



(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)



1-0039041

(51)<sup>7</sup> C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2015-01285

(22) 12/09/2013

(86) PCT/US2013/059481 12/09/2013

(87) WO 2014/043361 A1 20/03/2014

(30) PCT/EP2012/003819 12/09/2012 EP; 61/776,715 11/03/2013 US

(45) 25/03/2024 432

(43) 25/08/2015 329A

(73) GENZYME CORPORATION (US)

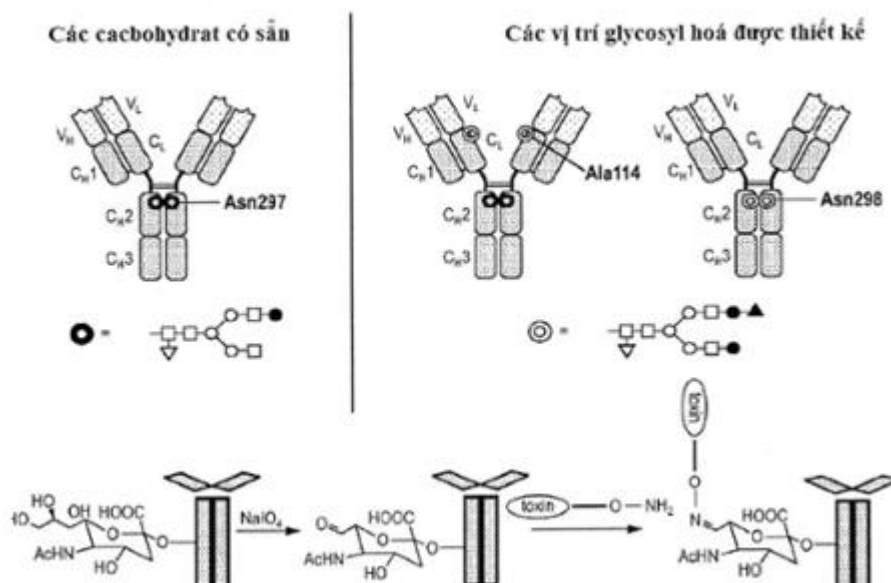
500 Kendall Street, Cambridge, Massachusetts 02142, United States of America

(72) PAN, Clark (US); QIU, Huawei (US).

(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP GỒM MIỀN FC CỦA IGG1 Ở NGƯỜI VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất các polypeptit liên kết (ví dụ, các kháng thể), và các liên hợp thuốc của chúng, bao gồm miền Fc với tính chất glycosyl hóa biến đổi và chức năng phản ứng lại kích thích suy giảm. Theo phương án cụ thể, miền Fc bao gồm: gốc asparagin ở vị trí axit amin 298, theo cách đánh số của EU; và gốc serin hoặc threonin ở vị trí axit amin 300, theo cách đánh số của EU. Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic mã hóa các polypeptit liên kết kháng nguyên, các vector biểu hiện tái tổ hợp và các tế bào chủ để tạo ra các polypeptit liên kết kháng nguyên như vậy. Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp sử dụng các polypeptit liên kết kháng nguyên theo sáng chế để điều trị bệnh.



### Các sáng chế liên quan

Sáng chế này xin hưởng quyền ưu tiên từ đơn Sáng chế Quốc tế PCT/EP2012/003.819, có tên “Anti-Alpha Beta TCR Antibodies”, nộp ngày 12 tháng 9 năm 2012 và đơn Sáng chế Mỹ tạm thời 61/776.715, mang tên “Fc Containing Polypeptides With Altered Glycosylation and Reduced Effector Function”, nộp ngày 11 tháng 3 năm 2013.

Các sáng chế cũng liên quan đến Sáng chế Mỹ tạm thời 61/776.724, mang tên “Site-Specific Antibody Drug Conjugation Through Glycoengineering”, nộp 11 tháng 3 năm 2013 và đơn Sáng chế Mỹ tạm thời 61/776.710, mang tên “Hyperglycosylated Binding Polypeptides” nộp ngày 11 tháng 3, năm 2013.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập gồm miền Fc chứa asparagin được glycosyl hóa và chế phẩm chứa kháng thể này.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các kháng thể với glycosyl hóa Fc bị suy giảm hoặc bị huỷ bỏ đã được sử dụng để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn viêm nhiễm và tự miễn dịch để làm giảm các tác dụng phụ hoặc độc tính liên quan đến chức năng phản ứng lại kích thích không mong muốn (ví dụ xem, Chan and Carter, Nat. Reviews Immunology, 2010). Tuy nhiên, glycosyl hóa miền Fc của kháng thể có vai trò quan trọng đối với cấu trúc, sự ổn định, và chức năng của kháng thể và glycosyl hóa có thể dẫn đến các kháng thể với các đặc tính sinh lý xấu. Do đó, có nhu cầu trong lĩnh vực kỹ thuật đối với các protein liên kết được thiết kế với chức năng phản ứng lại kích thích suy giảm nhưng cũng vẫn duy trì các đặc tính mong muốn của miền Fc được glycosyl hóa.

Đơn sáng chế quốc tế WO 2004/099249 bộc lộ các biến thể Fc, các phương pháp tạo ra chúng, và các kháng thể và các dung hợp Fc chứa các biến thể Fc trên. Tuy nhiên các biến thể Fc có glycosyl hoá biến đổi và chức năng phản ứng lại kích thích suy giảm không được bộc lộ.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế cải tiến tình trạng kỹ thuật bằng cách đề xuất các polypeptit liên kết (ví dụ, các kháng thể hoặc dung hợp), và tùy ý các liên hợp thuộc của chúng, bao gồm miền Fc với glycosyl hóa biến đổi và chức năng phản ứng lại kích thích suy giảm. Theo các phương án điển hình, miền Fc bao gồm: gốc asparagin ở vị trí axit amin 298, theo cách đánh số của EU; và gốc serin hoặc threonin ở vị trí axit amin 300, theo cách đánh số của EU. Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic mã hóa các polypeptit liên kết kháng nguyên, các vector biểu hiện tái tổ hợp và các tế bào chủ để tạo ra các polypeptit liên kết kháng nguyên như vậy. Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp sử dụng các polypeptit liên kết kháng nguyên này để điều trị bệnh.

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng các polypeptit liên kết (ví dụ, các kháng thể) theo sáng chế thể hiện các đặc tính glycosyl hóa biến đổi mà thuận lợi trong việc hủy bỏ liên kết của polypeptit liên kết với các thụ thể Fcγ, do đó thay đổi chức năng phản ứng lại kích thích của polypeptit liên kết trong khi vẫn duy trì các đặc tính sinh lý mong muốn có được bởi glycosyl hóa. Hơn nữa, vị trí glycosyl hóa liên kết ở nguyên tử N được thiết kế ở vị trí axit amin 298 cũng có thể được dùng làm nơi để liên hợp các nhóm chức phản ứng lại kích thích, chẳng hạn như các loại thuốc gây độc tế bào.

Sáng chế được xác định bằng các yêu cầu bảo hộ.

Theo đó, sáng chế đề xuất polypeptit liên kết được phân lập bao gồm miền Fc với glycosyl hóa bị biến đổi, trong đó miền Fc bao gồm: gốc asparagin ở vị trí axit amin 298, theo cách đánh số của EU; và gốc serin hoặc threonin ở vị trí axit amin 300, theo cách đánh số của EU, và trong đó polypeptit liên kết thể hiện chức năng phản ứng lại kích thích suy giảm do glycosyl hóa bị biến đổi ở trên. Theo một phương án, polypeptit liên kết còn bao gồm gốc alanin ở vị trí axit amin 299, theo cách đánh số của EU. Theo phương án khác, polypeptit liên kết còn bao gồm gốc glutamin ở vị trí axit

amin 297, theo cách đánh số của EU. Theo sáng chế, miền Fc là miền Fc của IgG1. Theo sáng chế, miền Fc là ở người.

Theo một phương án, chuỗi bên của gốc asparagin được liên kết với polysacarit qua liên kết  $\beta$ -glycosylamit. Theo phương án khác, polysacarit là polysacarit có hai nhánh. Theo phương án khác, polysacarit là glycoform tự nhiên ở động vật có vú.

Theo phương án khác, polypeptit liên kết có ái lực đối với thụ thể Fc $\gamma$  thấp hơn so với liên kết polypeptit có miền Fc tự nhiên. Theo một phương án, thụ thể Fc $\gamma$  là Fc $\gamma$ RI và/hoặc Fc $\gamma$ RIIIa. Theo phương án khác, polypeptit liên kết có ái lực đối với thụ thể FcRn tương tự như polypeptit liên kết có miền Fc tự nhiên.

Theo phương án khác, polysacarit gồm nhóm andehyt phản ứng. Theo phương án khác, polysacarit gồm gốc sacarit bị oxy hóa bao gồm nhóm andehyt phản ứng. Theo phương án khác, gốc sacarit bị oxy hóa là axit sialic hoặc galactoze ở vị trí cuối.

Theo phương án khác, polysacarit được liên kết với nhóm chức phản ứng lại kích thích. Theo phương án khác, nhóm chức phản ứng lại kích thích là chất gây độc tế bào. Theo phương án khác, chất gây độc tế bào được lựa chọn từ nhóm các chất gây độc tế bào được liệt kê trong Bảng 1. Theo phương án khác, nhóm chức phản ứng lại kích thích là tác nhân phát hiện. Theo phương án khác, nhóm chức phản ứng lại kích thích được liên kết qua liên kết oxim hoặc hydrazon với gốc sacarit của polysacarit. Theo phương án khác, gốc sacarit là axit sialic hoặc gốc galactoze ở vị trí cuối của polysacarit. Theo phương án khác, nhóm chức phản ứng lại kích thích gồm mỗi liên kết nhạy pH, mỗi liên kết disulfua, mỗi liên kết nhạy enzym hoặc nhóm chức liên kết khác có thể tách ra được. Theo phương án khác, nhóm chức phản ứng lại kích thích gồm nhóm chức liên kết được chọn từ nhóm các nhóm chức liên kết được mô tả trong Bảng 2 hoặc 14. Được bộc lộ thêm là polypeptit liên kết là kháng thể hoặc immunoadhesin (bám dính miễn dịch).



Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit liên kết được phân lập bao gồm miền Fc, trong đó miền Fc bao gồm: gốc asparagin tự do tại vị trí axit amin 298, theo cách đánh số của EU; và gốc serin hoặc threonin tự do ở vị trí axit amin 300, theo cách đánh số của EU.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit liên kết được phân lập bao gồm miền Fc, trong đó miền Fc bao gồm: gốc asparagin bị biến đổi ở vị trí axit amin 298, theo cách đánh số của EU; và gốc serin hoặc threonin tự do ở vị trí axit amin 300, theo cách đánh số của EU.

Theo phương án khác, nhóm chức phản ứng lại kích thích được liên kết qua chuỗi bên của các gốc asparagin bị biến đổi với gốc sacarit của polysacarit. Theo một phương án, sacarit là axit sialic hoặc gốc galactoze ở vị trí cuối của polysacarit. Theo một phương án, nhóm chức phản ứng lại kích thích được liên kết qua liên kết oxim hoặc hydrazon với gốc sacarit của polysacarit. Theo một phương án, sacarit là một axit sialic hoặc gốc galactoze ở vị trí cuối của polysacarit. Theo phương án khác, gốc asparagin bị biến đổi được liên kết với nhóm chức phản ứng lại kích thích của thuốc để tạo thành liên hợp thuốc kháng thể (ADC).

Theo khía cạnh khác, dược phẩm chứa polypeptit liên kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên và chất mang hoặc tá dược được dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị trong đó bao gồm việc dùng một lượng có hiệu quả dược phẩm theo sáng chế cho bệnh nhân.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa polypeptit liên kết theo sáng chế. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vector biểu hiện gồm polynucleotit hoặc tế bào chủ gồm polynucleotit hoặc vector biểu hiện.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra polypeptit liên kết bao gồm biểu hiện polynucleotit hoặc vector biểu hiện trong tế bào.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ minh họa của quá trình tổng hợp liên hợp thuốc kháng thể trong đó nhóm chức độc tố được liên kết với gốc axit sialic bị oxy hóa của polysacarit kháng thể bằng cách sử dụng liên kết oxim.

Hình 2 là gel màu xanh Coomassi cho thấy sự biểu hiện và thanh lọc các đột biến glycosyl hóa.

