm mất màu, và phát hiện protein và các biến thể kích thước của nó. Điện di đồ thu được được đánh giá và sự thay đổi về độ tinh khiết được ghi lại. Phân tích tỷ lệ phần trăm độ tinh khiết được phát hiện sau áp lực được nêu trong bảng 29 và được so sánh với các mẫu không chịu áp lực (T0).

Độ tinh khiết cao hơn được quan sát đối với hALB và cấu trúc scFc khi so với cấu trúc không HLE trong tất cả các điều kiện. Sự giảm nhẹ về độ tinh khiết khi so với T0 được phát hiện đối với cấu trúc hALB và scFc khi có áp lực nhiệt và ánh sáng. Sự giảm độ tinh khiết sau 4 tuần bảo quản ở 37°C tổng cộng là 8,4% đối với cấu trúc hALB và 6,6% đối với cấu trúc scFc. Sự giảm khi tiếp xúc ánh sáng có thể so sánh được giữa hALB và scFc.

Bảng 29: Phân tích tỷ lệ phần trăm độ tinh khiết trong các chế phẩm chịu áp lực và không chịu áp lực (T0) chứa Đích F-không HLE, -hALB, và -scFc được xác định nhờ LabChip GXII (thước kẹp).

Cấu trúc	Không HLE (chính tắc)	hALB	scFc
T0	57,4	96,0	92,2
4 tuần 37°C	60,6	87,6	85,6
Tiếp xúc ánh sáng	61,5	90,1	86,4

Ví dụ 15

Các cấu trúc kháng thể BiTE® khác nhau được tạo ra để nhắm đích Đích E bao gồm Đích E-hALB và Đích E-scFc lần lượt được tạo ra. Nồng độ protein đích là 1,0 mg/mL đối với cả hai cấu trúc. Cấu trúc kháng thể BiTE® tạo ra được nạp đến 1 mL vào lọ thủy tinh loại I được đậy bằng nút cao su butyl và được gấp nếp bằng miếng đệm nhôm. Các lọ đã nạp được ủ ở 37°C (Đích E-hALB) và 40°C (Đích E-scFc) trong 4 tuần. Các mẫu được bảo quản ở -70°C được lấy làm mẫu đối chứng (T0). Các mẫu được phân tích bằng SE-UPLC theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 13. Các kết quả được nêu trong bảng 30.

Cấu trúc scFc biểu hiện sự giảm monome giảm (2,3%) khi có áp lực nhiệt khi so với cấu trúc hALB (4,0%) mặc dù nhiệt độ ủ hơi cao hơn.

Bảng 30: Phân tích tỷ lệ phần trăm đỉnh monome trong các chế phẩm chịu áp lực và không chịu áp lực (T0) chứa Đích E-hALB và –scFc được xác định nhờ SE-UPLC.

Cấu trúc	hALB	scFc
T0	97,6%	99,8%
4 tuần	93,6%	97,5%

Ví dụ 16

Các cấu trúc kháng thể BiTE® khác nhau được tạo ra để nhắm đích Đích I bao gồm Đích I-thể X và Đích I-scFc được kiểm tra. Nồng độ protein đích là 1,0 mg/mL. Cấu trúc kháng thể BiTE® được tạo ra được nạp đến 1 mL vào lọ thủy tinh loại I được đậy bằng nút cao su butyl và được gấp nếp bằng miếng đệm nhôm. Các lọ đã nạp được ủ ở -20°C và 37°C trong 4 tuần. Ngoài ra, tất cả các mẫu được cho tiếp xúc với 1,2 MLux ánh sáng nhìn thấy và 173 W*h/m^2 ánh sáng UVA. Nhiệt độ buồng được điều chỉnh đến 25°C. Các mẫu được bảo quản ở -70°C được lấy làm mẫu đối chứng (T0). Các mẫu được bảo quản ở -20 và -37°C được phân tích bằng SE-UPLC theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 13. Các kết quả được nêu trong Bảng 31.

Cấu trúc scFc bảo toàn hàm lượng monome cao hơn khi được bảo quản trong bốn tuần lần lượt ở -20 và 37°C khi so với thể X.

Bảng 31: Phân tích hàm lượng monome trong các chế phẩm chịu áp lực và không chịu áp lực (T0) chứa Đích I-thể X và -scFc được xác định nhờ SE-UPLC.

Cấu trúc	Thể X	scFc
T0	100,0	98,8
4 tuần -20°C	97,1	97,9
4 tuần 37°C	94,5	95,7

Ngoài ra, các mẫu không chịu áp lực được đánh giá về độ phong phú đối với các hạt nhìn thấy được bằng cách tạo ảnh vi chất lưu (MFI) sử dụng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 13. Các kết quả được nêu trong bảng 32. Chế phẩm Đích I-scFc biểu hiện lượng hạt nhìn thấy được thấp hơn đáng kể khi so với chế phẩm Đích I-thể X. Điều này áp dụng cho tất cả các tỷ lệ kích thước được bao gồm.

Bảng 32: Đánh giá các hạt nhìn thấy được bằng MFI trong Đích I-thể X và -scFc không chịu áp lực

Cấu trúc	Thể X				scFc			
Cỡ hạt [µm]	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25	≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25
T0	2648	688	192	32	160	64	43	11

Các mẫu chịu áp lực ánh sáng cũng được phân tích bằng cách sắc ký trao đổi cation yếu (WCX) để định lượng tỷ lệ phần trăm của các biến thể điện tích bằng cách sử dụng UPLC Aquity H-Class từ Waters theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 13. Diện tích tương ứng dưới đường cong của các đỉnh chính cũng như của các biến thể điện tích axit và bazơ được ghi lại (Bảng 33).

Cấu trúc scFc thể hiện tính ổn định tăng chịu được sự tiếp xúc ánh sáng khi so với thể X được chỉ ra bởi sự giảm ít rõ rệt hơn ở đỉnh chính tổng cộng là 1,4% so với 5,5% đối với cấu trúc thể X.

Bảng 33: Đánh giá các biến thể điện tích bằng cách sắc ký WCX ở chế phẩm Đích I-thể X và -scFc sau khi chịu áp lực do nhiệt và ánh sáng gây ra.

Cấu trúc	Thể X			scFc		
Tỷ lệ	% chính	% axit	% bazơ	% chính	% axit	% bazơ
T0	51,4	30,3	18,3	83,5	1,3	15,2
Tiếp xúc ánh sáng	45,9	33,2	20,9	82,1	1,2	16,7

Ví dụ 17: Sắc ký loại trừ theo kích thước của các biến thể scFc đặc hiệu kép

Các cấu trúc D9F, T2G, D3L, T7I và K6C (xem Fig. 7) mỗi loại được thử nghiệm về đặc tính hoạt động của chúng bằng sắc ký loại trừ theo kích thước theo các quy trình chuẩn. Cụ thể là, lượng xác định 25 µg mỗi cấu trúc được chạy (ở 750µl/phút) trong đệm Xitrat Lysin (10 mM và 75 mM, pH = 7) trên cột Superdex 200 increase 10/300GL ở nhiệt độ trong phòng và OD 280 nm được ghi lại. Sau đó, các cấu trúc đã được so sánh về thời gian lưu của chúng. Kết quả là, cấu trúc D9F thể hiện sự tách rửa chậm đáng kể (Bảng 34) khi so với T2G, D3L, T7I và K6C, chỉ ra sự khác biệt về cấu trúc trúc/sự sắp xếp của các vùng Fc. Sự chênh lệch về thời gian lưu này là đáng kể nhất với cấu trúc T7I có xystein chưa bắt cặp trong vùng bản lề và liên kết của CH2 và CH2CH3 với CH3 (18,98 phút so với 18,62 phút, chênh lệch là 0,36 phút). Tuy nhiên, sự chênh lệch về thời gian lưu là 0,16 phút giữa D9F và T2G là đáng kể tính đến thời gian lưu tương ứng của mẫu đối chứng BSA khi xem xét. Mẫu đối chứng BSA thể hiện thời gian lưu là 19,07 phút đối với monome và 16,82 phút đối với dime thể hiện sự chênh lệch là 2,25 phút về thời gian lưu đối với trọng lượng phân tử gấp đôi. Do đó, vì các cấu trúc chỉ có sự khác biệt về cấu trúc ở phần Fc, sự chênh lệch 0,16 phút về thời gian lưu là đáng kể. Tóm lại, cấu trúc D9F thể hiện thời gian lưu lâu nhất chỉ ra sự liên kết mạnh nhất. Kết luận này dẫn đến sự mong đợi D9F cũng có thời gian bán thải *in vivo* lâu nhất.

Bảng 34

Cấu trúc	**Thời gian lưu tính theo phút**
D9F	**18,98**
T2G	**18,82**
D3L	**18,78**
K6C	**18,77**
T7I	**18,62**
monome BSA	**19,07**
dime BSA	**16,82**

Ví dụ 18: Xác định sự liên kết với FcRn (FCGRT/B2M) người dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt

Các cấu trúc D9F, T2G, D3L, T7I và K6C (Fig. 7) mỗi loại được thử nghiệm về khả năng liên kết với FcRn người trong thử nghiệm SPR (Biacore) theo quy trình chuẩn. Cụ thể là, chip cảm biến CM5 (GE Healthcare) được giữ cố định bằng 450-500 RU của FCGRT/B2M (ACRO Biosystems) bằng cách sử dụng đệm Na axetat pH = 4,5 và đệm hoạt động gồm 200 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH = 6,0. Sau đó, các cấu trúc được tiêm cho các lần hoạt động tiếp theo với hai nồng độ là 250 nM và 125 nM được pha loãng trong 200 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, pH = 6,0 và 36°C. Sự kết hợp được thực hiện trong 90 giây với tốc độ chảy 30 µl/phút, tiếp đó là giai đoạn kết hợp trong 90 giây với tốc độ chảy 30 µl/phút trong 200 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, pH = 6,0 ở 36°C. Sự tái tạo tiếp theo được thực hiện trong 10 giây với 30 µl/phút với 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH = 7,4.

Sự liên kết tối đa trong giai đoạn tiêm được xác định đối với tất cả các cấu trúc ở dạng đơn vị đáp ứng tương ứng (RU), tương đương với sự tăng khối lượng phân tử ở chip CM5 được phủ FcRn do cấu trúc được liên kết. Tất cả các cấu trúc được xác định gồm hai bản. Giá trị trung bình của việc xác định hai bản được nêu lần lượt trên Fig. 8A và 8B.

Kết quả là, cấu trúc D9F thể hiện sự tăng khối lượng cao hơn đáng kể ở chip CM5 được phủ FcRn, khi so với T2G, D3L, T7I và K6C, chỉ ra ái lực liên kết mạnh hơn của D9F với FcRn người. Quan sát này được thấy đối với cả hai nồng độ của cấu trúc tương ứng.

Sự liên kết với FcRn được trung gian bởi phần Fc trong các cấu trúc. Sự liên kết mạnh hơn với FcRn người như được mô tả trong tài liệu là chất chỉ thị cho thời gian bán thải in vivo lâu hơn do sự tách protein tương ứng trong tế bào cao hơn và do đó tốc độ thoái hóa giảm. Vì lý do này, sự liên kết mạnh hơn của D9F với FcRn người khi so với các cấu trúc khác làm cho phân tử này rõ ràng là tốt hơn là cơ sở cho các phân tử điều trị bệnh để cho phép sự tiếp xúc lâu hơn của dược chất hữu hiệu ở bệnh nhân và tần số sử dụng dược chất thấp hơn.

Ví dụ 19: Xác định sự liên kết với FcRn (FCGRT/B2M) người dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt

Các cấu trúc D9F, T2G, D3L, T7I và K6C và kháng thể IgG1-kappa người MT201 mỗi loại được thử nghiệm về khả năng của chúng liên kết với FcRn người trong thử nghiệm SPR (Biacore) theo các quy trình chuẩn. Cụ thể là, chip cảm biến CM5 (GE Healthcare) được giữ cố định bằng khoảng 350 RU của FCGRT/B2M (ACRO Biosystems) bằng cách sử dụng đệm Na axetat pH = 4,5 và đệm hoạt động gồm 200 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH = 6,0. Sau đó, các cấu trúc và mẫu đối chứng IgG1-kappa người (MT201) được tiêm với nồng độ 125 nM được pha loãng trong 200 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, pH = 6,0 và 36°C. Sự kết hợp được thực hiện trong 90 giây với tốc độ chảy 30 µl/phút, tiếp đó là giai đoạn kết hợp trong 60 giây với tốc độ chảy 30 µl/phút trong 200 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, pH = 6,0 ở 36°C. Sự tái tạo tiếp theo được thực hiện trong 10 giây với 30 µl/phút với 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH = 7,4.