Hình 3 mô tả các kết quả của các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt được sử dụng để đánh giá liên kết của các đột biến kháng thể  $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG với Fc $\gamma$ RIIIa tái tổ hợp ở người (V158 & F158).

Hình 4 mô tả các kết quả của các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt được sử dụng để đánh giá liên kết của các đột biến kháng thể  $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG với Fc $\gamma$ RI tái tổ hợp ở người.

Hình 5 mô tả đặc trưng giải phóng cytokin từ PBMCs đối với TNF $\alpha$ , GM-CSF, IFN $\gamma$  và IL10 với sự có mặt của các kháng thể đột biến kháng- $\alpha\beta$ TCR (ngày 2).

Hình 6 mô tả đặc trưng giải phóng cytokin từ PBMCs đối với IL6, IL4 và IL2 với sự có mặt của các kháng thể đột biến kháng- $\alpha\beta$ TCR (ngày 2).

Hình 7 mô tả đặc trưng giải phóng từ PBMCs đối với TNF $\alpha$ , GM-CSF, IFN $\gamma$  và IL10 với sự có mặt của các kháng thể đột biến kháng- $\alpha\beta$ TCR (ngày 4).

Hình 8 mô tả đặc trưng giải phóng từ PBMCs đối với IL6, IL4 và IL2 với sự có mặt của các kháng thể đột biến kháng- $\alpha\beta$ TCR (ngày 4).

Hình 9 mô tả các kết quả của các thử nghiệm nghiên cứu mức độ biểu hiện của các đột biến 2C3 bằng Western blotting và cộng hưởng plasmon bề mặt.

Hình 10 mô tả các kết quả của các thử nghiệm nghiên cứu glycosyl hóa của các đột biến 2C3 trước và sau khi điều trị PNGase F.

Hình 11 mô tả các kết quả của các thử nghiệm SDS-PAGE nghiên cứu các vị trí glycosyl hóa trên các đột biến 2C3 được phân lập từ nuôi cấy tế bào.

Hình 12 mô tả các kết quả của các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt được sử dụng để đánh giá liên kết kháng-CD52 bị biến đổi với Fc $\gamma$ RIIIa tái tổ hợp ở người (V158). Kháng-CD52 bao gồm các đột biến S298N/Y300S ở miền Fc đã được sử dụng để đánh giá chức năng phản ứng lại kích thích của phân tử bị biến đổi liên kết với CD52 peptit (A), liên kết với Fc $\gamma$ RIIIa (V158, B), và đối chứng liên kết với FcRn ở chuột (C).

Hình 13 mô tả các kết quả của các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt nghiên cứu các đặc tính liên kết Fc của các đột biến 2C3.

Hình 14 mô tả các kết quả của các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt nghiên cứu liên kết của kháng-CD52 bị biến đổi với cả Fc $\gamma$ RIIIa (Val158) (như trên) và Fc $\gamma$ RIIIa (Phe158). Các kháng thể kháng-CD52 bao gồm các đột biến S298N/Y300S ở miền Fc đã được sử dụng để đánh giá chức năng phản ứng lại kích thích của phân tử bị biến đổi liên kết với Fc $\gamma$ RIIIa (Val158, Hình 14A) và Fc $\gamma$ RIIIa (Phe58, Hình 14B).

Hình 15 mô tả phân tích của liên kết C1q trong đột biến S298N/Y300S và đối chứng WT 2C3 (A) và các kết quả của phân tích Eliza xác nhận lớp phủ tương đương của các giếng.

Hình 16 mô tả các kết quả của các thử nghiệm cộng hưởng plasmon đo các động học liên kết của các đột biến 2C3 với CD-52 peptit 741.

Hình 17 mô tả các kết quả của các thử nghiệm cộng hưởng plasmon so sánh ái lực liên kết kháng nguyên của WT kháng-CD-52 2C3 và đột biến A114N hyperglycosyl hóa.

Hình 18 mô tả các kết quả của các thử nghiệm đẳng điện tập trung và xác định đặc tính điện tích khối phổ để xác định hàm lượng polysacarit của các đột biến 2C3.

Hình 19 mô tả các kết quả của các thử nghiệm cô đặc (Octet) và cộng hưởng plasmon so sánh ái lực liên kết kháng nguyên của WT kháng-CD-52 2C3 và các đột biến.

Hình 20 mô tả các kết quả của các thử nghiệm SDS-PAGE để xác định hàm lượng polysacarit của đột biến A114N kháng-TME1.

Hình 21 mô tả các kết quả của SDS-PAGE và phân tích sắc ký tương tác kỵ nước của đột biến A114N kháng-HER2.

Hình 22 mô tả các kết quả của các thử nghiệm SDS-PAGE để chứng minh sự liên hợp của PEG với đột biến A114N 2C3 thông qua liên kết aminooxy.

Hình 23 mô tả các kết quả của các thử nghiệm LC-MS để xác định các hàm lượng polysacarit của đột biến kháng-TEM1 A114N hyperglycosyl hóa.

Hình 24 mô tả các kết quả của các thử nghiệm LC-MS để xác định các hàm lượng polysacarit của kháng thể HER2 dạng tự nhiên và đột biến A114N kháng-HER2 hyperglycosyl hóa.

Hình 25 mô tả phương pháp điển hình để thực hiện sự liên hợp vị trí cụ thể của kháng thể theo các phương pháp của sáng chế.

Hình 26 mô tả sự tổng hợp các nhóm chức phản ứng lại kích thích điển hình của sáng chế: aminooxy-Cys-MC-VC-PABC-MMAE và aminooxy-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10.

Hình 27 mô tả thông tin xác định đặc tính đối với kháng thể HER2 được sialyl hóa.

Hình 28 mô tả thông tin xác định đặc tính của kháng thể kháng-HER 2 được sialyl hóa bị oxy hoá.

Hình 29 mô tả các sắc ký tương tác kỵ nước của các liên hợp glyco được điều chế với ba kháng thể được sialyl hóa khác nhau với hai nhóm aminooxy khác nhau.

Hình 30 cho thấy sắc ký HIC của đột biến kháng-Her2 A114 glycosyl hóa liên hợp với AO-MMAE được điều chế bằng cách sử dụng hoá học GAM(+).

Hình 31 mô tả sự so sánh về hiệu lực in vitro của liên hợp glyco kháng-HER2 và liên hợp thiol.

Hình 32 mô tả sự so sánh về hiệu lực in vitro của liên hợp glyco kháng FAP B11 và liên hợp thiol.

Hình 33 mô tả sự so sánh hiệu lực in vivo của các liên hợp glyco kháng-HER2 và các liên hợp thiol ở mẫu ghép ngoại lai tế bào khối u HER2+.

Hình 34 mô tả các kết quả của các thử nghiệm LC-MS để xác định hàm lượng polysaccharit của kháng thể đột biến kháng- $\alpha\beta$ TCR có chứa đột biến S298N/Y300S.

Hình 35 mô tả các kết quả của các thử nghiệm lưỡng sắc tuần hoàn để xác định sự ổn định nhiệt tương đối của kháng thể kháng- $\alpha\beta$ TCR dạng tự nhiên và kháng thể đột biến kháng- $\alpha\beta$ TCR chứa đột biến S298N/Y300S.

Hình 36 mô tả các kết quả của thử nghiệm tăng sinh tế bào đối với ADC được điều chế với kháng thể kháng-HER mang đột biến A114N hyperglycosyl hóa và AO-MMAE.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Sáng chế đề xuất các polypeptit liên kết (ví dụ, các kháng thể), và các liên hợp thuốc của chúng, bao gồm miền Fc, trong đó miền Fc bao gồm: gốc asparagin ở vị trí axit amin 298, theo cách đánh số của EU; và gốc serin hoặc threonin ở vị trí axit amin 300, theo cách đánh số của EU. Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic mã hóa các polypeptit liên kết kháng nguyên, các vector biểu hiện tái tổ hợp và các tế bào chủ để tạo ra các polypeptit liên kết kháng nguyên như vậy. Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp sử dụng các polypeptit liên kết kháng nguyên theo sáng chế để điều trị bệnh.

#### **I. Định nghĩa**

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polypeptit liên kết" sẽ đề cập đến polypeptit (ví dụ, kháng thể) có chứa ít nhất một vị trí liên kết chịu trách nhiệm về liên kết có chọn lọc với kháng nguyên mục tiêu được quan tâm (ví dụ như kháng nguyên ở người). Các vị trí liên kết điển hình bao gồm miền biến đổi của kháng thể, vị trí liên kết phối tử của thụ thể, hoặc vị trí liên kết

thụ thể của một phối tử. Theo một số khía cạnh nhất định, các polypeptit liên kết theo sáng chế bao gồm nhiều (ví dụ, hai, ba, bốn, hoặc nhiều hơn) các vị trí liên kết.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gốc tự nhiên" sẽ đề cập đến gốc axit amin xuất hiện tự nhiên ở vị trí axit amin cụ thể của polypeptit liên kết (ví dụ, kháng thể hoặc đoạn kháng thể) và gốc axit amin này không bị sửa đổi, đưa vào, hay biến đổi do tác động của con người. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polypeptit liên kết bị biến đổi" bao gồm các polypeptit liên kết (ví dụ, kháng thể hoặc đoạn kháng thể) bao gồm ít nhất một gốc axit amin đột biến phi tự nhiên.

Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" như được sử dụng trong tài liệu này, đề cập đến khả năng của kháng thể hoặc đoạn kháng thể liên kết kháng nguyên để liên kết với kháng nguyên với hằng số phân ly ( $K_d$ ) lớn nhất khoảng  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-10}$  M,  $1 \times 10^{-11}$  M,  $1 \times 10^{-12}$  M, hoặc thấp hơn, và/hoặc để liên kết với kháng nguyên với ái lực lớn hơn ít nhất hai lần ái lực của nó đối với một kháng nguyên không đặc hiệu.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" đề cập đến các nhóm (ví dụ, các phân tử kháng thể còn nguyên vẹn, các đoạn kháng thể, hoặc các biến thể của nó) có hoạt tính phản ứng miễn dịch đặc hiệu đáng kể được biết đến đối với kháng nguyên được quan tâm (ví dụ như kháng nguyên có liên quan đến khối u). Các kháng thể và các globulin miễn dịch bao gồm các chuỗi nhẹ và nặng, có hoặc không có liên kết cộng hóa trị liên chuỗi giữa chúng. Các cấu trúc globulin miễn dịch cơ bản ở động vật có xương sống được hiểu tương đối rõ.

Như sẽ được thảo luận chi tiết hơn dưới đây, thuật ngữ chung "kháng thể" bao gồm năm loại kháng thể riêng biệt có thể được phân biệt theo sinh hóa. Tất cả năm loại kháng thể rõ ràng là trong phạm vi của sáng chế, việc thảo luận sau đây nói chung sẽ hướng đến loại IgG của các phân tử globulin miễn dịch. Đối với IgG, globulin miễn dịch gồm hai chuỗi nhẹ tương đồng có

trọng lượng phân tử khoảng 23000 Dalton, và hai chuỗi nặng tương đồng có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 53000 đến 70000 Dalton. Bốn chuỗi này được nối kết bằng liên kết disulfua theo hình dạng "Y" trong đó các chuỗi nhẹ nối kết với các chuỗi nặng bắt đầu từ miệng của "Y" và tiếp tục qua vùng biến đổi.

Các chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch được phân loại hoặc là kappa hoặc là lambda ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Mỗi lớp chuỗi nặng có thể được liên kết với hoặc là chuỗi nhẹ kappa hoặc chuỗi nhẹ lambda. Nói chung, các chuỗi nhẹ và nặng được liên kết cộng hóa trị với nhau, và các phần "đuôi" của hai chuỗi nặng được liên kết với nhau bằng các liên kết cộng hóa trị disulfua hoặc các liên kết không cộng hóa trị khi các globulin miễn dịch được tạo ra hoặc bằng các tế bào lai, các tế bào B, hoặc bằng các tế bào chủ biến đổi gen. Trong chuỗi nặng, các trình tự axit amin chạy từ đầu N ở các điểm kết thúc ở ngã ba của hình dạng Y đến điểm cuối C ở cuối mỗi chuỗi. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đánh giá cao rằng các chuỗi nặng được phân loại là gamma, mu, alpha, delta, hoặc epsilon; ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) với một số phân lớp trong chúng (ví dụ,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Bản chất của chuỗi này là xác định "lớp" của các kháng thể tương ứng là IgG, IgM, IgA, IgG, hoặc IgE. Các phân lớp kháng thể globulin miễn dịch (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, v.v.) được mô tả rõ và được biết đến là để mang lại sự chuyên môn hóa chức năng. Các phiên bản sửa đổi của mỗi trong số các lớp và các kháng thể này là dễ dàng nhận thấy được đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật vì lý do công bố ngay lập tức và, vì vậy, nằm trong phạm vi của sáng chế.

Cả chuỗi nặng và nhẹ được chia thành các vùng tương đồng về cấu trúc và chức năng. Thuật ngữ "vùng" đề cập đến một phần hoặc một đoạn của chuỗi globulin miễn dịch hoặc chuỗi kháng thể và bao gồm vùng không đổi hoặc các vùng biến đổi, cũng như các phần hoặc các đoạn rời rạc hơn của các vùng nêu trên. Ví dụ, các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm "các vùng xác

định bổ sung" hay "CDRs" xen kẽ giữa "các vùng khung" hay "FRs", như được định nghĩa ở đây.

Các vùng của chuỗi nặng hoặc nhẹ của globulin miễn dịch có thể được định nghĩa là vùng "không đổi" (C) hoặc các vùng "biến đổi" (V), dựa trên sự thiếu hụt tương đối của biến đổi trình tự trong các vùng của các thành viên lớp khác nhau trong trường hợp của "vùng không đổi", hoặc sự biến đổi đáng kể trong các vùng của các thành viên lớp khác nhau trong trường hợp của "các vùng biến đổi". Các thuật ngữ "vùng không đổi" và "vùng biến đổi" cũng có thể được sử dụng theo chức năng. Về vấn đề này, nó sẽ được đánh giá cao rằng các vùng biến đổi của globulin miễn dịch hoặc kháng thể xác định việc nhận diện kháng nguyên và tính đặc hiệu. Ngược lại, các vùng không đổi của globulin miễn dịch hoặc kháng thể mang lại các chức năng phản ứng lại kích thích quan trọng như sự bài tiết, tính lưu động qua nhau thai, liên kết thụ thể Fc, liên kết bổ sung, và tương tự. Các cấu trúc tiểu đơn vị và các cấu hình ba chiều của các vùng không đổi của các lớp globulin miễn dịch khác nhau được biết đến rộng rãi.

Các vùng không đổi và biến đổi của các chuỗi nặng và nhẹ của globulin miễn dịch được xếp vào các miền. Thuật ngữ "miền" dùng để chỉ vùng hình cầu của chuỗi nặng hoặc nhẹ bao gồm các vòng peptit (ví dụ, bao gồm 3 đến 4 vòng peptit) được ổn định, ví dụ, bằng tám  $\beta$ -pleated và/hoặc liên kết disulfua trong chuỗi. Các miền vùng không đổi trên chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch được gọi thay thế cho nhau là "các miền vùng không đổi của chuỗi nhẹ", "các vùng CL" hoặc "các miền CL". Các miền không đổi trên chuỗi nặng (ví dụ như các miền bản lề, CH1, CH2 hoặc CH3) được gọi thay thế cho nhau là "các miền vùng không đổi của chuỗi nặng", các miền vùng "CH" hoặc "các miền CH". Các miền biến đổi trên chuỗi nhẹ được gọi thay thế cho nhau là "các miền vùng biến đổi của chuỗi nhẹ", các miền vùng "VL" hoặc "các miền VL". Các miền biến đổi trên chuỗi nặng được gọi thay thế cho nhau là



"các miền vùng biến đổi của chuỗi nặng", các miền vùng "VH" hoặc "các miền VH".

Theo quy ước đánh số của các miền vùng không đổi, biến đổi tăng khi chúng trở nên xa hơn từ vị trí liên kết kháng nguyên hoặc kết thúc amin của globulin miễn dịch hoặc kháng thể. N- kết thúc của mỗi chuỗi globulin miễn dịch nặng và nhẹ là vùng biến đổi và tại C- kết thúc là vùng không đổi; các miền CH3 và CL trên thực tế bao gồm kết thúc cacboxyl của chuỗi nặng và nhẹ, tương ứng. Theo đó, các miền của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch được sắp xếp theo hướng VL-CL, trong khi các miền của chuỗi nặng được sắp xếp theo hướng VH-CH1-bản lề-CH2-CH3.

Các vị trí axit amin trong vùng không đổi chuỗi nặng, bao gồm cả vị trí axit amin trong các miền CH1, bản lề, CH2, CH3, và CL, có thể được đánh số theo hệ thống đánh số theo chỉ số Kabat (xem tài liệu Kabat et al, đoạn "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, ấn bản thứ 5, 1991). Ngoài ra, vị trí axit amin kháng thể có thể được đánh số theo hệ thống đánh số theo chỉ số EU (xem tài liệu Kabat et al, cùng đoạn đó).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "miền VH" bao gồm miền biến đổi kết thúc amin của chuỗi nặng globulin miễn dịch, và thuật ngữ "miền VL" bao gồm miền biến đổi kết thúc amin của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "miền CH1" bao gồm miền vùng không đổi (hầu hết kết thúc amin) thứ nhất của chuỗi nặng globulin miễn dịch kéo dài, ví dụ, từ các vị trí khoảng 114 đến 223 trong hệ thống đánh số Kabat (các vị trí từ 118 đến 215 trong hệ thống đánh số EU). Miền CH1 tiếp giáp với miền VH và kết thúc amin tiếp giáp với vùng bản lề của phân tử chuỗi nặng globulin miễn dịch, và không tạo thành một phần của miền Fc của chuỗi nặng globulin miễn dịch.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vùng bản lề" bao gồm một phần của phân tử chuỗi nặng ghép miền CH1 với miền CH2. Vùng bản lề này bao

gồm khoảng 25 gốc và rất linh hoạt, vì thế cho phép hai vùng liên kết kháng nguyên N- cuối di chuyển một cách độc lập. Các vùng bản lề có thể được chia thành ba miền khác nhau: các miền trên, giữa, và bản lề ở dưới (Roux et al. J. Immunol. 1998, 161: 4083).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "miền CH2" bao gồm một phần của phân tử globulin miễn dịch chuỗi nặng kéo dài, ví dụ, từ các vị trí khoảng 244 đến 360 trong hệ thống đánh số Kabat (các vị trí 231 đến 340 trong hệ thống đánh số EU). Miền CH2 độc đáo ở chỗ nó không kết nối chặt chẽ với miền khác. Thay vào đó, hai chuỗi cacbohydrat phân nhánh liên kết ở nguyên tử N được đặt giữa hai miền CH2 của phân tử IgG gốc còn nguyên vẹn. Polypeptit liên kết theo sáng chế bao gồm miền CH2 có nguồn gốc từ phân tử IgG1 (ví dụ như phân tử IgG1 ở người).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "miền CH3" bao gồm một phần của phân tử globulin miễn dịch chuỗi nặng kéo dài khoảng 110 gốc từ N- kết thúc của miền CH2, ví dụ, từ khoảng các vị trí 361 đến 476 của hệ thống đánh số Kabat (các vị trí 341 đến 445 của hệ thống đánh số EU). Miền CH3 thường tạo thành một phần điểm cuối C của kháng thể. Tuy nhiên, ở một số globulin miễn dịch, các miền bổ sung có thể kéo dài từ miền CH3 để tạo thành một phần điểm cuối C của phân tử (ví dụ như miền CH4 trong chuỗi  $\mu$  của IgM và chuỗi  $\epsilon$  của IgE). Polypeptit liên kết theo sáng chế bao gồm miền CH3 có nguồn gốc từ phân tử IgG1 (ví dụ như phân tử IgG1 ở người).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "miền CL" bao gồm miền vùng không đổi của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch kéo dài, ví dụ như từ khoảng vị trí 107A-216 của hệ thống đánh số Kabat. Miền CL tiếp giáp với miền VL. Theo một phương án, polypeptit liên kết theo sáng chế bao gồm miền CL bắt nguồn từ chuỗi nhẹ kappa (ví dụ, chuỗi nhẹ kappa ở người).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "miền Fc" được định nghĩa là một phần của vùng không đổi chuỗi nặng bắt đầu ở vùng bản lề ngay phía trên của vị trí phân tách papain (tức là gốc 216 trong IgG, lấy gốc đầu tiên của vùng

không đổi chuỗi nặng là 114) và kết thúc tại C- kết thúc của kháng thể. Do đó, miền Fc hoàn chỉnh bao gồm ít nhất miền bản lề, miền CH2, và miền CH3.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "Fc tự nhiên" đề cập đến phân tử gồm trình tự của đoạn không liên kết kháng nguyên do sự tiêu hóa của kháng thể hoặc được tạo ra bằng các phương pháp khác, dù ở dạng đơn thể hoặc đa thể, và có thể chứa vùng bản lề. Nguồn gốc của globulin miễn dịch ban đầu của Fc tự nhiên tốt hơn là có nguồn gốc ở người và có thể là bất kỳ globulin miễn dịch nào, mặc dù IgG1 và IgG2 được ưu tiên. Các phân tử Fc tự nhiên được tạo thành từ các polypeptit đơn thể có thể được liên kết thành các dạng nhị thể hoặc đa thể bằng liên kết cộng hóa trị (tức là, các liên kết disulfua) và không cộng hóa trị. Số lượng các liên kết disulfua liên phân tử giữa các tiểu đơn vị đơn thể của các phân tử Fc tự nhiên nằm trong khoảng từ 1 đến 4 tùy thuộc vào lớp (ví dụ, IgG, IgA, và IgE) hoặc phân lớp (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, và IgGA2). Một ví dụ về Fc tự nhiên là một nhị thể được liên kết disulfua do sự tiêu hóa papain của IgG. Thuật ngữ "Fc tự nhiên" như được sử dụng ở đây là chung cho các dạng đơn thể, nhị thể, và đa thể.

Thuật ngữ "biến thể Fc" như được sử dụng ở đây đề cập đến phân tử hoặc trình tự được biến đổi từ Fc tự nhiên nhưng vẫn bao gồm vị trí liên kết với thụ thể salvage, FcRn (thụ thể Fc mới sinh). Các biến thể Fc điển hình, và sự tương tác của chúng với thụ thể salvage, được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Như vậy, thuật ngữ "biến thể Fc" có thể bao gồm phân tử hoặc trình tự được nhân bản từ Fc tự nhiên không phải ở người. Hơn nữa, Fc tự nhiên bao gồm các vùng có thể được loại bỏ vì chúng mang lại các đặc tính cấu trúc hoặc hoạt tính sinh học mà không cần thiết cho các polypeptit liên kết giống kháng thể theo sáng chế. Như vậy, thuật ngữ "biến thể Fc" bao gồm phân tử hoặc trình tự thiếu một hoặc nhiều vị trí Fc tự nhiên hoặc gốc, hoặc trong đó một hoặc nhiều vị trí Fc hoặc gốc đã được biến đổi, mà có ảnh hưởng hoặc có liên quan đến: (1) sự tạo thành liên kết disulfua, (2) sự không tương thích với

tế bào chủ được lựa chọn, (3) sự không đồng nhất điểm cuối N khi biểu hiện trong tế bào chủ được lựa chọn, (4) sự glycosyl hóa, (5) sự tương tác với phân bổ sung, (6) liên kết với thụ thể Fc khác ngoài thụ thể salvage, hoặc (7) độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

Thuật ngữ "miền Fc" như được sử dụng ở đây bao gồm Fc tự nhiên và các biến thể Fc và các trình tự như được định nghĩa ở trên. Như với các biến thể Fc và các phân tử Fc tự nhiên, thuật ngữ "miền Fc" bao gồm các phân tử ở dạng đơn thể hoặc đa thể, dù được tiêu hóa từ toàn bộ kháng thể hay được tạo ra bằng các phương pháp khác.

Như đã nêu ở trên, các vùng biến đổi của kháng thể cho phép nó nhận biết có chọn lọc và liên kết đặc hiệu các epitop trên các kháng nguyên. Đó là, miền VL và miền VH của kháng thể kết hợp để tạo thành vùng biến đổi (Fv) xác định vị trí liên kết kháng nguyên ba chiều. Cấu trúc kháng thể bậc bốn này tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên có mặt ở phần cuối mỗi nhánh của Y. Cụ thể hơn, vị trí liên kết kháng nguyên được xác định bởi ba vùng xác định bổ sung (CDR) trên mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vị trí liên kết kháng nguyên" bao gồm vị trí mà liên kết đặc hiệu (phản ứng miễn dịch với) kháng nguyên (ví dụ, bề mặt tế bào hoặc kháng nguyên có thể hòa tan). Vị trí liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch và vị trí liên kết được tạo thành bởi các vùng biến đổi này xác định tính đặc hiệu của kháng thể. Vị trí liên kết kháng nguyên được tạo thành bởi các vùng biến đổi mà thay đổi từ kháng thể sang kháng thể khác. Các kháng thể được thay đổi theo sáng chế bao gồm ít nhất một vị trí liên kết kháng nguyên.