Sự liên kết tối đa trong giai đoạn tiêm được xác định đối với tất cả các cấu trúc ở dạng đơn vị đáp ứng tương ứng (RU), tương đương với sự tăng khối lượng phân tử ở chip CM5 được phủ FcRn do cấu trúc được liên kết. Tất cả các cấu trúc được xác định gồm hai bản. Giá trị trung bình của việc xác định hai bản được nêu trên Fig. 9 bao gồm thanh sai số sai lệch chuẩn.

Kết quả là, cấu trúc D9F thể hiện sự tăng khối lượng cao hơn đáng kể ở chip CM5 được phủ FcRn, khi so với T2G, D3L, T7I và K6C, chỉ ra ái lực liên kết mạnh hơn của D9F với FcRn người. Sự tăng khối lượng ở chip CM5 được phủ FcRn đối với D9F cũng được so sánh tốt với sự tăng khối lượng của kháng thể đối chứng IgG1-kappa người MT201, chỉ ra sự liên kết so sánh được của cấu trúc D9F với FcRn người.

Sự liên kết với FcRn được trung gian bởi phần IgG1 Fc trong các cấu trúc. Sự liên kết mạnh hơn với FcRn người như được mô tả trong lĩnh vực này là chất chỉ thị cho thời gian bán thải in vivo lâu hơn do sự tách protein tương ứng trong tế bào cao hơn và do đó tốc độ thoái hóa giảm. Vì lý do này, sự liên kết mạnh hơn của D9F với FcRn người trong khoảng kháng thể IgG1-kappa người (MT201), khi so với các cấu trúc khác làm cho phân tử này rõ ràng là tốt hơn là cơ sở cho các phân tử điều trị bệnh để cho phép sự tiếp xúc lâu hơn của dược chất hữu hiệu ở bệnh nhân, có thể là trong khoảng kháng thể IgG1 người đầy đủ, và tần số sử dụng dược chất thấp hơn.

SEQ ID NO:	Mô tả	TRÌNH TỰ
1.	trình tự liên kết G_4S	GGGGS
2.	trình tự liên kết $(G_4S)_2$	GGGGSGGGGS
3.	trình tự liên kết $(G_4S)_3$	GGGGSGGGGSGGGGS
4.	trình tự liên kết $(G_4S)_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
5.	trình tự liên kết $(G_4S)_5$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
6.	$(G_4S)_6$ trình tự liên kết	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
7.	trình tự liên kết $(G_4S)_7$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
8.	trình tự liên	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

	kết $(G_4S)_8$	
9.	Trình tự liên kết peptit	PGGGGS
10.	Trình tự liên kết peptit	PGGDGS
11.	Trình tự liên kết peptit	SGGGGS
12.	Trình tự liên kết peptit	GGGG
13.	VL chất liên kết CD3ε	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLA PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
14.	VH chất liên kết CD3ε	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WWAYWGQGTLVTVSS
15.	scFv chất liên kết CD3ε	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSS TGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ

		PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
16.	đuôi hexa-histidin	HHHHHH
17.	monome Fc -1 +c/-g	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
18.	monome Fc -2 +c/-g/delGK	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
19.	monome Fc -3 -c/+g	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
20.	monome Fc -4	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

	-c/+g/delGK	KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
21.	monome Fc -5 -c/-g	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
22.	monome Fc -6 -c/-g/delGK	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
23.	monome Fc -7 +c/+g	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
24.	monome Fc -8 +c/+g/delGK	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

		YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
25.	scFc-1	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
26.	scFc-2	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

27.	scFc-3	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28.	scFc-4	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
29.	scFc-5	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY

		VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
		KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
		YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
		KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
		KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYR
		VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
		TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
		RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	30. scFc-6	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
		VDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
		KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
		YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
		GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
		DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVS
		VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
		QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
		QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	31. scFc-7	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
		VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

		KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32.	scFc-8	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
33.	Đích A-HLE chuỗi hetero Fc 1	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGST IYYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINTWLAWYQ

		QKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSFPR TFGQGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL KSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
34.	Đích A-HLE chuỗi hetero Fc 2	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
35.	Dung hợp đích A-HLE hALB	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGST IYYADSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRNSHFDYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINTWLAWYQ QKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSFPR

		TFGQGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ
		APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA
		VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPS
		LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSG
		SLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLPGGDGSDAHKSE
		VAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC
		DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRP
		EVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADK
		AACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAE
		VSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKS
		HCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
		VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGE
		YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVV
		LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADIC
		TLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAE
		EGKKLVAASQAALGLHHHHHH
36.	Đích B-HLEa thể X chuỗi 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY
		NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY
		WAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLGEKYTS
		WYQQRPGQSPLLVIYQDTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW

		ESSTVVFGGGTKLTVLASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
37.	Đích B-HLEb thể X chuỗi 2	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWYEG SNKYYAESVKDRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYYYG MDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSG NYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
38.	Đích B-HLE	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWYEG

	chuỗi hetero Fc 1	SNKYYAESVKDRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGHGTIGYYYG MDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRL GEKYTSWYQQRPGQSPLLVIYQDTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAD YYCQAWESSTVVFGGGTKLTVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFT FNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL GGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	
39.	Đích B-HLE chuỗi hetero Fc 2	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
40.	Đích C-HLE	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQCLEWMGWINTY

	chuỗi hetero Fc 1	TGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYYVYF DYWGQGTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSV LDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPE DSATYYCQQSAHFPITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
41.	BCMA người	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAIL WTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEIILP RGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSDHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSA TEIEKSISAR
42.	BCMA ECD người	MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA

43.	BCMA khi	MLQMARQCSQNEYFDSLLHDCKPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASMTNSVKGMNAIL WTCLGLSLIISLAVFVLTFLLRKMSSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKGRTGDEIV LPRGLEYTVEECTCEDCIKNKPKVDSDHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCNSLSAAL SVTEIEKSISAR
44.	BCMA ECD khi	MLQMARQCSQNEYFDSLLHDCKPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASMTNSVKGMNA
45.	VH CDR1 BCMA-08	NHIIH
46.	VH CDR2 BCMA-08	YINPYPGYHAYNEKFQG
47.	VH CDR3 BCMA-08	DGYYRDTDVLDY
48.	VL CDR1 BCMA-08	QASQDISNYLN
49.	VL CDR2 BCMA-08	YTSRLHT

50.	VL CDR3 BCMA-08	QQGNTLPWT
51.	VH BCMA-08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYP GYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYYRDTDVLDY WGQGTLVTVSS
52.	VL BCMA-08	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK
53.	scFv BCMA-08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYP GYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYYRDTDVLDY WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISN YLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQ QGNTLPWTFGQGTKLEIK
54.	Phân tử đặc hiệu kép BCMA-08 xI2C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYP GYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYYRDTDVLDY WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISN YLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQ QGNTLPWTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN

		NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
	55.	Phân tử scFc đặc hiệu kép BCMA-08 xI2C –scFc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYP GYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYYRDTDVLDY WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISN YLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQ QGNTLPWTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGG DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS

		RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56.	Phân tử scFc đặc hiệu kép BCMA-08 xI2C –scFc _de1GK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYP GYHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYYRDTDVLDY WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISN YLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQ QGNTLPWTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGG DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

57.	VH (CC) BCMA-08_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQCLEWMGYINPYPG YHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYYRDTDVLDYW GQGTLVTVSS
58.	VL (CC) BCMA-08_CC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFGCGTKLEIK
59.	scFv (CC) BCMA-08_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQCLEWMGYINPYPG YHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYYRDTDVLDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNY LNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQ GNTLPWTFGCGTKLEIK
60.	Phân tử đặc hiệu kép (CC) BCMA-08_CCxI2C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQCLEWMGYINPYPG YHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYYRDTDVLDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNY LNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQ GNTLPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPG

		TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
61.	Phân tử scFc đặc hiệu kép (CC) BCMA-08_CC xI2C – scFc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQCLEWMGYINPYPG YHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYYRDTDVLDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNY LNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQ GNTLPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

62.	Phân tử scFc đặc hiệu kép (CC) BCMA-08_CC xI2C – scFc_delGK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHIIHWVRQAPGQCLEWMGYINPYPG YHAYNEKFQGRATMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYYRDTDVLDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNY LNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQ GNTLPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
63.	VH CDR1	NFDMA

	BCMA-06	
64.	VH CDR2 BCMA-06	SITTGGGDTYYADSVKG
65.	VH CDR3 BCMA-06	HGYYDGYHLFDY
66.	VL CDR1 BCMA-06	RANQGISNNLN
67.	VL CDR2 BCMA-06	YTSNLQS
68.	VL CDR3 BCMA-06	QQFTSLPYT
69.	VH BCMA-06	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVWVSSITTGGG DTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYYDGYHLFDYW GQGTLVTVSS
70.	VL BCMA-06	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTSNLQSG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSLPYTFGQGTKLEIK

71.	scFv BCMA-06	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVWVSSITTGGG DTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYYDGYHLFDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRANQGISNN LNWYQQKPGKAPKPLIYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQ FTSLPYTFGQGTKLEIK
72.	Phân tử đặc hiệu kép BCMA-06 xI2C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVWVSSITTGGG DTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYYDGYHLFDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRANQGISNN LNWYQQKPGKAPKPLIYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQ FTSLPYTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
73.	Phân tử scFc đặc hiệu kép BCMA-06 xI2C –scFc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVWVSSITTGGG DTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYYDGYHLFDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRANQGISNN LNWYQQKPGKAPKPLIYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQ FTSLPYTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM

		NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK
		TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVV
		TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP
		ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKT
		HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
		GVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
		SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
		TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG
		GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
		TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSV
		LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
		VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
		GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
74.	Phân tử scFc đặc hiệu kép BCMA-06 xI2C – scFc_deIGK	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKGLVWVSSITTGGG
		DTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYYDGYHLFDYW
		GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRANQGISNN
		LNWYQQKPGKAPKPLIYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQ
		FTSLPYTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM
		NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK
		TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVV

		TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP
		ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKT
		HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
		GVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
		SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
		TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG
		SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
		MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT
		VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
		SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
		NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
75.	VH (CC) BCMA-06_CC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVWVSSITTGGG DTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYYDGYHLFDYW GQGTLVTVSS
76.	VL (CC) BCMA-06_CC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRANQGISNNLNWYQQKPGKAPKPLIYYTSNLQSG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQFTSLPYTFGCGTKLEIK
77.	scFv (CC)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVWVSSITTGGG DTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYYDGYHLFDYW

	BCMA-06_CC	GQGTLVTVSSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVWVSSITTGGG LNWYQQKPGKAPKPLIYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQ FTSLPYTFGCGTKLEIK
78.	Phân tử đặc hiệu kép (CC) BCMA-06_CCxI2C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVWVSSITTGGG DTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYYDGYHLFDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRANQGISNN LNWYQQKPGKAPKPLIYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQ FTSLPYTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
79.	Phân tử scFc đặc hiệu kép (CC) BCMA-06_CC xI2C – scFc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVWVSSITTGGG DTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYYDGYHLFDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRANQGISNN LNWYQQKPGKAPKPLIYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQ FTSLPYTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVV

		TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP
		ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKT
		HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
		GVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
		SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
		TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG
		GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
		TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSV
		LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
		VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
		GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
80.	Phân tử scFc đặc hiệu kép (CC) BCMA-06_CC xI2C – scFc_de!GK	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFDMAWVRQAPGKCLVWVSSITTGGG
		DTYYADSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTAVYYCVRHGYYDGYHLFDYW
		GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRANQGISNN
		LNWYQQKPGKAPKPLIYYTSNLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQ
		FTSLPYTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM
		NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK
		TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVV
		TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP
		ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKT

		HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
		GVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
		SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
		TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGG
		SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
		MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT
		VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
		SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
		NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
81.	VH CDR1 BCMA-14	DYYIN
82.	VH CDR2 BCMA-14	WIYFASGNSEYNQKFTG
83.	VH CDR3 BCMA-14	LYDYDWYFDV
84.	VL CDR1 BCMA-14	KSSQSLVHSNGNTYLH

85.	VL CDR2 BCMA-14	KVSNRFS
86.	VL CDR3 BCMA-14	SQSSIYPWT
87.	VH BCMA-14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIYFAS GNSEYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWG QGTMVTVSS
88.	VL BCMA-14	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSN RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPWTFGQGTKLEIK
89.	scFv BCMA-14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIYFAS GNSEYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWG QGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSN GNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIY YCSQSSIYPWTFGQGTKLEIK
90.	Phân tử đặc hiệu kép BCMA-14 xI2C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIYFAS GNSEYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWG QGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSN GNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIY

		YCSQSSIYPWTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
91.	Phân tử scFc đặc hiệu kép BCMA-14 xI2C –scFc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIYFAS GNSEYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWG QGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSN GNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIY YCSQSSIYPWTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST

		YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
		EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
		KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
92.	Phân tử scFc đặc hiệu kép BCMA-14 xl2C – scFc_delGK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQGLEWMGWIYFAS
		GNSEYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWG
		QGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSN
		GNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIY
		YCSQSSIYPWTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN
		KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ
		MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG
		GSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF
		LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG
		GGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
		WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
		PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
		NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
		PGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
		PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRC
		VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
		KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR

		WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
93.	VH (CC) BCMA-14_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQCLEWMGWIYFAS GNSEYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWG QGTMVTVSS
94.	VL (CC) BCMA-14_CC	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSN RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQSSIYPWTFGCGTKLEIK
95.	scFv (CC) BCMA-14_CC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQCLEWMGWIYFAS GNSEYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWG QGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSN GNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIY YCSQSSIYPWTFGCGTKLEIK
96.	Phân tử đặc hiệu kép (CC) BCMA-14_CC xI2C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQCLEWMGWIYFAS GNSEYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWG QGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSN GNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIY YCSQSSIYPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ

		MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
97.	Phân tử scFc đặc hiệu kép (CC) BCMA-14_CC xI2C – scFc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQCLEWMGWIYFAS GNSEYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWG QGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSN GNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIY YCSQSSIYPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD

		KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
98.	Phân tử scFc đặc hiệu kép (CC) BCMA-14_CC xI2C – scFc_delGK	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFPDYYINWVRQAPGQCLEWMGWIYFAS GNSEYNQKFTGRVTMTRDTSINTAYMELSSLTSEDTAVYFCASLYDYDWYFDVWG QGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSN GNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIY YCSQSSIYPWTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRC VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

99.	vùng bản lề IgG1	DKTHTCPPCP
100.	vùng bản lề IgG2	ERKCCVECPPCP
101.	vùng bản lề IgG3	ELKTPLDTTHTCPRCP
102.	vùng bản lề IgG4	ESKYGPPCPSCP
103.	vùng bản lề IgG3	ELKTPLGDTTHTCPRCP
104.	vùng bản lề IgG1	EPKSCDKTHTCPPCP
105.	Đích F (cc) x I2C -vùng bản lề-CH2-CH3-trình tự liên kết-vùng bản lề-CH2-CH3 phân tử HLE đặc hiệu kép	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYD GSDKYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRD FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDTVMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQS LVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYRISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAE DVGVYYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI

	(DF9)	GGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL TVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEE QYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
106.	Đích F (cc) x I2C -vùng bản lề-CH2-CH3-trình tự liên kết-CH2-CH3 phân tử HLE đặc hiệu kép (T2G)	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYD GSDKYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRD FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDTVMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQS LVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYRISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAE DVGVYYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL TVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP

		EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
		KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
		NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
		KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPELLGGPSVFLFPPKPK
		DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS
		VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
		QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
		QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
107.	Đích F (cc) x I2C -vùng bản lề-CH2-trình tự liên kết-vùng bản lề-CH2-CH3-trình tự liên kết-CH3 phân tử HLE đặc hiệu kép (D3L)	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYD
		GSDKYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRD
		FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDTVMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQS
		LVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYRISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAE
		DVGVYYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA
		SGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
		TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG
		GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI
		GGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL
		TVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
		EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
		KALPAPIEKTISKAKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF

		PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST
		YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
		EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
		KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
		QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
		DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
108.	Đích F (cc) x I2C -vùng bản lề-CH2-trình tự liên kết-CH2-CH3-trình tự liên kết-CH3 phân tử HLE đặc hiệu kép (T7I)	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYD
		GSDKYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRD
		FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDTVMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQS
		LVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYRISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAE
		DVGVYYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA
		SGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
		TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG
		GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI
		GGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL
		TVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
		EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
		KALPAPIEKTISKAKGGGGSGGGGSGGGGSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
		SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV
		LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL

		TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
109.	Đích F (cc) x I2C -CH2-trình tự liên kết-CH2-CH3-trình tự liên kết-CH3 phân tử HLE đặc hiệu kép (K6C)	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYD GSDKYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRD FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDTVMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQS LVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYRISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAE DVGVYYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLI GGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKL TVLGGGGAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGQPREPQVYTLPPSREEMTK

		NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cấu trúc kháng thể chuỗi đơn gồm:

vùng thứ nhất liên kết với kháng nguyên trưởng thành tế bào B (BCMA);

vùng thứ hai liên kết với epitop ngoại bào của chuỗi CD3ε của người và/hoặc chuỗi CD3ε của khỉ *Macaca*; và

vùng thứ ba gồm hai monome polypeptit, mỗi monome gồm vùng bản lề, vùng CH2 và vùng CH3, trong đó hai monome polypeptit này được dung hợp với nhau nhờ trình tự liên kết peptit.

2. Cấu trúc kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng thứ ba gồm, theo thứ tự từ amin đến carboxyl:

vùng bản lề-CH2-CH3-trình tự liên kết-vùng bản lề-CH2-CH3.

3. Cấu trúc kháng thể theo điểm 1, trong đó mỗi trong số các monome polypeptit có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17-24.

4. Cấu trúc kháng thể theo điểm 1, trong đó mỗi trong số các monome polypeptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17-24.

5. Cấu trúc kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng CH2 gồm cầu nối xystein disulfua nội vùng.

6. Cấu trúc kháng thể theo điểm 1, trong đó

(i) vùng thứ nhất gồm hai vùng biến đổi của kháng thể và vùng thứ hai gồm hai vùng biến đổi của kháng thể;

(ii) vùng thứ nhất gồm một vùng biến đổi của kháng thể và vùng thứ hai gồm hai vùng biến đổi của kháng thể;

(iii) vùng thứ nhất gồm hai vùng biến đổi của kháng thể và vùng thứ hai gồm một vùng biến đổi của kháng thể; hoặc

(iv) vùng thứ nhất gồm một vùng biến đổi của kháng thể và vùng thứ hai gồm một vùng biến đổi của kháng thể.

7. Cấu trúc kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng thứ nhất và vùng thứ hai được dung hợp với vùng thứ ba nhờ trình tự liên kết peptit.

8. Cấu trúc kháng thể theo điểm 1, trong có cấu trúc kháng thể này gồm, theo thứ tự từ amin đến carboxyl:

(a) vùng thứ nhất;

(b) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-3;

(c) vùng thứ hai;

(d) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11 và 12;

(e) monome polypeptit thứ nhất của vùng thứ ba;

(f) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, 6, 7 và 8; và

(g) monome polypeptit thứ hai của vùng thứ ba.

9. Cấu trúc kháng thể theo điểm 1, trong đó cấu trúc kháng thể này gồm, theo thứ tự từ amin đến carboxyl:

(a) vùng thứ nhất có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53, 59, 71, 77, 89 và 95;

(b) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-3;

(c) vùng thứ hai có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, 117, 118, 129, 130, 138, 139, 147, 148, 156, 157, 165, 166, 177, 178, 186, 187, 198, 199, 207, và 208;

(d) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11 và 12;

(e) monome polypeptit thứ nhất của vùng thứ ba có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17-24;

(f) trình tự liên kết peptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, 6, 7 và 8; và

(g) monome polypeptit thứ hai của vùng thứ ba có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17-24.

10. Cấu trúc kháng thể theo điểm 1, trong đó cấu trúc kháng thể này có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55, 56, 61, 62, 73, 74, 79, 80, 91, 92, 97 và 98.

11. Polynucleotit mã hóa cấu trúc kháng thể theo điểm 1.

12. Vectơ chứa polynucleotit theo điểm 11.

13. Tế bào chủ được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng polynucleotit theo điểm 11.

14. Quy trình sản xuất cấu trúc kháng thể theo điểm 1, quy trình này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng polynucleotit mã hóa cấu trúc kháng thể gồm:

vùng thứ nhất liên kết với kháng nguyên trưởng thành tế bào B (BCMA);

vùng thứ hai liên kết với epitop ngoại bào của chuỗi CD3ε của người và/hoặc chuỗi CD3ε của khỉ *Macaca*; và

vùng thứ ba gồm hai monome polypeptit, mỗi monome gồm vùng bản lề, vùng CH2 và vùng CH3, trong đó hai monome polypeptit này được dung hợp với nhau nhờ trình tự liên kết peptit trong các điều kiện cho phép sự biểu hiện cấu trúc kháng thể, và thu hồi cấu trúc kháng thể này từ mẻ nuôi cấy.

15. Chế phẩm chứa cấu trúc kháng thể theo điểm 1 và chất mang, chất làm ổn định, tá dược, chất pha loãng, chất làm tan, chất hoạt động bề mặt, chất nhũ hóa, chất bảo quản hoặc chất bổ trợ.

16. Chế phẩm theo điểm 15, trong đó chế phẩm này ổn định trong ít nhất bốn tuần ở nhiệt độ khoảng -20°C.

17. Kit chứa cấu trúc kháng thể theo điểm 1 được đóng gói trong vật chứa hoặc túi chứa.

18. Kit theo điểm 17, trong đó kit này còn gồm hướng dẫn sử dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AMGEN INC.
AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH

<120> CẤU TRÚC KHÁNG THỂ LIÊN HỢP TẾ BÀO T ĐẶC HIỆU KÉP BCMA VÀ CD3, CHẾ PHẨM CHỨA CHÚNG VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT CẤU TRÚC KHÁNG THỂ NÀY
<130> AMG15674PCT
<150> 62/290,831
<151> 03-02-2016
<160> 109
<170> Patent phiên bản 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 1
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 2
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 3
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 4
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 5
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp

<400> 5
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 6
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 7
<211> 35
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 7
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 8
<211> 40
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 8
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 9
Pro Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 10
Pro Gly Gly Asp Gly Ser
1 5

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 11
Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 12
Gly Gly Gly Gly
1

<210> 13
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 13
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 125

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 249
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val

130 135 140

Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu
145 150 155 160

Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn
165 170 175

Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly
180 185 190

Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu
195 200 205

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

Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe
225 230 235 240

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
245

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 16
His His His His His His
1 5

<210> 17
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 17
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 18
<211> 225
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 18
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro
225

<210> 19
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 19
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

```
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys
225

<210>  20
<211>  225
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  Peptit tổng hợp
<400>  20
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1               5                  10                  15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
            20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro
225

<210>  21
<211>  227
<212>  PRT
```

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 21
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 22
<211> 225
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 22
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro
225

<210> 23
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 23
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 24
<211> 225
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 24
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro
225

<210> 25
<211> 484
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 25
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
260 265 270

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
275 280 285

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
290 295 300

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
305 310 315 320

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr
325 330 335

Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
340 345 350

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
355 360 365

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
370 375 380

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
385 390 395 400

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
405 410 415

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
420 425 430

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
435 440 445

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
450 455 460

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
465 470 475 480

Ser Pro Gly Lys

<210> 26
<211> 480
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 26

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
245 250 255

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
260 265 270

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
275 280 285

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
290 295 300

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
305 310 315 320

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg
325 330 335

Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
340 345 350

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
355 360 365

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
370 375 380

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
385 390 395 400

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
405 410 415

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
420 425 430

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
435 440 445

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
450 455 460

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470 475 480

<210> 27
<211> 484
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 27
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
260 265 270

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
275 280 285

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
290 295 300

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
305 310 315 320

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
325 330 335

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
340 345 350

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
355 360 365

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
370 375 380

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
385 390 395 400

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
405 410 415

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

420 425 430

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
435 440 445

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
450 455 460

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
465 470 475 480

Ser Pro Gly Lys

<210> 28
<211> 480
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 28

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
245 250 255

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
260 265 270

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
275 280 285

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
290 295 300

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
305 310 315 320

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
325 330 335

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
340 345 350

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
355 360 365

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
370 375 380

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
385 390 395 400

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
405 410 415

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
420 425 430

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
435 440 445

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
450 455 460

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470 475 480

<210> 29
<211> 484
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 29
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

```
                20                  25                  30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
        35                  40                  45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
    50                  55                  60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225                 230                 235                 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
            260                 265                 270

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
        275                 280                 285

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
    290                 295                 300

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
305                 310                 315                 320

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr
                325                 330                 335

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
            340                 345                 350
```

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
355 360 365

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
370 375 380

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
385 390 395 400

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
405 410 415

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
420 425 430

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
435 440 445

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
450 455 460

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
465 470 475 480

Ser Pro Gly Lys

<210> 30
<211> 480
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 30
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
245 250 255