Theo các phương án nhất định, các polypeptit liên kết theo sáng chế bao gồm ít nhất hai miền liên kết kháng nguyên mang lại sự liên kết kết hợp của polypeptit liên kết với kháng nguyên được lựa chọn. Các miền liên kết kháng nguyên không cần phải có nguồn gốc từ cùng một phân tử globulin miễn dịch. Về vấn đề này, vùng biến đổi có thể hoặc có nguồn gốc từ loại

động vật bất kỳ mà có thể được gây ra để gắn kết phản ứng miễn dịch dịch thể và tạo ra các globulin miễn dịch chống lại kháng nguyên mong muốn. Như vậy, vùng biến đổi của polypeptit liên kết có thể là, ví dụ, có nguồn gốc từ động vật có vú ví dụ, có thể là ở người, thuộc họ chuột, chuột, dê, cừu, linh trưởng không phải người (như khỉ cynomolgus, khỉ macaques, v.v.), chó sói, hoặc họ lạc đà (ví dụ, từ lạc đà, lạc đà không bướu và các loài có liên quan).

Ở các kháng thể xuất hiện tự nhiên, sáu CDR có mặt trên mỗi kháng thể đơn thể là các trình tự ngắn, không tiếp giáp của các axit amin được định vị cụ thể để tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên khi các kháng thể giả định hình dạng ba chiều của nó trong môi trường nước. Phần còn lại của các miền biến đổi nặng và nhẹ cho thấy sự biến đổi liên phân tử ít hơn trong trình tự axit amin và được gọi là các vùng khung. Các vùng khung phần lớn chấp nhận cấu trúc tấm  $\beta$ - và các CDR tạo thành các vòng kết nối, và trong một số trường hợp tạo thành một phần của cấu trúc tấm  $\beta$ -. Vì thế, các vùng khung này đóng vai trò để tạo thành giá đỡ mang lại sự định vị sáu CDR đúng hướng bằng các tương tác liên chuỗi, không cộng hóa trị. Miền liên kết kháng nguyên được tạo thành bởi các CDR được định vị xác định sự bổ sung bề mặt đối với epitop trên kháng nguyên phản ứng miễn dịch. Bề mặt bổ sung này thúc đẩy liên kết không cộng hóa trị của kháng thể với epitop kháng nguyên phản ứng miễn dịch.

Các polypeptit liên kết điển hình theo sáng chế bao gồm các biến thể kháng thể. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "biến thể kháng thể" bao gồm các dạng tổng hợp và được thiết kế của các kháng thể được biến đổi như vậy để chúng không xuất hiện tự nhiên, ví dụ như, các kháng thể bao gồm ít nhất hai phần chuỗi nặng nhưng không phải là hai chuỗi nặng hoàn chỉnh (chẳng hạn như, các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể đã xóa bỏ miền); các dạng đa đặc hiệu của các kháng thể (ví dụ, đặc hiệu hai, đặc hiệu ba) được biến đổi để liên kết với hai hoặc nhiều kháng nguyên khác nhau hoặc với các epitop khác nhau trên một kháng nguyên); các phân tử chuỗi nặng liên kết với các phân tử

scFv và tương tự. Ngoài ra, thuật ngữ "biến thể kháng thể" bao gồm các dạng đa hoá trị của các kháng thể (ví dụ như, hóa trị ba, hóa trị bốn, v.v, các kháng thể liên kết với ba, bốn hoặc nhiều bản sao của cùng một kháng nguyên.)

Như được sử dụng ở đây thuật ngữ "hóa trị" đề cập đến số lượng các vị trí liên kết mục tiêu tiềm năng trong polypeptit. Mỗi vị trí liên kết mục tiêu liên kết đặc hiệu với một phân tử mục tiêu hoặc vị trí đặc hiệu trên phân tử mục tiêu. Khi polypeptit bao gồm nhiều hơn một vị trí liên kết mục tiêu, mỗi vị trí liên kết mục tiêu có thể liên kết đặc hiệu với các phân tử giống nhau hoặc khác nhau (ví dụ, có thể liên kết với các phối tử khác nhau hoặc các kháng nguyên khác nhau, hoặc các epitop khác nhau trên cùng một kháng nguyên). Tốt hơn là, các polypeptit liên kết mục tiêu có ít nhất một vị trí liên kết đặc hiệu đối với một phân tử kháng nguyên ở người.

Thuật ngữ "đặc hiệu" đề cập đến khả năng liên kết đặc hiệu (ví dụ, phản ứng miễn dịch với) kháng nguyên mục tiêu xác định (ví dụ, kháng nguyên mục tiêu ở người). Polypeptit liên kết có thể là đặc hiệu một và chứa một hoặc nhiều vị trí liên kết mà liên kết đặc hiệu mục tiêu hoặc polypeptit có thể là đa đặc hiệu và chứa hai hoặc nhiều vị trí liên kết mà liên kết đặc hiệu các mục tiêu giống nhau hoặc khác nhau. Theo các phương án nhất định, polypeptit liên kết theo sáng chế là đặc hiệu đối với hai phần khác nhau (ví dụ, không trùng lặp) của cùng một mục tiêu. Theo các phương án nhất định, polypeptit liên kết theo sáng chế là đặc hiệu đối với nhiều hơn một mục tiêu. Các polypeptit liên kết điển hình (ví dụ, các kháng thể) bao gồm các vị trí liên kết kháng nguyên liên kết với các kháng nguyên biểu hiện trên các tế bào khối u được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và một hoặc nhiều CDR từ các kháng thể như vậy có thể được bao gồm trong kháng thể theo sáng chế.

Thuật ngữ "nhóm chức liên kết" bao gồm các nhóm chức có khả năng liên kết nhóm chức phản ứng lại kích thích với các polypeptit liên kết được bộc lộ ở đây. Nhóm chức liên kết này có thể được lựa chọn là nhóm chức có thể tách ra được (ví dụ, các enzym có thể tách ra được hoặc nhạy với pH)

hoặc không tách ra được. Các nhóm chức liên kết điển hình được nêu trong Bảng 2 dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "nhóm chức phản ứng lại kích thích" bao gồm các tác nhân chẩn đoán và điều trị (như các protein, các axit nucleic, các lipid, các nhóm chức thuốc, và các đoạn của chúng) với hoạt tính sinh học hoặc chức năng khác. Ví dụ, polypeptit liên kết biến đổi bao gồm nhóm chức phản ứng lại kích thích liên hợp với polypeptit liên kết có ít nhất một chức năng hoặc đặc tính bổ sung so với các kháng thể không được liên hợp. Ví dụ, sự liên hợp của thuốc gây độc tế bào (ví dụ, một nhóm chức phản ứng lại kích thích) với polypeptit liên kết dẫn đến sự tạo thành polypeptit liên kết với độc tính tế bào của thuốc là chức năng thứ hai (tức là thêm vào liên kết kháng nguyên). Trong một ví dụ khác, sự liên hợp của polypeptit liên kết thứ hai với polypeptit liên kết có thể mang lại các đặc tính liên kết bổ sung. Theo các phương án nhất định, ở đó nhóm chức phản ứng lại kích thích là protein hoặc axit nucleic điều trị hoặc chẩn đoán được mã hóa gen, nhóm chức phản ứng lại kích thích này có thể được tổng hợp hoặc biểu hiện hoặc bằng phương pháp tổng hợp peptit hoặc bằng phương pháp ADN tái tổ hợp được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo một khía cạnh khác, ở đó phản ứng lại kích thích là peptit không được mã hoá gen, hoặc nhóm chức thuốc, nhóm chức phản ứng lại kích thích có thể được tổng hợp nhân tạo hoặc tinh chế từ nguồn tự nhiên. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "nhóm chức thuốc" bao gồm các tác nhân điều trị kháng viêm, chống ung thư, chống nhiễm trùng (ví dụ, kháng nấm, kháng khuẩn, chống ký sinh trùng, chống virus, và gây mê. Theo phương án tiếp tục, nhóm chức thuốc là tác nhân chống ung thư hoặc gây độc tế bào. Các nhóm chức thuốc tương hợp cũng có thể bao gồm các tiền thuốc. Các nhóm chức phản ứng lại kích thích điển hình được nêu trong Bảng 1 dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tiền thuốc" đề cập đến tiền chất hoặc dạng dẫn xuất của tác nhân hoạt tính được ít hoạt tính hơn, ít phản ứng

hơn hoặc ít bị các tác dụng phụ hơn so với thuốc gốc và có thể được hoạt hoá enzym hoặc được chuyển đổi thành dạng hoạt tính hơn in vivo. Các tiền thuốc tương hợp với các chế phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn với, các tiền thuốc chứa phosphat, các tiền thuốc chứa axit amin, các tiền thuốc chứa thiophosphat, các tiền thuốc chứa sulfat, các tiền thuốc chứa peptit, các tiền thuốc chứa  $\beta$ -lactam, tùy ý các tiền thuốc chứa phenoxyaxetamit được thế hoặc tùy ý các tiền thuốc phenylaxetamit được thế, các tiền thuốc 5-fluorocytosin và 5-fluorouridin mà có thể được chuyển đổi thành thuốc không gây độc tế bào có hoạt tính nhiều hơn. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật có thể tạo ra các biến đổi hóa học với nhóm chức thuốc mong muốn hoặc tiền thuốc của nó để tạo ra các phản ứng của hợp chất thuận lợi hơn cho các mục đích điều chế các polypeptit liên kết được biến đổi theo sáng chế. Các nhóm chức thuốc này cũng bao gồm các dẫn xuất, các muối được dụng, các este, các amit và các ete của các nhóm chức thuốc được mô tả trong tài liệu này. Các dẫn xuất bao gồm các sự biến đổi thành các loại thuốc được xác định ở đây mà có thể cải thiện hoặc làm giảm không đáng kể hoạt tính điều trị mong muốn của loại thuốc cụ thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tác nhân chống ung thư" bao gồm các tác nhân gây bất lợi cho sự phát triển và/hoặc sự tăng sinh của các tế bào ung thư hoặc khối u và có thể đóng vai trò làm giảm, ức chế hoặc tiêu diệt khối u ác tính. Các ví dụ về các tác nhân như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn với, các tác nhân kìm hãm tế bào, các tác nhân alkyl hóa, thuốc kháng sinh, nucleosit gây độc tế bào, các tác nhân liên kết tubulin, hoocmon, thuốc đối kháng hoocmon, các tác nhân gây độc tế bào, và các tác nhân tương tự. Các tác nhân gây độc tế bào bao gồm các dẫn xuất tomaymyxin, các dẫn xuất maytansin, các dẫn xuất cryptophyxin, các dẫn xuất antraxyclin, các dẫn xuất bisphosphonat, các dẫn xuất leptomyxin, các dẫn xuất streptonigrin, các dẫn xuất auristatin, và các dẫn xuất duocarmyxin. Bất kỳ tác nhân nào đóng vai



trò trì hoãn hoặc làm chậm sự tăng trưởng của các tế bào phản ứng miễn dịch hoặc các tế bào ác tính nằm trong phạm vi của sáng chế.

Thuật ngữ "kháng nguyên" hay "kháng nguyên mục tiêu" như được sử dụng ở đây đề cập đến phân tử hoặc một phần của phân tử có khả năng được liên kết bởi vị trí liên kết của polypeptit liên kết. Kháng nguyên mục tiêu có thể có một hoặc nhiều epitop.

## II. Các polypeptit liên kết

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các polypeptit liên kết (ví dụ, các kháng thể, các đoạn kháng thể, các biến thể kháng thể, và các protein hợp nhất) bao gồm miền Fc, trong đó miền Fc này bao gồm: gốc asparagin ở vị trí axit amin 298, theo cách đánh số của EU; và gốc serin hoặc threonin ở vị trí axit amin 300, theo cách đánh số của EU.

Các miền Fc từ lớp globulin miễn dịch bất kỳ (ví dụ: IgM, IgG, IgD, IgA và IgE) và các loại có thể được sử dụng trong các polypeptit liên kết được bộc lộ ở đây. Các miền Fc khả năng bao gồm các phần của các miền Fc từ các loại khác nhau hoặc các lớp Ig cũng có thể được sử dụng. Miền Fc là miền Fc của IgG1 ở người. Trong trường hợp của miền Fc của IgG1 ở người, đột biến của axit amin tự nhiên tại vị trí 298 Kabat đến asparagin và vị trí 300 Kabat đến một serin hoặc threonin dẫn đến sự tạo thành vị trí liên ứng glycosyl hóa liên kết ở vị trí nguyên tử N (tức là, sequon N-X-T/S, trong đó X là axit amin bất kỳ trừ prolin). Tuy nhiên, trong trường hợp các miền Fc của các loại khác và/hoặc các lớp Ig hoặc các isotyp, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ đánh giá rằng nó có thể là cần thiết để biến đổi vị trí 299 Kabat của miền Fc này nếu gốc prolin có mặt để tái tạo sequon N-X-T/S.

Các polypeptit liên kết được bộc lộ ở đây bao gồm polypeptit liên kết bất kỳ mà bao gồm miền Fc có vị trí glycosyl hóa liên kết ở vị trí nguyên tử N tại vị trí 298, theo cách đánh số Kabat. Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit liên kết là kháng thể, hoặc đoạn hoặc dẫn xuất của nó. Bất kỳ

kháng thể từ bất kỳ nguồn hoặc các loại có thể được sử dụng trong các polypeptit liên kết được bộc lộ ở đây. Các kháng thể phù hợp bao gồm không giới hạn, các kháng thể ở người, các kháng thể được nhân hóa hoặc các kháng thể khảm.

Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit liên kết theo sáng chế có thể bao gồm đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể. Thuật ngữ "đoạn liên kết kháng nguyên" đề cập đến đoạn polypeptit của globulin miễn dịch hoặc kháng thể mà liên kết kháng nguyên hoặc cạnh tranh với kháng thể còn nguyên vẹn (ví dụ, với kháng thể còn nguyên vẹn mà chúng có nguồn gốc) đối với kháng nguyên liên kết (tức là, liên kết đặc hiệu). Các đoạn liên kết kháng nguyên có thể được sản xuất bằng phương pháp tái tổ hợp hoặc sinh hóa được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật. Các đoạn liên kết kháng nguyên điển hình bao gồm Fv, Fab, Fab', và (Fab')<sub>2</sub>. Theo các khía cạnh được ưu tiên, đoạn liên kết kháng nguyên theo sáng chế là đoạn liên kết kháng nguyên thay đổi bao gồm ít nhất một vị trí glycosyl hóa được thiết kế. Theo một khía cạnh điển hình, đoạn liên kết kháng nguyên thay đổi theo sáng chế bao gồm miền VH thay đổi được mô tả ở trên. Theo khía cạnh điển hình khác, đoạn liên kết kháng nguyên thay đổi theo sáng chế bao gồm miền CH1 thay đổi được mô tả ở trên.

Theo các phương án điển hình, polypeptit liên kết bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi đơn (ScFv). Trình tự vùng biến đổi chuỗi đơn bao gồm polypeptit đơn có một hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên, ví dụ, miền VL liên kết bởi mỗi liên kết linh hoạt với miền VH. Các phân tử ScFv có thể được cấu tạo theo hướng VH-liên kết-VL hoặc hướng VL-liên kết-VH. Bản lề linh hoạt liên kết các miền VL và VH mà tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên tốt hơn là chứa từ khoảng 10 đến 50 gốc axit amin. Các peptit liên kết Kpeptit được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Polypeptit liên kết theo sáng chế có thể bao gồm ít nhất một scFv và/hoặc ít nhất một vùng không đổi. Theo một phương án, polypeptit liên kết theo sáng chế có thể bao gồm ít nhất

một scFv liên kết hoặc hợp nhất với kháng thể hoặc đoạn gồm miền CH1 (ví dụ như miền CH1 gồm gốc asparagin tại vị trí 114 Kabat) và/hoặc miền CH2 (ví dụ như miền CH2 gồm gốc asparagin ở vị trí 298 EU, và gốc serin hoặc threonin ở vị trí 300 EU).

Theo các phương án điển hình nhất định, polypeptit liên kết theo sáng chế là kháng thể đa hóa trị (ví dụ, hóa trị bốn) được tạo ra bằng cách hợp nhất trình tự ADN mã hóa kháng thể với phân tử ScFv (ví dụ, phân tử ScFv đã biến đổi). Ví dụ, theo một phương án, các trình tự này được kết hợp như vậy mà phân tử ScFv (ví dụ, phân tử ScFv đã biến đổi) được liên kết tại N- kết thúc hoặc C- kết thúc của nó với đoạn Fc của kháng thể thông qua mối liên kết linh hoạt (ví dụ, liên kết gly/ser). Theo phương án khác, kháng thể hóa trị bốn theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách hợp nhất phân tử ScFv với peptit liên kết, mà được hợp nhất với miền CH1 (ví dụ như, miền CH1 gồm gốc asparagin tại vị trí 114 Kabat) để tạo thành phân tử hóa trị bốn ScFv-Fab.

Theo phương án khác, polypeptit liên kết theo sáng chế là đoạn kháng thể đoạn kháng thể đã biến đổi. Các đoạn kháng thể đoạn kháng thể đã biến đổi theo sáng chế là các phân tử đối xứng hai bên tạo thành từ hai chuỗi polypeptit mỗi chuỗi bao gồm phân tử ScFv (ví dụ, một phân tử ScFv bị biến đổi bao gồm miền VH bị biến đổi được mô tả ở trên) mà được hợp nhất với miền CH3 hoặc một phần của nó qua peptit liên kết. Các đoạn kháng thể có thể được tạo ra bằng cách thiết kế thành phần ScFv và thành phần peptit liên kết-CH3 bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ, US patent 5.837.821 hoặc WO 94/09817A1). Theo phương án khác, đoạn kháng thể hóa trị bốn có thể được thiết kế. Các đoạn kháng thể hóa trị bốn có thể được thiết kế theo cách thức giống như các đoạn kháng thể, ngoại trừ hai phân tử ScFv được liên kết bằng cách sử dụng mối liên kết linh hoạt. Thiết kế scFv-SCF được liên kết sau đó được liên kết với miền CH3.

Theo một phương án khác, polypeptit liên kết theo sáng chế bao gồm diabody. Các diabody là các phân tử đối xứng hai bên, hóa trị bốn mỗi phân

tử có polypeptit tương tự với các phân tử scFv, nhưng thường có gốc axit amin ngắn (ít hơn 10 và tốt hơn là từ 1 đến 5) liên kết nối cả hai miền biến đổi, như vậy các miền VL và VH trên cùng chuỗi polypeptit không thể tương tác. Thay vào đó, miền VL và VH của một chuỗi polypeptit tương tác với miền VH và VL (tương ứng) trên chuỗi polypeptit thứ hai (xem, ví dụ, WO 02/02781). Các diabody theo sáng chế bao gồm phân tử scFv hợp nhất với miền CH3.

Theo các phương án khác, các polypeptit liên kết theo sáng chế bao gồm các kháng thể đa đặc hiệu hoặc đa hóa trị bao gồm một hoặc nhiều vùng biến đổi liên tiếp trên cùng chuỗi polypeptit, ví dụ như, các polypeptit có miền biến đổi song song (TVD). Các polypeptit TVD điển hình bao gồm hình dạng "hai đầu" hoặc "Fv song song" được mô tả trong U.S. Patent No. 5989830. Ở hình dạng Fv song song, các miền biến đổi của hai kháng thể khác nhau được biểu hiện theo hướng song song trên hai chuỗi riêng biệt (một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ), trong đó một chuỗi polypeptit có hai lần VH liên tiếp cách nhau bởi mỗi liên kết peptit (VH1-liên kết-VH2) và chuỗi polypeptit khác bao gồm các miền VL bổ sung được liên kết liên tiếp bởi mỗi liên kết peptit (VL1-liên kết-VL2). Ở hình dạng hai đầu giao nhau, các miền biến đổi của hai kháng thể khác nhau được biểu hiện theo hướng song song trên hai chuỗi polypeptit riêng biệt (một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ), trong đó một chuỗi polypeptit có hai VH liên tiếp cách nhau bởi mỗi liên kết peptit (VH1-liên kết-VH2) và chuỗi polypeptit khác bao gồm các miền VL bổ sung được liên kết liên tiếp bởi mỗi liên kết peptit theo hướng đối diện (VL2-liên kết-VL1). Các biến thể kháng thể bổ sung dựa trên định dạng "FV kép" bao gồm kháng thể đặc hiệu hai IgG miền biến đổi kép (DVD-IgG) (xem U.S. Patent No. 7.612.181 và định dạng TBTI (xem US 2010/0226923 A1). Việc bổ sung các miền không đổi vào các chuỗi tương ứng của Fv kép (CH1-Fc vào chuỗi nặng và miền không đổi kappa hoặc lambda vào chuỗi nhẹ) dẫn đến các kháng thể đặc hiệu hai chức năng mà không cần bất kỳ các sự biến

đổi thêm nào (tức là, sự bổ sung các miền không đổi để tăng cường sự ổn định).

Theo phương án điển hình khác, polypeptit liên kết bao gồm kháng thể đặc hiệu hai IgG miền biến đổi kép giao nhau (CODV-IgG) dựa trên hình dạng "đầu đôi" (xem US 20120251541 A1). Các biến thể kháng thể CODV-IgG có một chuỗi polypeptit với các miền VL được liên kết liên tiếp với miền CL (VL1-L1-L2-VL2-CL) và chuỗi polypeptit thứ hai với các miền VH bổ sung được liên kết liên tiếp theo hướng đối diện với miền CH1 (VH2-L3-L4-VH1-CH1), nơi mà các chuỗi polypeptit tạo thành cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng giao nhau. Theo phương án nhất định, polypeptit thứ hai có thể được tiếp tục liên kết với miền Fc (VH2-L3-L4-VH1-CH1-Fc). Theo các phương án nhất định, mỗi liên kết L3 ít nhất bằng hai lần chiều dài của mỗi liên kết L1 và/hoặc mỗi liên kết L4 ít nhất bằng hai lần chiều dài của mỗi liên kết L2. Ví dụ, L1 và L2 có thể là các gốc có từ 1 đến 3 axit amin trong chiều dài, L3 có thể là các gốc có từ 2 đến 6 axit amin trong chiều dài, và L4 có thể là các gốc có từ 4 đến 7 axit amin trong chiều dài. Các ví dụ về các mỗi liên kết phù hợp bao gồm một gốc glyxin (Gly); peptit diglyxin (Gly-Gly); tripeptit (Gly-Gly-Gly); peptit với bốn gốc glyxin (Gly-Gly-Gly-Gly); peptit với năm gốc glyxin (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); peptit với sáu gốc glyxin (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); peptit với bảy gốc glyxin (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); peptit với tám gốc glyxin (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly). Các tổ hợp khác của các gốc axit amin có thể được sử dụng chẳng hạn như peptit Gly-Gly-Gly-Gly-Ser và peptit Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser.

Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit liên kết bao gồm phân tử bám dính miễn dịch bao gồm vùng liên kết không kháng thể (ví dụ, thụ thể, phối tử, hoặc phân tử kết dính tế bào) hợp nhất với một vùng không đổi kháng thể (xem ví dụ, Ashkenazi et al., *Methods*, 1995 8 (2), 104-115).

Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit liên kết bao gồm các miền giống globulin miễn dịch. các miền giống globulin miễn dịch thích hợp bao

gồm, nhưng không giới hạn, các miền fibronectin (xem, ví dụ, Koide et al. (2007), *Methods Mol. Biol* 352: 95-109, DARPin (xem, ví dụ, Stumpp et al. (2008) *Drug Discov. Today* 13 (15-16): 695-701), các miền Z của protein A (xem, Nygren et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2668-76, các Lipocalin (xem, ví dụ, Skerra et al. (2008) *FEBS J.* 275 (11): 2677-83, các Affilin (xem, ví dụ, Ebersbach et al. (1997) *J. Mol. Catal. B Enzy. Biol* 372 (1): 172-85, các Affitin (xem, ví dụ, Krehenbrink et al. (2008). *J. Mol. Biol* 383 (5): 1058-), các Avimer (xem, ví dụ, Silverman et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23 (12): 1556-61, các Fynomer, (xem, ví dụ, Grabulovski et al. (2007) *J Biol Chem* 282 (5): 3196-3204, và các peptit miền Kunitz (xem, ví dụ, Nixon et al. (2006) *Curr Drug Opin Discov Devel* 9 (2): 261-8).