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
260 265 270

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
275 280 285

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
290 295 300

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
305 310 315 320

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg
325 330 335

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
340 345 350

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
355 360 365

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
370 375 380

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
385 390 395 400

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
405 410 415

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
420 425 430

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
435 440 445

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
450 455 460

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470 475 480

<210> 31
<211> 484
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 31
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
260 265 270

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
275 280 285

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
290 295 300

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
305 310 315 320

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
325 330 335

Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
340 345 350

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
355 360 365

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
370 375 380

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
385 390 395 400

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
405 410 415

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
420 425 430

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
435 440 445

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
450 455 460

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
465 470 475 480

Ser Pro Gly Lys

<210> 32
<211> 480
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 32
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

```
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                85                  90                  95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
            100                 105                 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
        115                 120                 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    130                 135                 140

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
            180                 185                 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
        195                 200                 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
    210                 215                 220

Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225                 230                 235                 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
                245                 250                 255

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
            260                 265                 270

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
        275                 280                 285

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
    290                 295                 300

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
305                 310                 315                 320

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
                325                 330                 335

Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
            340                 345                 350

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
        355                 360                 365

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
    370                 375                 380

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
```

385 390 395 400

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
405 410 415

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
420 425 430

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
435 440 445

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
450 455 460

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
465 470 475 480

<210> 33
<211> 725
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 33
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Asn Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser
130 135 140

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
145 150 155 160

Ile Asn Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
165 170 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Gly Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

195 200 205

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Lys
210 215 220

Ser Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
245 250 255

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
260 265 270

Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
275 280 285

Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala
290 295 300

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
305 310 315 320

Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu
325 330 335

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser
340 345 350

Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
355 360 365

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
370 375 380

Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly
385 390 395 400

Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser
405 410 415

Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
420 425 430

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg
435 440 445

Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly
450 455 460

Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser
465 470 475 480

Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
485 490 495

Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
500 505 510

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
515 520 525

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
530 535 540

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
545 550 555 560

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser
565 570 575

Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
580 585 590

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
595 600 605

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
610 615 620

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr Lys Asn Gln
625 630 635 640

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
645 650 655

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
660 665 670

Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
675 680 685

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
690 695 700

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
705 710 715 720

Leu Ser Pro Gly Lys
725

<210> 34
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 34
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 35
<211> 1091
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 35
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Asn Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

```
Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser
    130                 135                 140

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
145                 150                 155                 160

Ile Asn Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
                165                 170                 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Gly Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
            180                 185                 190

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
        195                 200                 205

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Lys
    210                 215                 220

Ser Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
225                 230                 235                 240

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
                245                 250                 255

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
            260                 265                 270

Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
        275                 280                 285

Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala
    290                 295                 300

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
305                 310                 315                 320

Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu
                325                 330                 335

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser
            340                 345                 350

Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
        355                 360                 365

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
    370                 375                 380

Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly
385                 390                 395                 400

Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser
                405                 410                 415

Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
            420                 425                 430

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg
        435                 440                 445
```

Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly
450 455 460

Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser
465 470 475 480

Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Pro Gly
485 490 495

Gly Asp Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys
500 505 510

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

Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn
530 535 540

Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu
545 550 555 560

Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr
565 570 575

Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala
580 585 590

Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp
595 600 605

Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys
610 615 620

Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr
625 630 635 640

Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe
645 650 655

Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala
660 665 670

Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu
675 680 685

Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
690 695 700

Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser
705 710 715 720

Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr
725 730 735

Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
740 745 750

Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
755 760 765

Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu

770 775 780

Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
785 790 795 800

Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
805 810 815

Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
820 825 830

Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
835 840 845

Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
850 855 860

Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
865 870 875 880

Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
885 890 895

Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
900 905 910

Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
915 920 925

Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
930 935 940

Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
945 950 955 960

Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
965 970 975

Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
980 985 990

Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
995 1000 1005

Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile
1010 1015 1020

Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys
1025 1030 1035

Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala
1040 1045 1050

Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
1055 1060 1065

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu
1070 1075 1080

Gly Leu His His His His His His
1085 1090

<210> 36
<211> 571
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 36

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser
130 135 140

Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp
145 150 155 160

Arg Leu Gly Glu Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
165 170 175

Ser Pro Leu Leu Val Ile Tyr Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile
180 185 190

Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr
195 200 205

Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala
210 215 220

Trp Glu Ser Ser Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
225 230 235 240

Leu Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
245 250 255

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
260 265 270

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
275 280 285

```
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
290                 295                 300

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
305                 310                 315                 320

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
                325                 330                 335

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
            340                 345                 350

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
        355                 360                 365

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
370                 375                 380

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
385                 390                 395                 400

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys
                405                 410                 415

Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val
            420                 425                 430

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
        435                 440                 445

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
450                 455                 460

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
465                 470                 475                 480

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
                485                 490                 495

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
            500                 505                 510

Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
        515                 520                 525

Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
530                 535                 540

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
545                 550                 555                 560

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                565                 570
```

<210> 37
<211> 577
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp

<400> 37

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Gly Ile Ile Gly Thr Ile Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser
130 135 140

Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser
145 150 155 160

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

Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala
180 185 190

Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala
195 200 205

Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr
210 215 220

Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240

Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe
245 250 255

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
260 265 270

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
275 280 285

Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys
290 295 300

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
305 310 315 320

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
325 330 335

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Asp Lys
340 345 350

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
355 360 365

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
370 375 380

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
385 390 395 400

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
405 410 415

Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys
420 425 430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
435 440 445

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
450 455 460

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
465 470 475 480

Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
485 490 495

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
500 505 510

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
515 520 525

Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
530 535 540

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
545 550 555 560

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
565 570 575

Lys

<210> 38
<211> 732
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 38
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Arg Ala Gly Ile Ile Gly Thr Ile Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Leu
130 135 140

Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala Ser Ile
145 150 155 160

Thr Cys Ser Gly Asp Arg Leu Gly Glu Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Gln
165 170 175

Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Tyr Gln Asp Thr Lys
180 185 190

Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
195 200 205

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp
210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Glu Ser Ser Thr Val Val Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
245 250 255

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu
260 265 270

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp
275 280 285

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg
290 295 300

Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp
305 310 315 320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
325 330 335

Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg

340 345 350

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly
355 360 365

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro
385 390 395 400

Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser
405 410 415

Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln
420 425 430

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu
435 440 445

Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys
450 455 460

Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr
465 470 475 480

Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
485 490 495

Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
500 505 510

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
515 520 525

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
530 535 540

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
545 550 555 560

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
565 570 575

Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr
580 585 590

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
595 600 605

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
610 615 620

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
625 630 635 640

Lys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
645 650 655

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
660 665 670

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser
675 680 685

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
690 695 700

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
705 710 715 720

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
725 730

<210> 39
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 39
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 40
<211> 736
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 40
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

Met Glu Ile Arg Asn Leu Gly Gly Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
130 135 140

Pro Asp Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly Glu Arg Thr Thr Ile Asn Cys
145 150 155 160

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asp Ser Ser Thr Asn Lys Asn Ser Leu
165 170 175

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Leu Ser
180 185 190

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
195 200 205

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Ser Pro Gln Pro Glu
210 215 220

Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ala His Phe Pro Ile Thr
225 230 235 240

Phe Gly Cys Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser
245 250 255

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr
275 280 285

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
290 295 300

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
305 310 315 320

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
325 330 335

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
340 345 350

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp
355 360 365

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
370 375 380

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val
385 390 395 400

Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu
405 410 415

Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn
420 425 430

Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly
435 440 445

Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu
450 455 460

Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp
465 470 475 480

Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe
485 490 495

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr
500 505 510

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
515 520 525

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
530 535 540

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
545 550 555 560

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
565 570 575

Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val
580 585 590

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
595 600 605

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
610 615 620

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
625 630 635 640

Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
645 650 655

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
660 665 670

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys
675 680 685

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
690 695 700

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
705 710 715 720

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
725 730 735

<210> 41
<211> 184
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 41
Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
50 55 60

Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
65 70 75 80

Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
85 90 95

Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
100 105 110

Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
115 120 125

Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
130 135 140

Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
145 150 155 160

Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
165 170 175

Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
180

<210> 42
<211> 54
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 42
Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala
50

<210> 43
<211> 183
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 43
Met Leu Gln Met Ala Arg Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

Leu Leu His Asp Cys Lys Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Thr Pro
20 25 30

Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Met Thr Asn Ser Val
35 40 45

Lys Gly Met Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu Ile
50 55 60

Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Thr Phe Leu Leu Arg Lys Met Ser
65 70 75 80

Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu Leu
85 90 95

Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Gly Arg Thr Gly Asp Glu Ile
100 105 110

Val Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys Glu
115 120 125

Asp Cys Ile Lys Asn Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe Pro
130 135 140

Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys Thr
145 150 155 160

Asn Asp Tyr Cys Asn Ser Leu Ser Ala Ala Leu Ser Val Thr Glu Ile
165 170 175

Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
180

<210> 44
<211> 53
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 44
Met Leu Gln Met Ala Arg Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10 15

Leu Leu His Asp Cys Lys Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Thr Pro
20 25 30

Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Met Thr Asn Ser Val
35 40 45

Lys Gly Met Asn Ala
50

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 45
Asn His Ile Ile His
1 5

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 46
Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr His Ala Tyr Asn Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 47
Asp Gly Tyr Tyr Arg Asp Thr Asp Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 48
Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 49
Tyr Thr Ser Arg Leu His Thr
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 50
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 51
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 51
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr His Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Asp Thr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 52

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 53
<211> 243
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 53

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr His Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Asp Thr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro

130 135 140

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

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Thr
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys

<210> 54
<211> 498
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 54
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr His Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Asp Thr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

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

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Thr
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
260 265 270

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
275 280 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
290 295 300

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305 310 315 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
325 330 335

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
340 345 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
355 360 365

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385 390 395 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
405 410 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
420 425 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
435 440 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
450 455 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465 470 475 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
485 490 495

Val Leu

<210> 55
<211> 986
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 55

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr His Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Asp Thr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

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

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Thr
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
260 265 270

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
275 280 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
290 295 300

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305 310 315 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
325 330 335

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
340 345 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
355 360 365

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385 390 395 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
405 410 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
420 425 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
435 440 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
450 455 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465 470 475 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
485 490 495

Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
500 505 510

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
515 520 525

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
530 535 540

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
545 550 555 560

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu
565 570 575

Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
580 585 590

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
595 600 605

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
610 615 620

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
625 630 635 640

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
645 650 655

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
660 665 670

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
675 680 685

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
690 695 700

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
705 710 715 720

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
725 730 735

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
740 745 750

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
755 760 765

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
770 775 780

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
785 790 795 800

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
805 810 815

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu
820 825 830

Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu
835 840 845

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
850 855 860

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
865 870 875 880

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
885 890 895

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
900 905 910

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

915 920 925

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
930 935 940

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
945 950 955 960

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
965 970 975

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
980 985

<210> 56
<211> 984
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 56
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr His Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Asp Thr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

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

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Thr
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

```
    210                 215                 220
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
225                 230                 235                 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
            260                 265                 270

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
        275                 280                 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
    290                 295                 300

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305                 310                 315                 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
                325                 330                 335

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
            340                 345                 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        355                 360                 365

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385                 390                 395                 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
                405                 410                 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
            420                 425                 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
        435                 440                 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
    450                 455                 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465                 470                 475                 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
                485                 490                 495

Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            500                 505                 510

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        515                 520                 525

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    530                 535                 540
```

```
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
545                 550                 555                 560

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu
                565                 570                 575

Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            580                 585                 590

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        595                 600                 605

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    610                 615                 620

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
625                 630                 635                 640

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                645                 650                 655

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
            660                 665                 670

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
        675                 680                 685

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
    690                 695                 700

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
705                 710                 715                 720

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
                725                 730                 735

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
            740                 745                 750

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
        755                 760                 765

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
    770                 775                 780

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
785                 790                 795                 800

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
                805                 810                 815

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln
            820                 825                 830

Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
        835                 840                 845

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
    850                 855                 860
```

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
865 870 875 880

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
885 890 895

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
900 905 910

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
915 920 925

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
930 935 940

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
945 950 955 960

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
965 970 975

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
980

<210> 57
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 57
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr His Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Asp Thr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp

<400> 58
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 59
<211> 243
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 59
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr His Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Asp Thr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

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

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Thr
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys

<210> 60
<211> 498
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 60
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr His Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Asp Thr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

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

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Thr
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
260 265 270

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
275 280 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
290 295 300

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305 310 315 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
325 330 335

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
340 345 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
355 360 365

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385 390 395 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
405 410 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
420 425 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
435 440 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
450 455 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465 470 475 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
485 490 495

Val Leu

<210> 61
<211> 986
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 61

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr His Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Asp Thr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
    130                 135                 140

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

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
                165                 170                 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Thr
            180                 185                 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
        195                 200                 205

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
225                 230                 235                 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
            260                 265                 270

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
        275                 280                 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
    290                 295                 300
```