### III. Các Polysacarit liên kết ở vị trí nguyên tử N

Miền Fc của các polypeptit liên kết được bộc lộ ở đây được glycosyl hóa ở arginin được thiết kế ở vị trí 298 (N298), theo cách đánh số của EU. Polysacarit liên kết ở vị trí nguyên tử N thường được liên kết qua liên kết  $\beta$ -glycosylamit với nhóm nitơ của chuỗi bên N298. Tuy nhiên, các liên kết khác được công nhận thuộc lĩnh vực kỹ thuật phù hợp cũng có thể được sử dụng.

Bất kỳ loại polysacarit liên kết ở vị trí nguyên tử N tự nhiên hoặc tổng hợp (tức là, không tự nhiên) có thể được liên kết với N114. Ví dụ, polysacarit có thể là polysacarit tự nhiên hoặc polysacarit được thiết kế có chứa các liên kết không tự nhiên. Theo các phương án nhất định, polysacarit bao gồm sacarit mà có thể bị oxy hóa (ví dụ, bằng cách xử lý periodat) để tạo ra nhóm thích hợp cho sự liên hợp với nhóm chức phản ứng lại kích thích (ví dụ, nhóm andehyt phản ứng). Các sacarit oxy hóa được thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn, galactoze và axit sialic (ví dụ, axit N-Axetylneuraminic). Theo các phương án nhất định, polysacarit là polysacarit có hai nhánh. Theo các phương án nhất định, polysacarit là glycoform của động vật có vú trong tự nhiên.

Glycosyl hóa có thể đạt được thông qua phương pháp bất kỳ được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo các phương án nhất định, glycosyl hóa được thực hiện bằng sự biểu hiện của các polypeptit liên kết trong các tế bào có khả năng glycosyl hóa liên kết ở vị trí nguyên tử N. Bất kỳ tế bào tự nhiên hoặc được thiết kế (ví dụ, nhân sơ hoặc nhân chuẩn) có thể được sử dụng. Nói chung, các tế bào động vật có vú được sử dụng để thực hiện glycosyl hóa. Các polysacarit liên kết ở vị trí nguyên tử N được tạo ra trong các tế bào động vật có vú thường được gọi là các N-glycan phức hợp (xem ví dụ, Drickamer K, Taylor ME (2006). *Introduction to Glycobiology*, 2nd ed.). Các N-glycan phức hợp này có cấu trúc với thường là từ 2 đến 6 nhánh bên ngoài với trình tự sialyllactosamin được liên kết với cấu trúc lõi bên trong  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . N-glycan phức hợp có ít nhất một nhánh, và tốt hơn là ít nhất hai nhánh, xen kẽ giữa các gốc GlcNAc và galactose (Gal) mà kết thúc trong các oligosacarit như, ví dụ: NeuNAc-; NeuAc  $\alpha 2,6$  GalNAc  $\alpha 1$ -; NeuAc  $\alpha 2,3$  Gal  $\beta 1,3$  GalNAc  $\alpha 1$ -; và NeuAc  $\alpha 2,3/6$  Gal  $\beta 1,4$  GlcNAc  $\beta 1$ .; Ngoài ra, các este sulfat có thể xuất hiện trên galactose, các gốc GalNAc, và GlcNAc, và các este phosphat có thể xuất hiện trên các gốc mannoza. NeuAc có thể được axetyl hóa ở vị trí nguyên tử O hoặc được thay thế bởi NeuGl (axit N-glycolylneuraminic). Các N-glycan phức hợp cũng có thể có các sự thay thế bên trong chuỗi về sự chia đôi GlcNAc và fucose (Fuc).

Ngoài ra, glycosyl hóa có thể đạt được hoặc thay đổi thông qua các biện pháp enzym, *in vitro*. Ví dụ, một hoặc nhiều glycosyltransferaza (các enzym thiết lập các liên kết glycosidic tự nhiên) có thể được sử dụng để thêm các gốc sacarit đặc hiệu vào N298, và một hoặc nhiều glycosidaza có thể được sử dụng để loại bỏ các sacarit không mong muốn từ polysacarit liên kết ở vị trí nguyên tử N. Các biện pháp enzym này được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật (xem. Ví dụ, WO/2007/005786).

#### IV. Chức năng phản ứng miễn dịch học và Sự biến đổi Fc

Theo các khía cạnh nhất định, các polypeptit liên kết có thể bao gồm vùng không đổi kháng thể (ví dụ vùng không đổi IgG như vùng không đổi IgG ở người, ví dụ như, vùng không đổi IgG1 hoặc IgG4 ở người) mà làm trung gian để điều chỉnh một hoặc nhiều chức năng phản ứng lại kích thích. Ví dụ, liên kết của thành phần C1 của bổ thể với vùng không đổi kháng thể có thể kích hoạt hệ thống bổ thể. Sự kích hoạt của bổ thể là quan trọng trong tiến trình opsonin hóa các vi trùng và ly giải tế bào mầm bệnh. Sự kích hoạt của bổ thể cũng kích thích phản ứng viêm và cũng có thể được tham gia vào quá miễn tự miễn. Hơn nữa, các kháng thể liên kết với các thụ thể trên các tế bào khác nhau thông qua vùng Fc, với vị trí liên kết thụ thể Fc trên vùng Fc kháng thể Fc liên kết với thụ thể Fc (FCR) trên tế bào. Có một số thụ thể Fc mà là đặc hiệu với các lớp khác nhau của kháng thể, bao gồm IgG (các thụ thể gamma), IgE (các thụ thể epsilon), IgA (các thụ thể alpha) và IgM (các thụ thể mu). Liên kết của kháng thể với các thụ thể Fc trên bề mặt tế bào gây ra một số phản ứng sinh học quan trọng và đa dạng bao gồm sự nhận sâu và phá hủy các hạt phủ kháng thể, sự giải phóng các phức hợp miễn dịch, sự ly giải các tế bào mục tiêu phủ kháng thể bởi các tế bào sát thủ (gọi là độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, hay ADCC), sự giải phóng các chất trung gian gây viêm, vận chuyển qua nhau thai và kiểm soát việc sản xuất globulin miễn dịch. Theo các phương án ưu tiên, các polypeptit liên kết (ví dụ, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng) theo sáng chế liên kết với thụ thể Fc-gamma. Theo các phương án thay thế, polypeptit liên kết theo sáng chế có thể bao gồm vùng không đổi mà thiếu một hoặc nhiều chức năng phản ứng lại kích thích (ví dụ, hoạt tính ADCC) và/hoặc không thể liên kết thụ thể Fc $\gamma$ .

Các phương án nhất định theo sáng chế bao gồm các kháng thể trong đó ít nhất một axit amin trong một hoặc nhiều miền vùng không đổi đã bị xóa hoặc bị thay đổi để tạo ra các đặc tính sinh hóa mong muốn như làm giảm hoặc tăng cường các chức năng phản ứng lại kích thích, khả năng nhị trùng



hóa không cộng hóa trị, làm tăng khả năng định vị tại vị trí của khối u, làm giảm thời gian bán hủy trong huyết thanh, hoặc làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh khi so sánh với kháng thể đầy đủ, không bị thay đổi trong khoảng miễn dịch tương tự. Ví dụ, một số kháng thể nhất định để sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán và điều trị được mô tả trong tài liệu này là các kháng thể đã xóa miễn mà bao gồm chuỗi polypeptit tương tự với chuỗi nặng globulin miễn dịch, nhưng thiếu ít nhất một phần của một hoặc nhiều miền chuỗi nặng. Ví dụ, trong các kháng thể nhất định, toàn bộ một miền của vùng không đổi của các kháng thể biến đổi sẽ bị xóa, ví dụ, toàn bộ hoặc một phần của miền CH2 sẽ bị xóa.

Theo các phương án nhất định khác, các polypeptit liên kết bao gồm các vùng không đổi bắt nguồn từ các isotyp kháng thể khác nhau (ví dụ, các vùng không đổi từ hai hoặc nhiều IgG1 ở người). Theo các khía cạnh khác, các polypeptit liên kết bao gồm bản lề khảm (tức là, bản lề bao gồm các phần bản lề bắt nguồn từ các miền bản lề của các isotyp kháng thể khác nhau, ví dụ, miền bản lề phía trên từ phân tử IgG4 và miền bản lề ở giữa IgG1). Theo một khía cạnh, các polypeptit liên kết bao gồm miền Fc hoặc một phần của nó từ phân tử IgG4 ở người và đột biến Ser228Pro (theo cách đánh số EU) trong vùng bản lề lõi của phân tử.

Theo các phương án nhất định, một phần Fc có thể được biến đổi để tăng hoặc giảm chức năng phản ứng lại kích thích bằng cách sử dụng các kỹ thuật được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, việc xóa bỏ hoặc làm bất hoạt (thông qua các đột biến điểm hoặc các biện pháp khác) miền vùng không đổi có thể làm giảm liên kết thụ thể Fc của kháng thể biến đổi tuần hoàn do đó làm tăng sự định vị khối u. Trong các trường hợp khác, nó có thể là các biến đổi vùng không đổi phù hợp với liên kết bổ sung vừa phải của các sáng chế và vì vậy làm giảm thời gian bán hủy trong huyết thanh và liên kết không đặc hiệu của độc tố tế bào liên hợp. Các biến đổi khác nữa của vùng không đổi có thể được sử dụng để biến đổi các mối liên kết disulfua hoặc các nhóm

chức oligosacarit mà cho phép tăng cường sự định vị do làm tăng tính đặc hiệu hoặc tính linh hoạt kháng nguyên. Cấu hình sinh lý học thu được, sinh khả dụng và các tác dụng sinh hóa khác của các biến đổi này, chẳng hạn như sự định vị khối u, phân bố sinh học và thời gian bán hủy trong huyết thanh, có thể dễ dàng đo lường và định lượng bằng các kỹ thuật miễn dịch học được biết đến rộng rãi mà không cần thử nghiệm quá mức.

Theo các phương án nhất định, miền Fc sử dụng trong kháng thể theo sáng chế là biến thể Fc. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "biến thể Fc" đề cập đến miền Fc có ít nhất một sự thay thế axit amin liên quan đến miền Fc tự nhiên mà miền Fc này có nguồn gốc từ đó. Ví dụ, trong đó miền Fc có nguồn gốc từ kháng thể IgG1 ở người, biến thể Fc của miền Fc IgG1 ở người nói trên bao gồm ít nhất một sự thay thế axit amin liên quan đến miền Fc nói trên.

Sự thay thế axit amin của biến thể Fc có thể được định vị ở bất kỳ vị trí (tức là, bất kỳ vị trí axit amin theo quy ước EU) trong miền Fc. Theo một phương án, biến thể Fc bao gồm sự thay thế ở vị trí axit amin định vị trong miền bản lề hoặc một phần của nó. Theo phương án khác, biến thể Fc bao gồm sự thay thế ở vị trí axit amin định vị trong miền CH2 hoặc một phần của nó. Theo phương án khác, biến thể Fc bao gồm sự thay thế ở vị trí axit amin định vị trong miền CH3 hoặc một phần của nó. Theo phương án khác, biến thể Fc bao gồm sự thay thế ở vị trí axit amin định vị trong miền CH4 hoặc một phần của nó.

Các polypeptit liên kết theo sáng chế có thể sử dụng bất kỳ biến thể Fc được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật mà được biết đến để tạo ra sự cải tiến (ví dụ, làm giảm hoặc tăng cường) về chức năng phản ứng lại kích thích và/hoặc liên kết FcR. Các biến thể Fc đã nêu có thể bao gồm, ví dụ, bất kỳ một sự thay thế nào trong số các sự thay thế axit amin được bộc lộ trong International PCT Publications WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2,

WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2, và WO06/085967A2 hoặc U.S. Pat. Nos. 5.648.260. 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; và 7.083.784. Theo một phương án điển hình, polypeptit liên kết theo sáng chế có thể bao gồm biến thể Fc gồm sự thay thế axit amin ở vị trí 268 EU (ví dụ, H268D hoặc H268E). Theo một phương án điển hình khác, polypeptit liên kết theo sáng chế có thể bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí 239 EU (ví dụ, S239D hay S239E) và/hoặc vị trí 332 EU (ví dụ, I332D hoặc I332Q).