```
Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305                 310                 315                 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
                325                 330                 335

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
            340                 345                 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        355                 360                 365

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385                 390                 395                 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
                405                 410                 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
            420                 425                 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
        435                 440                 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
    450                 455                 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465                 470                 475                 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
                485                 490                 495

Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            500                 505                 510

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        515                 520                 525

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    530                 535                 540

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
545                 550                 555                 560

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu
                565                 570                 575

Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            580                 585                 590

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        595                 600                 605

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    610                 615                 620

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
```

625 630 635 640

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
645 650 655

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
660 665 670

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
675 680 685

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
690 695 700

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
705 710 715 720

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
725 730 735

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
740 745 750

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
755 760 765

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
770 775 780

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
785 790 795 800

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
805 810 815

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu
820 825 830

Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu
835 840 845

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
850 855 860

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
865 870 875 880

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
885 890 895

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
900 905 910

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
915 920 925

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
930 935 940

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
945 950 955 960

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
965 970 975

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
980 985

<210> 62
<211> 984
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 62
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Pro Gly Tyr His Ala Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Arg Asp Thr Asp Val Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

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

Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Thr
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
195 200 205

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
260 265 270

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
275 280 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
290 295 300

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305 310 315 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
325 330 335

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
340 345 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
355 360 365

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385 390 395 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
405 410 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
420 425 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
435 440 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
450 455 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465 470 475 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
485 490 495

Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
500 505 510

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
515 520 525

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
530 535 540

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
545 550 555 560

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu
565 570 575

Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
580 585 590

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
595 600 605

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
610 615 620

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
625 630 635 640

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
645 650 655

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
660 665 670

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
675 680 685

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
690 695 700

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
705 710 715 720

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
725 730 735

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
740 745 750

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
755 760 765

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
770 775 780

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
785 790 795 800

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
805 810 815

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln
820 825 830

Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
835 840 845

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
850 855 860

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
865 870 875 880

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
885 890 895

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser

900 905 910

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
915 920 925

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
930 935 940

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
945 950 955 960

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
965 970 975

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
980

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 63
Asn Phe Asp Met Ala
1 5

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 64
Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 65
His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 66
Arg Ala Asn Gln Gly Ile Ser Asn Asn Leu Asn
1 5 10

<210> 67

<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 67
Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 68
Gln Gln Phe Thr Ser Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 69
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 69
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

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

Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 70
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln Gly Ile Ser Asn Asn

20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 71
<211> 243
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 71
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

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

Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

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

Ala Asn Gln Gly Ile Ser Asn Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr

195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Phe Thr Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys

<210> 72
<211> 498
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 72
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

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

Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

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

Ala Asn Gln Gly Ile Ser Asn Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

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

225 230 235 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
260 265 270

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
275 280 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
290 295 300

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305 310 315 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
325 330 335

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
340 345 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
355 360 365

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385 390 395 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
405 410 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
420 425 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
435 440 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
450 455 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465 470 475 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
485 490 495

Val Leu

<210> 73
<211> 986
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 73
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

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

Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

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

Ala Asn Gln Gly Ile Ser Asn Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Phe Thr Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
260 265 270

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
275 280 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
290 295 300

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305 310 315 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
325 330 335

```
Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
            340                 345                 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        355                 360                 365

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385                 390                 395                 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
                405                 410                 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
            420                 425                 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
        435                 440                 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
    450                 455                 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465                 470                 475                 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
                485                 490                 495

Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            500                 505                 510

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        515                 520                 525

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    530                 535                 540

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
545                 550                 555                 560

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu
                565                 570                 575

Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            580                 585                 590

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        595                 600                 605

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    610                 615                 620

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
625                 630                 635                 640

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                645                 650                 655
```

```
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
            660                 665                 670

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
        675                 680                 685

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
    690                 695                 700

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
705                 710                 715                 720

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
                725                 730                 735

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
            740                 745                 750

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
        755                 760                 765

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
    770                 775                 780

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
785                 790                 795                 800

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
                805                 810                 815

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu
            820                 825                 830

Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu
        835                 840                 845

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
    850                 855                 860

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
865                 870                 875                 880

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
                885                 890                 895

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
            900                 905                 910

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
        915                 920                 925

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
    930                 935                 940

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
945                 950                 955                 960

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
                965                 970                 975

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
```

980 985

<210> 74
<211> 984
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 74

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

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

Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

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

Ala Asn Gln Gly Ile Ser Asn Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Phe Thr Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
260 265 270

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln

```
        275                 280                 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
    290                 295                 300

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305                 310                 315                 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
                325                 330                 335

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
            340                 345                 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        355                 360                 365

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385                 390                 395                 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
                405                 410                 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
            420                 425                 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
        435                 440                 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
    450                 455                 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465                 470                 475                 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
                485                 490                 495

Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            500                 505                 510

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        515                 520                 525

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    530                 535                 540

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
545                 550                 555                 560

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu
                565                 570                 575

Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            580                 585                 590

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        595                 600                 605
```

```
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    610                 615                 620

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
625                 630                 635                 640

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                645                 650                 655

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
            660                 665                 670

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
        675                 680                 685

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
    690                 695                 700

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
705                 710                 715                 720

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
                725                 730                 735

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
            740                 745                 750

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
        755                 760                 765

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
    770                 775                 780

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
785                 790                 795                 800

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
                805                 810                 815

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln
            820                 825                 830

Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
        835                 840                 845

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
    850                 855                 860

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
865                 870                 875                 880

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
                885                 890                 895

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
            900                 905                 910

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
        915                 920                 925
```

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
930 935 940

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
945 950 955 960

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
965 970 975

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
980

<210> 75
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 75
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 76
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 76
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 77
<211> 243
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 77
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
130 135 140

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

Ala Asn Gln Gly Ile Ser Asn Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
165 170 175

Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
180 185 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
195 200 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
210 215 220

Gln Gln Phe Thr Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
225 230 235 240

Glu Ile Lys

<210> 78
<211> 498
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 78

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
            20                  25                  30

Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Val Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
    130                 135                 140

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

Ala Asn Gln Gly Ile Ser Asn Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
                165                 170                 175

Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
            180                 185                 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
        195                 200                 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Gln Gln Phe Thr Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
225                 230                 235                 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
            260                 265                 270
```

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
275 280 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
290 295 300

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305 310 315 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
325 330 335

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
340 345 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
355 360 365

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385 390 395 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
405 410 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
420 425 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
435 440 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
450 455 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465 470 475 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
485 490 495

Val Leu

<210> 79
<211> 986
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 79
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Val Trp Val
35 40 45

```
Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
    130                 135                 140

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

Ala Asn Gln Gly Ile Ser Asn Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
                165                 170                 175

Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
            180                 185                 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
        195                 200                 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Gln Gln Phe Thr Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
225                 230                 235                 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
            260                 265                 270

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
        275                 280                 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
    290                 295                 300

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305                 310                 315                 320

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
                325                 330                 335

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
            340                 345                 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        355                 360                 365
```

```
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385                 390                 395                 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
                405                 410                 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
            420                 425                 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
        435                 440                 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
    450                 455                 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465                 470                 475                 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
                485                 490                 495

Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            500                 505                 510

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        515                 520                 525

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    530                 535                 540

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
545                 550                 555                 560

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu
                565                 570                 575

Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            580                 585                 590

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        595                 600                 605

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    610                 615                 620

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
625                 630                 635                 640

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
                645                 650                 655

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
            660                 665                 670

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
        675                 680                 685

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
```

690 695 700

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
705 710 715 720

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
725 730 735

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
740 745 750

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
755 760 765

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
770 775 780

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
785 790 795 800

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
805 810 815

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu
820 825 830

Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu
835 840 845

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
850 855 860

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
865 870 875 880

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
885 890 895

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
900 905 910

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
915 920 925

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
930 935 940

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
945 950 955 960

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
965 970 975

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
980 985

<210> 80
<211> 984
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Peptit tổng hợp
<400> 80

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
            20                  25                  30

Asp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Val Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ser Ile Thr Thr Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Val Arg His Gly Tyr Tyr Asp Gly Tyr His Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
    130                 135                 140

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

Ala Asn Gln Gly Ile Ser Asn Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
                165                 170                 175

Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu Gln Ser
            180                 185                 190

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
        195                 200                 205

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
    210                 215                 220

Gln Gln Phe Thr Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu
225                 230                 235                 240

Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala
            260                 265                 270

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
        275                 280                 285

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
    290                 295                 300

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr
305                 310                 315                 320
```

```
Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn
                325                 330                 335

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
            340                 345                 350

Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
        355                 360                 365

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr
385                 390                 395                 400

Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly
                405                 410                 415

Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly
            420                 425                 430

Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly
        435                 440                 445

Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu
    450                 455                 460

Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val
465                 470                 475                 480

Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
                485                 490                 495

Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
            500                 505                 510

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
        515                 520                 525

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
    530                 535                 540

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
545                 550                 555                 560

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu
                565                 570                 575

Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
            580                 585                 590

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
        595                 600                 605

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
    610                 615                 620

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
625                 630                 635                 640
```

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
645 650 655

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
660 665 670

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
675 680 685

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
690 695 700

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
705 710 715 720

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
725 730 735

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
740 745 750

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
755 760 765

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
770 775 780

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
785 790 795 800

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
805 810 815

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln
820 825 830

Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
835 840 845

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
850 855 860

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
865 870 875 880

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
885 890 895

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
900 905 910

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
915 920 925

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
930 935 940

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
945 950 955 960

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

965 970 975

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
980

<210> 81
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 81
Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 82
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 82
Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 83
Leu Tyr Asp Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 84
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 84
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 85
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 86
<211> 9
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 86
Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 87
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 87
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 88
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 88
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser

85 90 95

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

<210> 89
<211> 246
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 89
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
130 135 140

Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
145 150 155 160

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

<210> 90

<211> 501
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 90

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
145                 150                 155                 160

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu
                165                 170                 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
            180                 185                 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
        195                 200                 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile
    210                 215                 220

Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly
225                 230                 235                 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
                245                 250                 255

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu
            260                 265                 270

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp
        275                 280                 285

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg
```

290 295 300

Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp
305 310 315 320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
325 330 335

Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg
340 345 350

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly
355 360 365

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro
385 390 395 400

Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser
405 410 415

Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln
420 425 430

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu
435 440 445

Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys
450 455 460

Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr
465 470 475 480

Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
485 490 495

Lys Leu Thr Val Leu
500

<210> 91
<211> 989
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 91
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
130 135 140

Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
145 150 155 160

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
245 250 255

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu
260 265 270

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp
275 280 285

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg
290 295 300

Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp
305 310 315 320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
325 330 335

Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg
340 345 350

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly
355 360 365

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro
385 390 395 400

Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser
405 410 415

Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln
420 425 430

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu
435 440 445

Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys
450 455 460

Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr
465 470 475 480

Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
485 490 495

Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
500 505 510

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
515 520 525

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
530 535 540

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
545 550 555 560

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
565 570 575

Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr
580 585 590

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
595 600 605

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
610 615 620

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
625 630 635 640

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
645 650 655

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
660 665 670

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
675 680 685

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
690 695 700

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
705 710 715 720

```
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly
                725                 730                 735

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
            740                 745                 750

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
        755                 760                 765

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
    770                 775                 780

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
785                 790                 795                 800

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
                805                 810                 815

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
            820                 825                 830

Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu
        835                 840                 845

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
    850                 855                 860

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
865                 870                 875                 880

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
                885                 890                 895

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
            900                 905                 910

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
        915                 920                 925

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
    930                 935                 940

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
945                 950                 955                 960

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
                965                 970                 975

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            980                 985
```

<210> 92
<211> 987
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 92

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

```
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
145                 150                 155                 160

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu
                165                 170                 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
            180                 185                 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
        195                 200                 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile
    210                 215                 220

Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly
225                 230                 235                 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
                245                 250                 255

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu
            260                 265                 270

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp
        275                 280                 285

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg
    290                 295                 300

Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp
305                 310                 315                 320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
                325                 330                 335

Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg
```

```
            340                 345                 350

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly
        355                 360                 365

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro
385                 390                 395                 400

Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser
                405                 410                 415

Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln
            420                 425                 430

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu
        435                 440                 445

Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys
    450                 455                 460

Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr
465                 470                 475                 480

Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
                485                 490                 495

Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
            500                 505                 510

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
        515                 520                 525

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
    530                 535                 540

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
545                 550                 555                 560

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
                565                 570                 575

Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr
            580                 585                 590

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
        595                 600                 605

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
    610                 615                 620

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
625                 630                 635                 640

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
                645                 650                 655

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
            660                 665                 670
```

```
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
        675                 680                 685

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
    690                 695                 700

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
705                 710                 715                 720

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly
                725                 730                 735

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            740                 745                 750

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
        755                 760                 765

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
    770                 775                 780

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
785                 790                 795                 800

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
                805                 810                 815

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys
            820                 825                 830

Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val
        835                 840                 845

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
    850                 855                 860

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
865                 870                 875                 880

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
                885                 890                 895

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
            900                 905                 910

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
        915                 920                 925

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
    930                 935                 940

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
945                 950                 955                 960

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
                965                 970                 975

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            980                 985
```