Theo các phương án nhất định, polypeptit liên kết theo sáng chế có thể bao gồm biến thể Fc gồm một sự thay thế axit amin mà làm thay đổi các chức năng phản ứng lại kích thích không phụ thuộc kháng nguyên của kháng thể, cụ thể là thời gian bán hủy tuần hoàn của polypeptit liên kết. Các polypeptit liên kết như vậy thể hiện sự liên kết với FcRn hoặc tăng lên hoặc giảm đi khi so sánh với các polypeptit liên kết không có các sự thay thế này, do đó, có thời gian bán hủy trong huyết thanh tăng lên hoặc giảm đi tương ứng. Các biến thể Fc với ái lực đối với FcRn được cải thiện được dự đoán sẽ có thời gian bán hủy trong huyết thanh dài hơn, và các phân tử như vậy có các ứng dụng hữu ích trong các phương pháp điều trị cho động vật có vú ở đó thời gian bán hủy dài của kháng thể được dùng được mong muốn, ví dụ, để điều trị bệnh mãn tính hoặc rối loạn. Ngược lại, các biến thể Fc với ái lực liên kết FcRn giảm đi được dự kiến sẽ có thời gian bán hủy ngắn hơn, và các phân tử như vậy cũng rất hữu ích, ví dụ, để dùng cho động vật có vú ở đó thời gian tuần được hoàn rút ngắn có thể là một lợi thế, ví dụ như đối với chẩn đoán hình ảnh in vivo hoặc trong các tình huống mà kháng thể bắt đầu có các tác dụng phụ độc hại khi có mặt trong sự tuần hoàn trong thời gian dài. Các biến

thể Fc với ái lực liên kết FcRn giảm đi cũng ít có khả năng đi qua nhau thai và, vì vậy, cũng rất hữu ích trong việc điều trị các bệnh và các rối loạn ở phụ nữ mang thai. Ngoài ra, các ứng dụng khác trong đó ái lực liên kết FcRn giảm đi có thể được mong muốn bao gồm các ứng dụng trong đó sự định vị ở não, thận và/hoặc gan là mong muốn. Theo một phương án điển hình, các polypeptit liên kết thay đổi (ví dụ, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng) theo sáng chế thể hiện sự vận chuyển giảm đi qua tế bào biểu mô của tiểu cầu thận từ mạch máu. Theo phương án khác, các polypeptit liên kết thay đổi (ví dụ, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng) theo sáng chế thể hiện sự vận chuyển giảm đi qua hàng rào máu não (BBB) từ não bộ, vào không gian mạch máu. Theo một phương án, kháng thể với liên kết FcRn thay đổi bao gồm miền Fc có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin trong "vòng lặp liên kết FcRn" của miền Fc. Các vòng lặp liên kết FcRn bao gồm các gốc axit amin 280-299 (theo cách đánh số của EU). Các sự thay thế axit amin điển hình mà thay đổi hoạt tính liên kết FcRn được bộc lộ trong International PCT Publication No. WO05/047.327. Theo các phương án điển hình nhất định, các polypeptit liên kết (ví dụ, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng) theo sáng chế bao gồm miền Fc có một hoặc nhiều hơn các sự thay thế sau đây: V284E, H285E, N286D, K290E và S304D (theo cách đánh số của EU). Theo các phương án điển hình khác nữa, các phân tử liên kết theo sáng chế bao gồm miền Fc ở người với đột biến kép H433K/N434F (xem, ví dụ, US Patent No. 8.163.881).

Theo các khía cạnh khác, các polypeptit liên kết, để sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán và điều trị được mô tả trong tài liệu này có vùng không đổi, ví dụ như, vùng không đổi chuỗi nặng IgG1 hoặc IgG4, mà được thay đổi để giảm hoặc loại bỏ glycosyl hóa. Ví dụ, các polypeptit liên kết (ví dụ, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng) theo sáng chế cũng có thể bao gồm biến thể Fc gồm sự thay thế axit amin mà làm thay đổi glycosyl hóa của kháng thể Fc. Ví dụ, biến thể Fc đã nêu có thể có

glycosyl hóa giảm đi (ví dụ, glycosyl hóa liên kết ở vị trí nguyên tử N hoặc O). Theo các phương án điển hình, biến thể Fc bao gồm glycosyl hóa giảm đi của polysacarit liên kết ở vị trí nguyên tử N thường được tìm thấy ở vị trí axit amin 297 (theo cách đánh số của EU). Theo phương án khác, kháng thể có sự thay thế axit amin gần hoặc trong mô típ glycosyl hóa, ví dụ, mô típ glycosyl hóa liên kết ở vị trí nguyên tử N có chứa trình tự axit amin NXT hoặc NXS. Theo phương án cụ thể, kháng thể bao gồm biến thể Fc với sự thay thế axit amin ở vị trí axit amin 228 hoặc 299 (theo cách đánh số của EU). Theo các phương án cụ thể hơn, kháng thể bao gồm vùng không đổi IgG1 hoặc IgG4 gồm đột biến S228P và T299A (theo cách đánh số của EU).

#### VIII. Các nhóm chức phản ứng lại kích thích

Theo các phương án nhất định, các polypeptit liên kết theo sáng chế bao gồm các nhóm chức phản ứng lại kích thích. Nói chung, các nhóm chức phản ứng lại kích thích này được liên hợp với (trực tiếp hoặc thông qua nhóm chức liên kết) với polysacarit liên kết ở vị trí nguyên tử N trên polypeptit liên kết này, (ví dụ, polysacarit liên kết ở vị trí nguyên tử N liên kết với N298 (theo cách đánh số của EU) của miền CH2 và/hoặc N114 (theo cách đánh số của Kabat) của miền CH1). Theo các phương án nhất định, polypeptit liên kết là kháng thể có chiều dài đầy đủ bao gồm hai miền CH1 với polysacarit tại vị trí 114 Kabat, trong đó cả hai polysacarit này được liên hợp với một hoặc nhiều nhóm chức phản ứng lại kích thích.

Bất kỳ nhóm chức phản ứng lại kích thích có thể được thêm vào các polypeptit liên kết được bộc lộ ở đây. Tốt hơn là, các nhóm chức phản ứng lại kích thích thêm chức năng không tự nhiên vào kháng thể thay đổi hoặc các đoạn của chúng, mà không làm thay đổi đáng kể các hoạt tính nội tại của polypeptit liên kết. Nhóm chức phản ứng lại kích thích có thể là, ví dụ nhưng không giới hạn, tác nhân điều trị hoặc chẩn đoán. tPolypeptit liên kết biến đổi

(ví dụ, kháng thể) theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều các nhóm chức phản ứng lại kích thích, mà có thể cũng khác nhau.

Theo một phương án, nhóm chức phản ứng lại kích thích có thể có công thức (I):

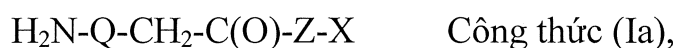


trong đó:

- A) Q là NH hoặc O; và
- B) CON là nhóm chức nối; và
- C) X là một tác nhân trị liệu như được định nghĩa ở đây.

Nhóm chức nối này nối tác nhân điều trị với H<sub>2</sub>N-Q-. Nhóm chức nối có thể bao gồm ít nhất một trong các thành phần phù hợp được biết đến bởi các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm, ví dụ, thành phần alkylenyl, thành phần polyetylen glycol, thành phần poly(glyxin), thành phần poly(oxazolin), thành phần cacbonyl, thành phần có nguồn gốc từ cysteinamit, thành phần có nguồn gốc từ valin kết hợp với citrulin, và thành phần có nguồn gốc từ 4-aminobenzyl cacbamat, hoặc bất kỳ sự kết hợp đó.

Theo phương án khác, nhóm chức phản ứng lại kích thích có công thức (I) có thể có công thức (Ia):



trong đó:

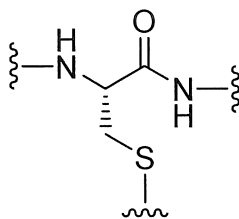
- A) Q là NH hoặc O; và
- B) Z là -Cys-(MC)<sub>a</sub>-(VC)<sub>b</sub>-(PABC)<sub>c</sub>-(C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>f</sub>,

trong đó:

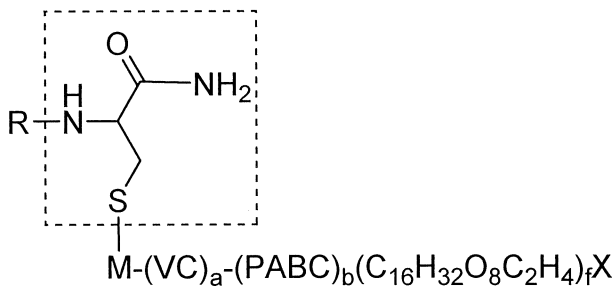
- i. Cys là thành phần có nguồn gốc từ cysteinamit;
- ii. MC là thành phần có nguồn gốc từ maleimit;
- iii. VC là thành phần có nguồn gốc từ valin kết hợp với citrulin;

- (iv) PABC là thành phần có nguồn gốc từ 4-aminobenzyl cacbamat;
- v. X là tác nhân trị liệu như được định nghĩa ở đây;
- vi. a là 0 hoặc 1;
- vii. b là 0 hoặc 1;
- viii. c là 0 hoặc 1; và
- ix. f là 0 hoặc 1

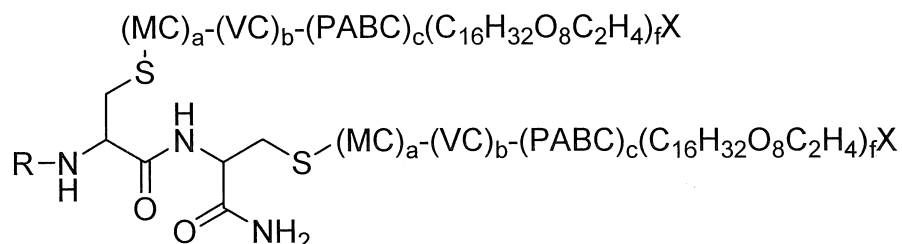
"Thành phần có nguồn gốc từ cysteinamit" là đầu gắn với  $\text{H}_2\text{N-Q-CH}_2\text{-C(O)-}$ . Theo một phương án, "thành phần có nguồn gốc từ cysteinamit" có thể đề cập đến một hoặc nhiều phần của nhóm chức phản ứng lại kích thích có cấu trúc:



Theo một phương án, thành phần "Cys" của nhóm chức phản ứng lại kích thích có thể bao gồm một phần như vậy. Ví dụ, cấu trúc sau đây cho thấy nhóm chức phản ứng lại kích thích với một phần như vậy (trong đó thành phần "Cys" được biểu thị bằng ô vuông có đường nét đứt quãng):

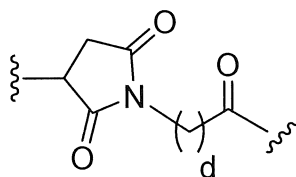


Theo phương án khác, thành phần "Cys" của nhóm chức phản ứng lại kích thích có thể bao gồm hai hoặc nhiều phần như vậy. Ví dụ, nhóm chức sau chứa hai phần như:



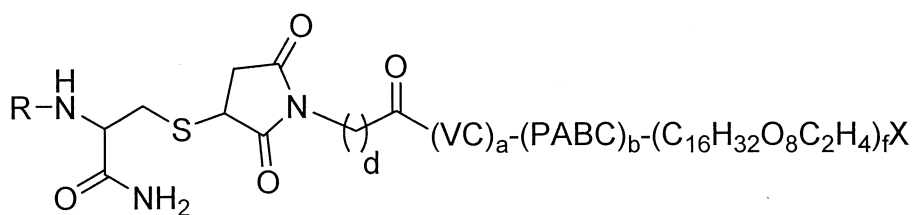
Như có thể thấy từ cấu trúc này, mỗi thành phần "Cys" mang nhóm - (MC)<sub>a</sub>-(VC)<sub>b</sub>-(PABC)<sub>c</sub>-(C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>f</sub>-X.