<210> 93
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 93

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 94
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 94

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 95
<211> 246

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 95

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
145                 150                 155                 160

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu
                165                 170                 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
            180                 185                 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
        195                 200                 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile
    210                 215                 220

Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
225                 230                 235                 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                245
```

<210> 96
<211> 501
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 96

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

1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
130 135 140

Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
145 150 155 160

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
245 250 255

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu
260 265 270

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp
275 280 285

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg
290 295 300

Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp
305 310 315 320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
325 330 335

Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg
340 345 350

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly
355 360 365

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro
385 390 395 400

Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser
405 410 415

Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln
420 425 430

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu
435 440 445

Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys
450 455 460

Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr
465 470 475 480

Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
485 490 495

Lys Leu Thr Val Leu
500

<210> 97
<211> 989
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 97
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

```
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
    130                 135                 140

Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
145                 150                 155                 160

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu
                165                 170                 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
            180                 185                 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
        195                 200                 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile
    210                 215                 220

Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
225                 230                 235                 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
                245                 250                 255

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu
            260                 265                 270

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp
        275                 280                 285

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg
    290                 295                 300

Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp
305                 310                 315                 320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
                325                 330                 335

Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg
            340                 345                 350

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly
        355                 360                 365

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro
385                 390                 395                 400

Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser
                405                 410                 415

Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln
            420                 425                 430
```

```
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu
        435                 440                 445

Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys
    450                 455                 460

Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr
465                 470                 475                 480

Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
                485                 490                 495

Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
            500                 505                 510

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
        515                 520                 525

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
    530                 535                 540

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
545                 550                 555                 560

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
                565                 570                 575

Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr
            580                 585                 590

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
        595                 600                 605

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
    610                 615                 620

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
625                 630                 635                 640

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
                645                 650                 655

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
            660                 665                 670

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
        675                 680                 685

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
    690                 695                 700

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
705                 710                 715                 720

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly
                725                 730                 735

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
            740                 745                 750

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
```

```
        755                 760                 765

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
    770                 775                 780

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
785                 790                 795                 800

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
                805                 810                 815

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
            820                 825                 830

Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu
        835                 840                 845

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
    850                 855                 860

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
865                 870                 875                 880

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
                885                 890                 895

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
            900                 905                 910

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
        915                 920                 925

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
    930                 935                 940

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
945                 950                 955                 960

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
                965                 970                 975

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            980                 985

<210>  98
<211>  987
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
<220>
<223>  Peptit tổng hợp
<400>  98
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

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

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

Gly Trp Ile Tyr Phe Ala Ser Gly Asn Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
```

50 55 60

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

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

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
130 135 140

Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
145 150 155 160

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
195 200 205

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Ser Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Cys Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
245 250 255

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu
260 265 270

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp
275 280 285

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg
290 295 300

Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp
305 310 315 320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
325 330 335

Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg
340 345 350

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly
355 360 365

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
370 375 380

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro
385                 390                 395                 400

Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser
                405                 410                 415

Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln
            420                 425                 430

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu
        435                 440                 445

Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys
    450                 455                 460

Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr
465                 470                 475                 480

Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
                485                 490                 495

Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
            500                 505                 510

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
        515                 520                 525

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
    530                 535                 540

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
545                 550                 555                 560

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
                565                 570                 575

Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr
            580                 585                 590

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
        595                 600                 605

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
    610                 615                 620

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
625                 630                 635                 640

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
                645                 650                 655

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
            660                 665                 670

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
        675                 680                 685

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
    690                 695                 700
```

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
705 710 715 720

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly
725 730 735

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
740 745 750

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
755 760 765

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
770 775 780

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
785 790 795 800

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
805 810 815

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys
820 825 830

Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val
835 840 845

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
850 855 860

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
865 870 875 880

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
885 890 895

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
900 905 910

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
915 920 925

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
930 935 940

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
945 950 955 960

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
965 970 975

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
980 985

<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 99

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 100
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 101
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 101
Glu Leu Lys Thr Pro Leu Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro
1 5 10 15

<210> 102
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 102
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

<210> 103
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 103
Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro

<210> 104
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 104
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 105
<211> 994
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Peptit tổng hợp
<400> 105

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Pro Arg Asp Phe Asp
            100                 105                 110

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Thr Val Met Thr
    130                 135                 140

Gln Thr Pro Leu Ser Ser His Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile
145                 150                 155                 160

Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
                165                 170                 175

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
            180                 185                 190

Tyr Arg Ile Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
        195                 200                 205

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile Ser Arg Val Glu Ala
    210                 215                 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Thr His Val Pro Arg
225                 230                 235                 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys
        275                 280                 285

Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
    290                 295                 300

Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala
305                 310                 315                 320
```

```
Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn
                325                 330                 335

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val
            340                 345                 350

Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr
        355                 360                 365

Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val
385                 390                 395                 400

Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr
                405                 410                 415

Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro
            420                 425                 430

Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly
        435                 440                 445

Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
    450                 455                 460

Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu
465                 470                 475                 480

Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val
                485                 490                 495

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys
            500                 505                 510

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
        515                 520                 525

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
    530                 535                 540

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
545                 550                 555                 560

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
                565                 570                 575

Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys
            580                 585                 590

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
        595                 600                 605

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
    610                 615                 620

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
625                 630                 635                 640
```

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
645 650 655

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
660 665 670

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
675 680 685

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
690 695 700

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
705 710 715 720

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
725 730 735

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
740 745 750

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
755 760 765

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
770 775 780

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
785 790 795 800

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
805 810 815

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
820 825 830

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg
835 840 845

Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
850 855 860

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
865 870 875 880

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
885 890 895

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
900 905 910

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
915 920 925

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
930 935 940

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
945 950 955 960

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

965 970 975

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
980 985 990

Gly Lys

<210> 106
<211> 984
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 106
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Pro Arg Asp Phe Asp
100 105 110

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Thr Val Met Thr
130 135 140

Gln Thr Pro Leu Ser Ser His Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile
145 150 155 160

Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
165 170 175

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
180 185 190

Tyr Arg Ile Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile Ser Arg Val Glu Ala
210 215 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Thr His Val Pro Arg
225 230 235 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly

245 250 255

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
260 265 270

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys
275 280 285

Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
290 295 300

Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala
305 310 315 320

Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn
325 330 335

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val
340 345 350

Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr
355 360 365

Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
370 375 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val
385 390 395 400

Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr
405 410 415

Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro
420 425 430

Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly
435 440 445

Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
450 455 460

Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu
465 470 475 480

Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val
485 490 495

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys
500 505 510

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
515 520 525

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
530 535 540

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
545 550 555 560

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
565 570 575

```
Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys
            580                 585                 590

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
        595                 600                 605

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
    610                 615                 620

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
625                 630                 635                 640

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
                645                 650                 655

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
            660                 665                 670

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
        675                 680                 685

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
    690                 695                 700

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
705                 710                 715                 720

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                725                 730                 735

Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
            740                 745                 750

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
        755                 760                 765

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
    770                 775                 780

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
785                 790                 795                 800

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
                805                 810                 815

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln
            820                 825                 830

Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
        835                 840                 845

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
    850                 855                 860

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
865                 870                 875                 880

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
                885                 890                 895
```

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
900 905 910

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
915 920 925

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
930 935 940

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
945 950 955 960

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
965 970 975

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
980

<210> 107
<211> 1004
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 107
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Pro Arg Asp Phe Asp
100 105 110

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Thr Val Met Thr
130 135 140

Gln Thr Pro Leu Ser Ser His Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile
145 150 155 160

Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
165 170 175

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
180 185 190

```
Tyr Arg Ile Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
        195                 200                 205

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile Ser Arg Val Glu Ala
    210                 215                 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Thr His Val Pro Arg
225                 230                 235                 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys
        275                 280                 285

Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
    290                 295                 300

Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn
                325                 330                 335

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val
            340                 345                 350

Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr
        355                 360                 365

Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val
385                 390                 395                 400

Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr
                405                 410                 415

Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro
            420                 425                 430

Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly
        435                 440                 445

Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
    450                 455                 460

Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu
465                 470                 475                 480

Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val
                485                 490                 495

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys
            500                 505                 510

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
```

515 520 525

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
530 535 540

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
545 550 555 560

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
565 570 575

Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys
580 585 590

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
595 600 605

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
610 615 620

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
645 650 655

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
660 665 670

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
675 680 685

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
690 695 700

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
705 710 715 720

Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu
725 730 735

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
740 745 750

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
755 760 765

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
770 775 780

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
785 790 795 800

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
805 810 815

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
820 825 830

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
835 840 845

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
850 855 860

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly
865 870 875 880

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
885 890 895

Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
900 905 910

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
915 920 925

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
930 935 940

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
945 950 955 960

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
965 970 975

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
980 985 990

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
995 1000

<210> 108
<211> 994
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 108
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Pro Arg Asp Phe Asp
100 105 110

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

```
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Thr Val Met Thr
    130                 135                 140

Gln Thr Pro Leu Ser Ser His Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile
145                 150                 155                 160

Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
                165                 170                 175

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
            180                 185                 190

Tyr Arg Ile Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
        195                 200                 205

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile Ser Arg Val Glu Ala
    210                 215                 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Thr His Val Pro Arg
225                 230                 235                 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys
        275                 280                 285

Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
    290                 295                 300

Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn
                325                 330                 335

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val
            340                 345                 350

Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr
        355                 360                 365

Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val
385                 390                 395                 400

Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr
                405                 410                 415

Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro
            420                 425                 430

Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly
        435                 440                 445
```

Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
450 455 460

Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu
465 470 475 480

Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val
485 490 495

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Asp Lys
500 505 510

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
515 520 525

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
530 535 540

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
545 550 555 560

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
565 570 575

Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys
580 585 590

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
595 600 605

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
610 615 620

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
645 650 655

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
660 665 670

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
675 680 685

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
690 695 700

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr
705 710 715 720

Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
725 730 735

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
740 745 750

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
755 760 765

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

770 775 780

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
785 790 795 800

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
805 810 815

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
820 825 830

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
835 840 845

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
850 855 860

Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
865 870 875 880

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
885 890 895

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
900 905 910

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
915 920 925

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
930 935 940

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
945 950 955 960

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
965 970 975

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
980 985 990

Gly Lys

<210> 109
<211> 984
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit tổng hợp
<400> 109
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

```
    50                  55                  60
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asn Pro Arg Asp Phe Asp
            100                 105                 110

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Thr Val Met Thr
    130                 135                 140

Gln Thr Pro Leu Ser Ser His Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile
145                 150                 155                 160

Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
                165                 170                 175

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
            180                 185                 190

Tyr Arg Ile Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
        195                 200                 205

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile Ser Arg Val Glu Ala
    210                 215                 220

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Thr His Val Pro Arg
225                 230                 235                 240

Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Lys
        275                 280                 285

Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
    290                 295                 300

Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn
                325                 330                 335

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val
            340                 345                 350

Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ser Tyr
        355                 360                 365

Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
    370                 375                 380
```

```
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Thr Val
385                 390                 395                 400

Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr
                405                 410                 415

Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Ser Gly Asn Tyr Pro
            420                 425                 430

Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly Leu Ile Gly
        435                 440                 445

Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
    450                 455                 460

Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Val Gln Pro Glu
465                 470                 475                 480

Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn Arg Trp Val
                485                 490                 495

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ala Pro
            500                 505                 510

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        515                 520                 525

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    530                 535                 540

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
545                 550                 555                 560

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr
                565                 570                 575

Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            580                 585                 590

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
        595                 600                 605

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gly Gly Gly
    610                 615                 620

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
625                 630                 635                 640

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                645                 650                 655

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            660                 665                 670

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        675                 680                 685

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu
    690                 695                 700
```

```
Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
705                 710                 715                 720

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                725                 730                 735

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            740                 745                 750

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        755                 760                 765

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    770                 775                 780

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
785                 790                 795                 800

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                805                 810                 815

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            820                 825                 830

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
        835                 840                 845

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    850                 855                 860

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gln Pro
865                 870                 875                 880

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
                885                 890                 895

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
            900                 905                 910

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
        915                 920                 925

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
    930                 935                 940

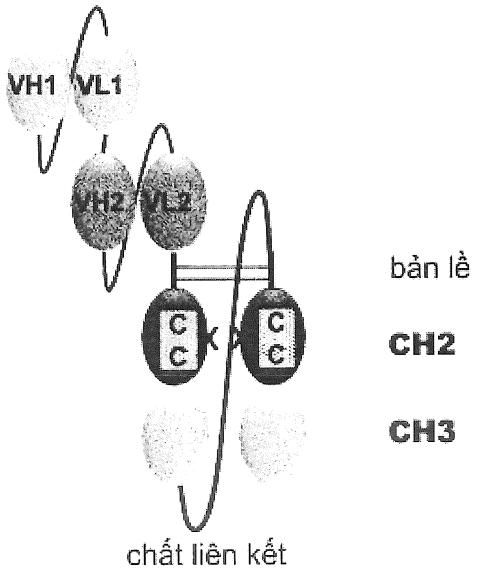
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
945                 950                 955                 960

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
                965                 970                 975

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            980
```

Fig.1

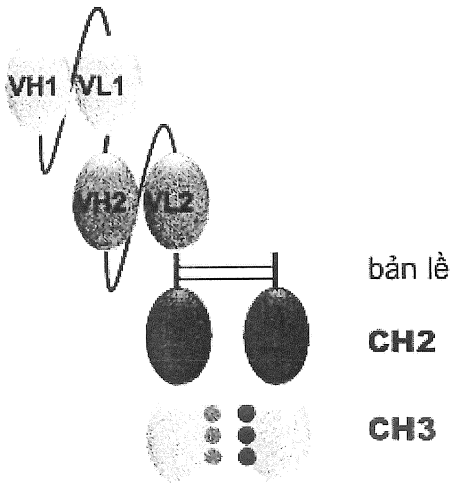
a) Cấu trúc kháng thể Fc chuỗi đơn đặc hiệu kép



C
C = liên kết disulfua trong chuỗi

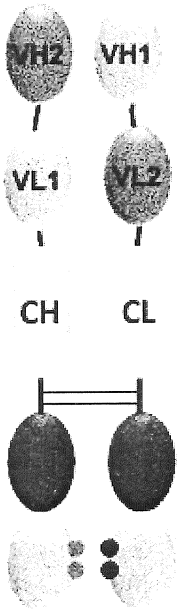
X = vị trí glycosyl hóa được loại bỏ

b) Cấu trúc kháng thể HeteroFc đặc hiệu kép



● ● = các vị trí bắt cặp điện tích

c) Cấu trúc thể X đặc hiệu kép



● ● = các vị trí bắt cặp điện tích

d) Cấu trúc dung hợp albumin người đặc hiệu kép

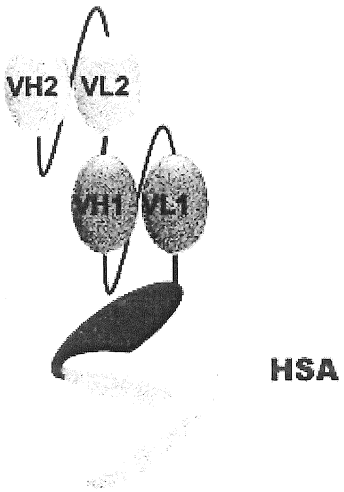


Fig.2

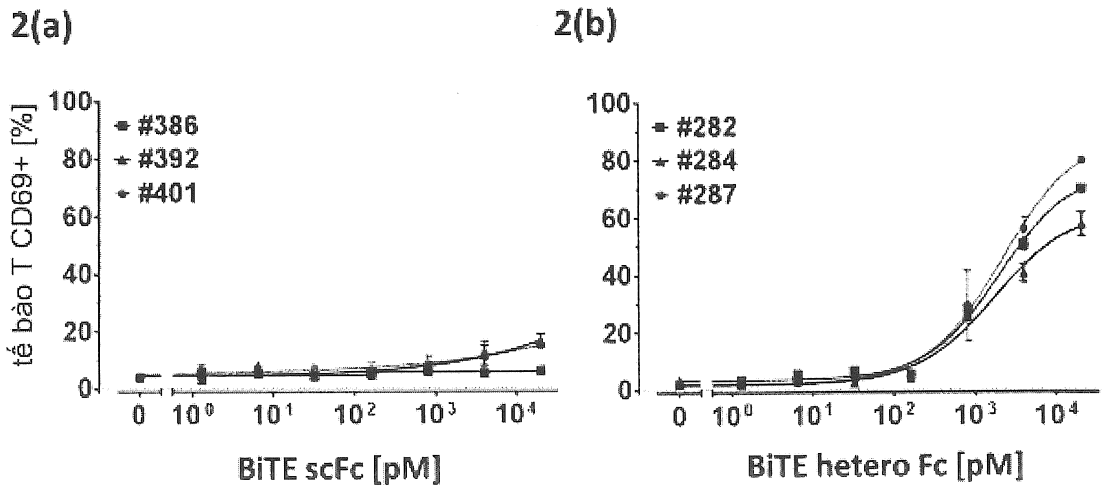

2(a)
2(b)
tế bào T CD69+ [%]
#386
#392
#401
#282
#284
#287
BiTE scFc [pM]
BiTE hetero Fc [pM]

Fig.3

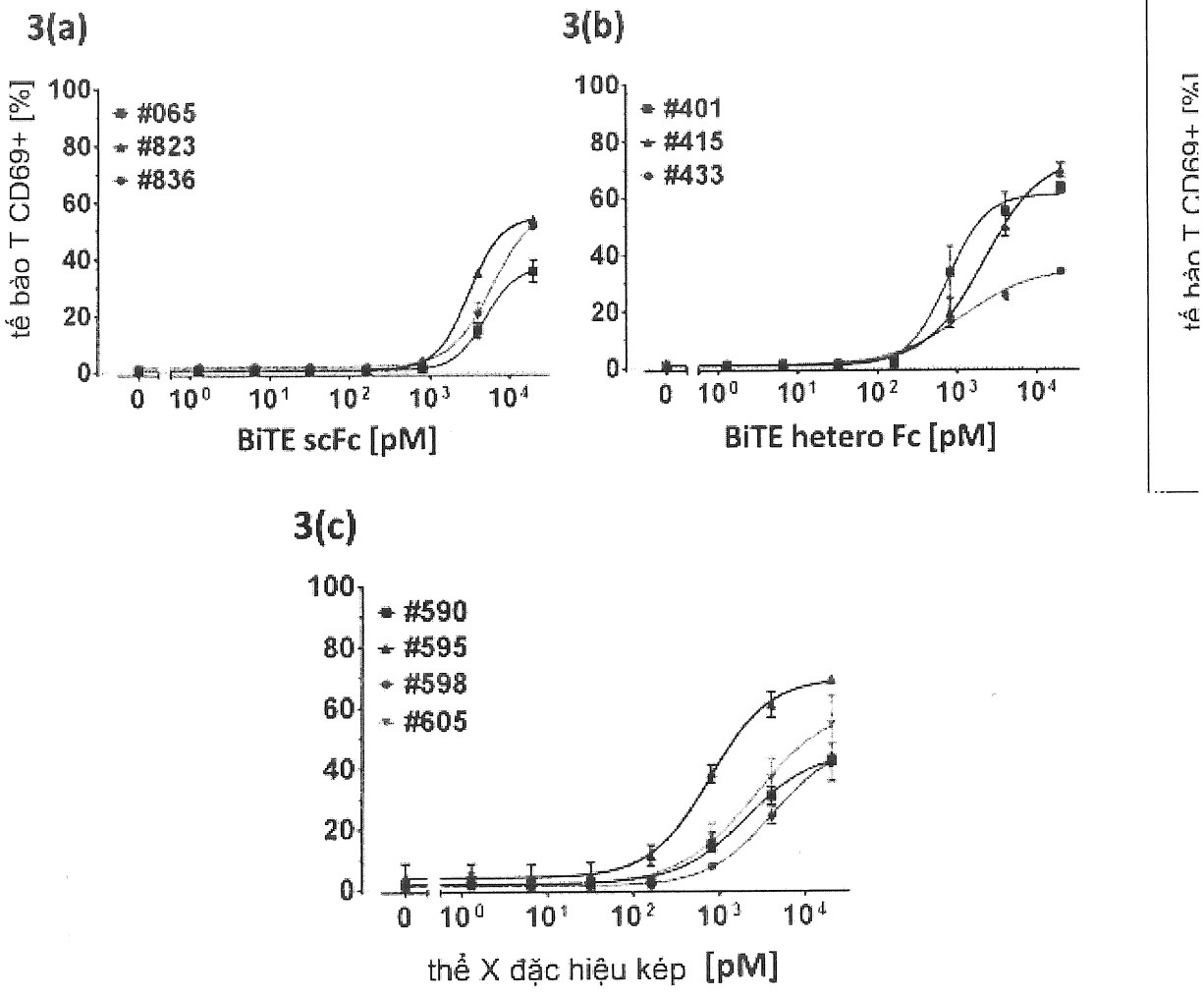
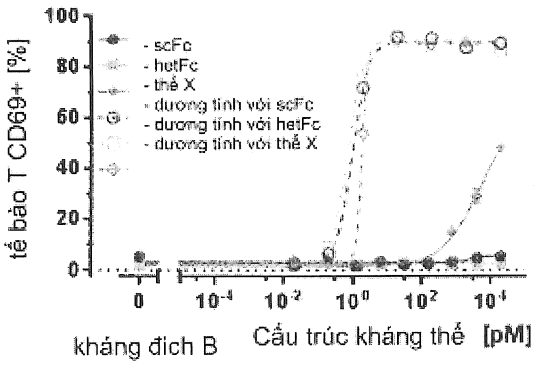
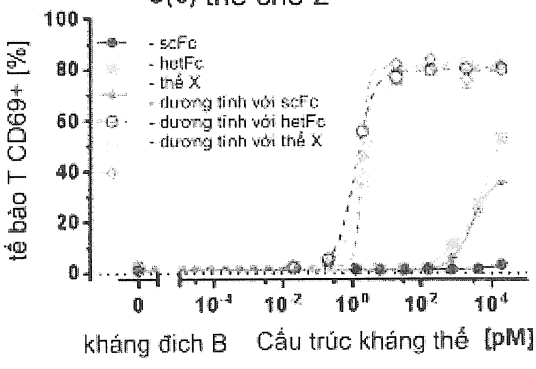

3(a)
3(b)
3(c)
tế bào T CD69+ [%]
#065
#823
#836
#401
#415
#433
#590
#595
#598
#605
BiTE scFc [pM]
BiTE hetero Fc [pM]
thể X đặc hiệu kép [pM]

Fig.3 (tiếp)

3(d) thể cho 1



3(e) thể cho 2



3(f) thể cho 3

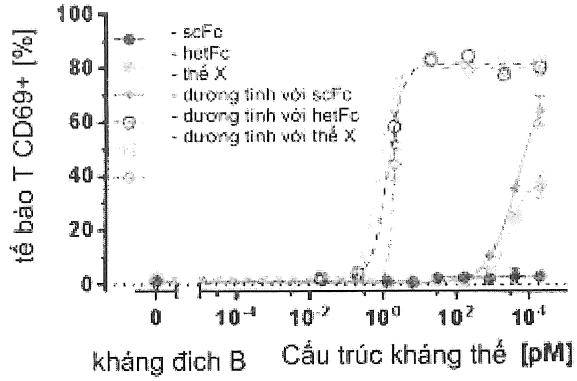


Fig.4

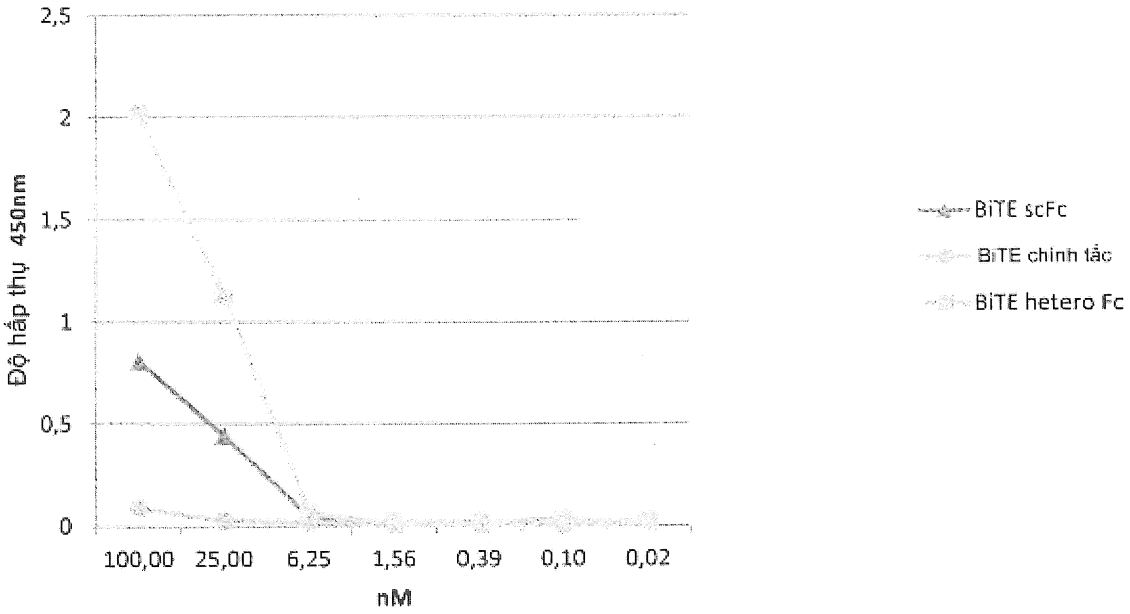

2,5
2
1,5
1
0,5
0
Độ hấp thụ 450nm
100,00
25,00
6,25
1,56
0,39
0,10
0,02
nM
BiTE scFc
BiTE chinh tắc
BiTE hetero Fc

Fig.5

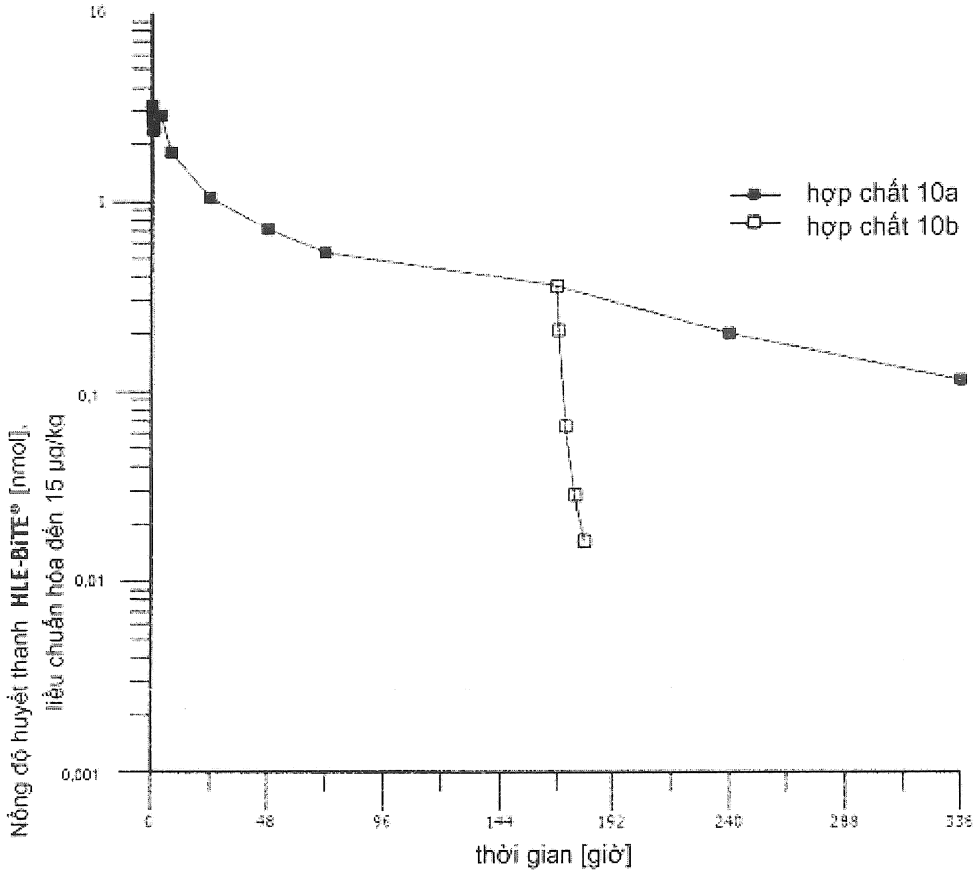

hợp chất 10a
hợp chất 10b
Nồng độ huyết thanh HLE-BiTE® [nmol], liều chuẩn hóa đến 15 µg/kg
thời gian [giờ]
0,001
0,01
0,1
1
10
0
48
96
144
192
240
288
336

Fig.6

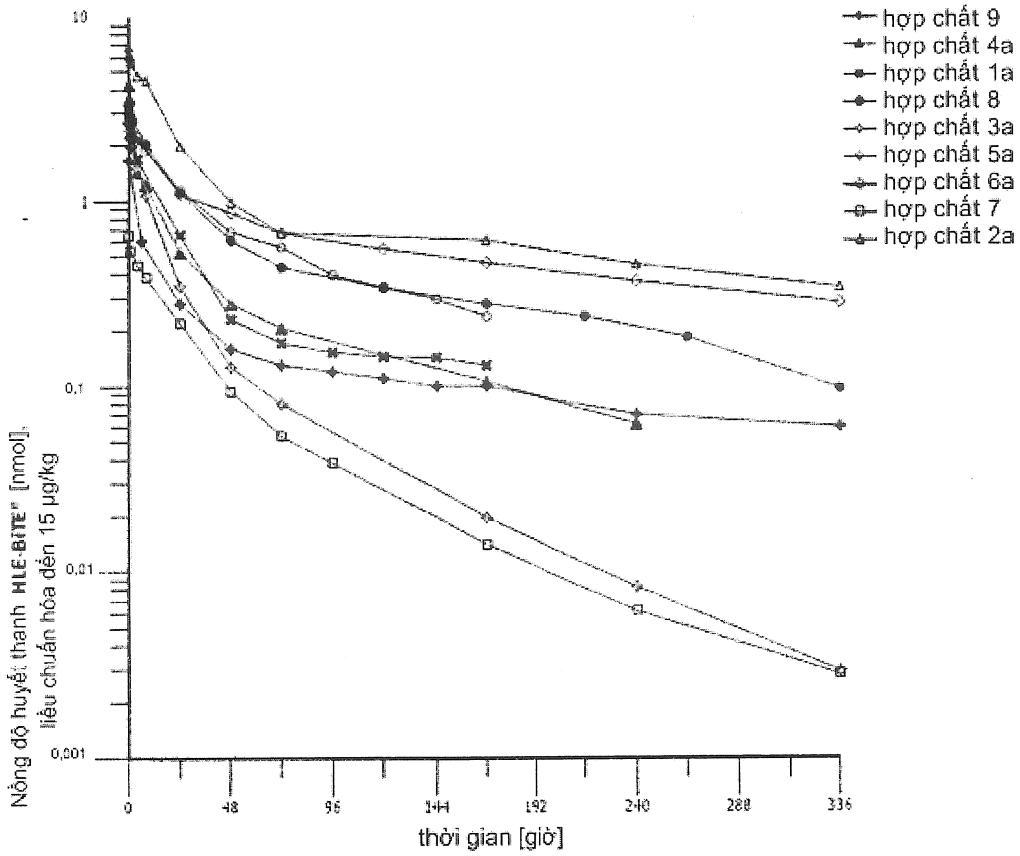

hợp chất 9
hợp chất 4a
hợp chất 1a
hợp chất 8
hợp chất 3a
hợp chất 5a
hợp chất 6a
hợp chất 7
hợp chất 2a
10
1
0,1
0,01
0,001
0
48
96
144
192
240
288
336
thời gian [giờ]
Nồng độ huyết thanh HLE-BITE® [nmol], liều chuẩn hóa đến 15 µg/kg

Fig.7

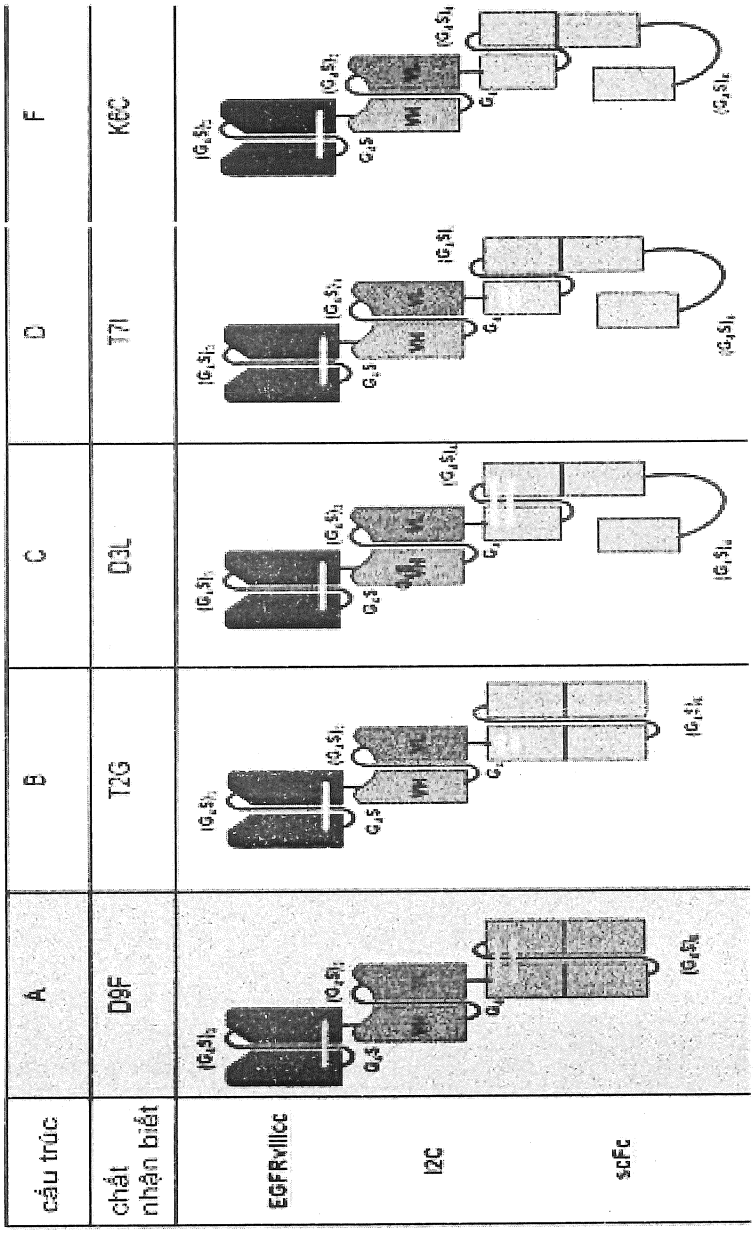

cấu trúc
chất nhận biết
A
B
C
D
F
D9F
T2G
D3L
T7I
KEC
EGFRvIIIcc
I2C
scFc

Fig.8A

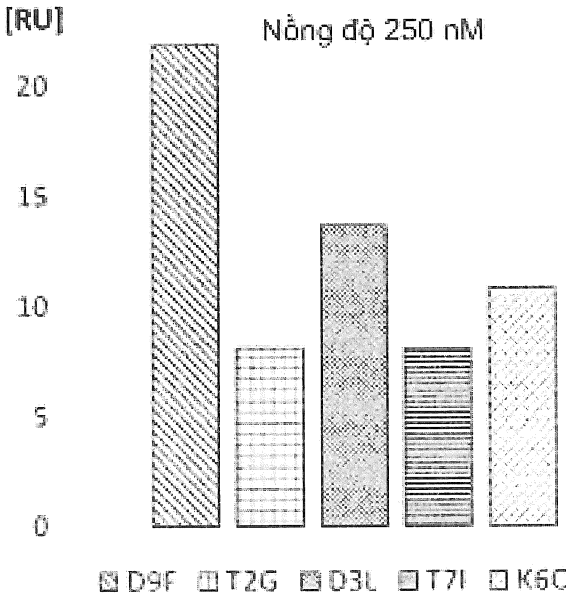

[RU]
Nồng độ 250 nM
20
15
10
5
0
D9F
T2G
D3L
T7I
K6C

Fig.8B

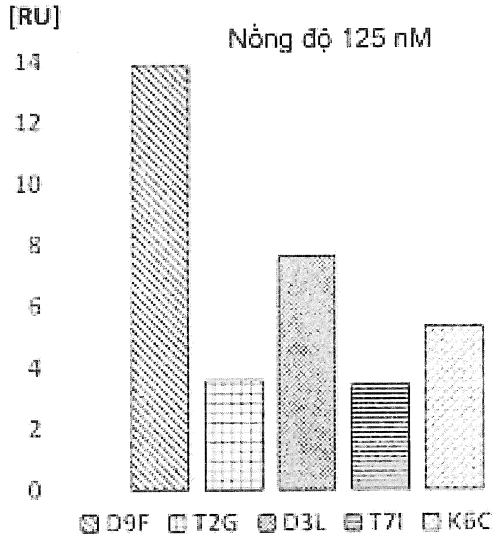

[RU]
Nồng độ 125 nM
14
12
10
8
6
4
2
0
D9F
T2G
D3L
T7I
K6C

Fig.9