Theo một phương án, cụm từ "thành phần có nguồn gốc từ maleimit" có thể đề cập đến bất kỳ phần nào của nhóm chức phản ứng lại kích thích có cấu trúc:



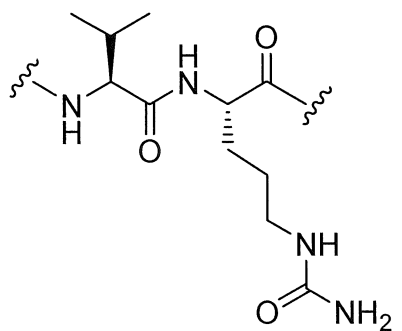
trong đó, d là số nguyên từ 2 đến 5. Số lượng các thành phần MC có trong bất kỳ nhóm Cys-(MC)<sub>a</sub>-(VC)<sub>b</sub>-(PABC)<sub>c</sub>-(C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>f</sub>-X nào trong nhóm chức phản ứng lại kích thích được biểu thị bằng chỉ số dưới "a", và có thể là 0 hoặc 1. Theo một phương án, a là 1. Theo phương án khác, b là 0.

Theo một phương án, thành phần "Cys" có thể được kết nối với thành phần "MC" thông qua nguyên tử lưu huỳnh trong thành phần "Cys", như được biểu thị bằng ô vuông có đường nét đứt quãng trong cấu trúc dưới đây:



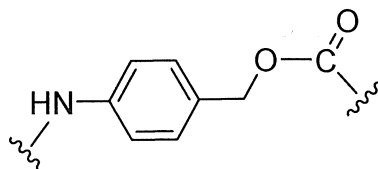


Theo một phương án, cụm từ "thành phần có nguồn gốc từ valin kết hợp với citrulin" có thể đề cập đến bất kỳ phần nào của nhóm chức phản ứng lại kích thích với cấu trúc sau:



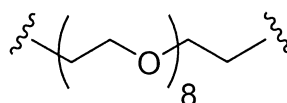
Số lượng các thành phần VC trong bất kỳ nhóm  $\text{Cys-(MC)}_a\text{-(VC)}_b\text{-(PABC)}_c\text{-(C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f\text{-X}$  nào trong nhóm chức phản ứng lại kích thích được biểu thị bằng chỉ số dưới "b", và có thể là 0 hoặc 1. Theo một phương án, b là 1. Theo phương án khác, b là 0.

Theo một phương án, cụm từ "thành phần có nguồn gốc từ 4-aminobenzyl cacbamat" có thể đề cập đến bất kỳ phần nào của nhóm chức phản ứng lại kích thích với cấu trúc sau:



Số lượng các thành phần PABC có trong bất kỳ nhóm  $\text{Cys-(MC)}_a\text{-(VC)}_b\text{-(PABC)}_c\text{-(C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f\text{-X}$  nào trong nhóm chức phản ứng lại kích thích được biểu thị bằng chỉ số dưới "c", và có thể là 0 hoặc 1. Theo một phương án, c là 1. Theo phương án khác, c là 0.

Theo một phương án, " $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4$ " đề cập đến cấu trúc sau:



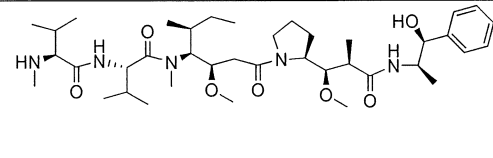
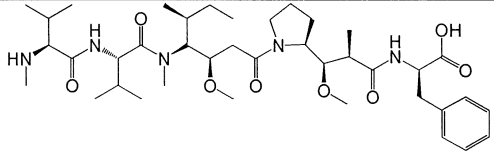
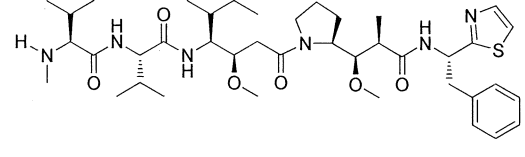
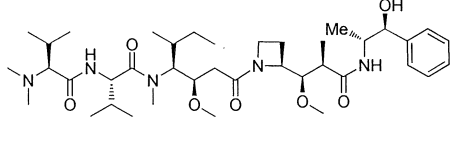
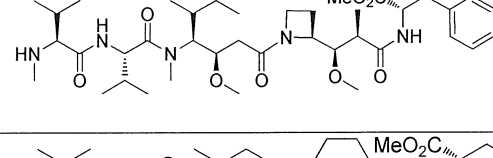
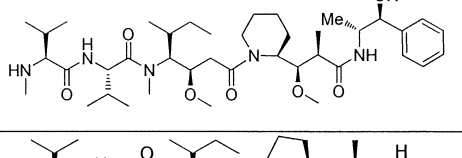
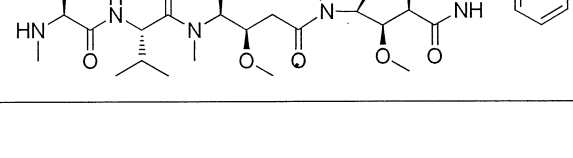
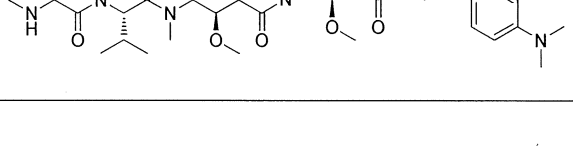
Số lượng các phân tử  $C_{16}H_{32}O_8$  có trong bất kỳ nhóm  $Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f-X$  nào trong nhóm chức phản ứng lại kích thích được biểu thị bằng chỉ số dưới "f". Theo một phương án, f là 1. Theo phương án khác, f là 0.

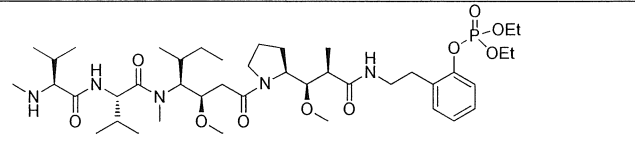
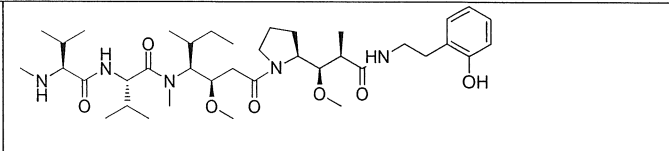
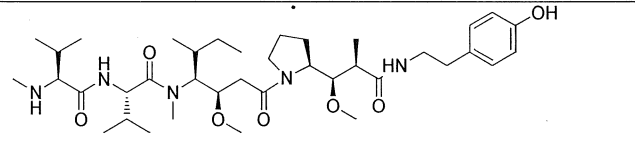
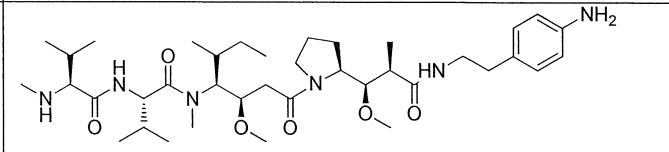
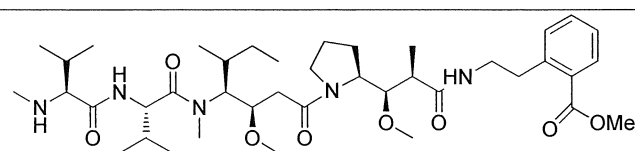
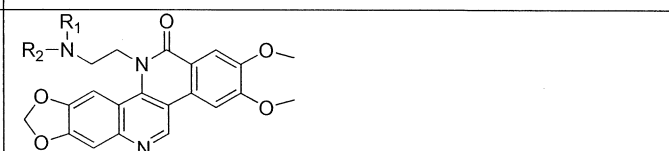
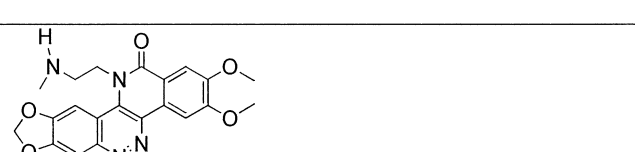
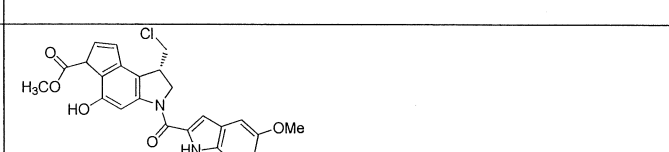
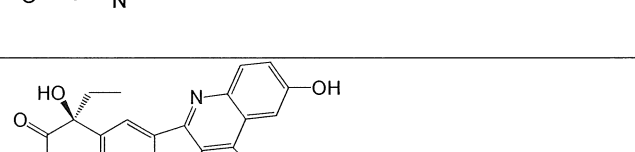
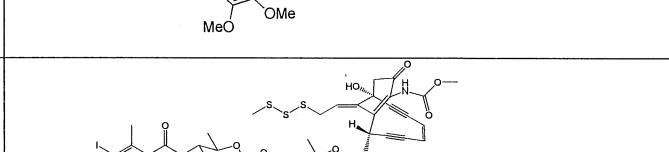
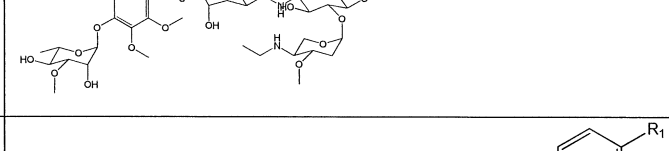
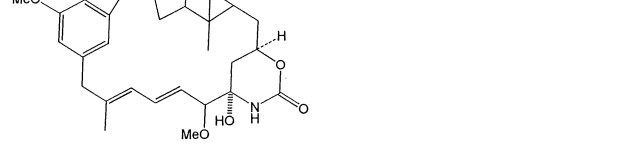
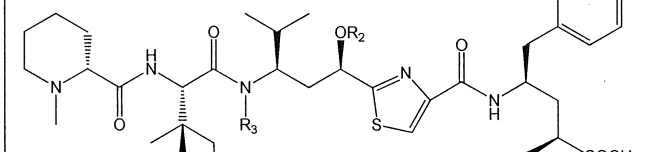
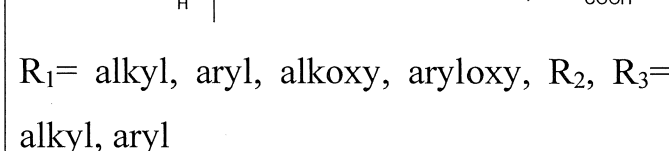
Theo một phương án, a là 1, b là 1, c là 1, và f là 0.

*a) Các nhóm chức phản ứng lại kích thích trị liệu*

Theo các phương án nhất định, các polypeptit liên kết theo sáng chế được liên hợp với nhóm chức phản ứng lại kích thích gồm một tác nhân trị liệu, ví dụ như nhóm chức thuốc (hoặc tiền thuốc của chúng) hoặc hợp chất đánh dấu phóng xạ. Theo một phương án, tác nhân trị liệu là độc tố tế bào. Các nhóm chức phản ứng lại kích thích gây độc tế bào điển hình được nêu trong Bảng 1 ở đây.

Bảng 1. Các nhóm chức phản ứng lại kích thích gây độc tế bào điển hình

|                                                                                     |                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

|                                                                                     |                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|    |    |
|    |    |
|    |    |
|    |    |
|    |    |
|   |   |
|  |  |
|  |  |

$R_1 = \text{alkyl, aryl, alkoxy, aryloxy, } R_2, R_3 = \text{alkyl, aryl}$

Các nhóm chức thuốc điển hình thêm nữa bao gồm các tác nhân kháng viêm, chống ung thư, chống nhiễm trùng (ví dụ, kháng nấm, kháng khuẩn, chống ký sinh trùng, chống virus, v.v. ) và các tác nhân điều trị gây mê. Theo phương án được thêm nữa, nhóm chức thuốc là tác nhân chống ung thư. Các tác nhân chống ung thư điển hình bao gồm, nhưng không giới hạn, các cytostatic, các tác nhân ức chế enzym, các tác nhân điều chỉnh gen, các nucleosit gây độc tế bào, các tác nhân liên kết tubulin hoặc các tác nhân ức

chế tubulin, các tác nhân ức chế proteasome, các hormone và các tác nhân đối kháng hormone, các tác nhân chống tạo mạch, và các tác nhân tương tự. Các tác nhân chống ung thư kim tế bào điển hình gồm các tác nhân alkyl hóa như họ các thuốc anthracyclin (ví dụ: adriamycin, carminomycin, cyclophosphorin-A, cloroquin, metoplerin, mithramycin, porfiromycin, streptonigrin, porfiromycin, các anthracenedion, và các aziridin). Các tác nhân chống ung thư kim tế bào khác bao gồm các tác nhân ức chế tổng hợp ADN (ví dụ như metotrexat và clorodiclorometotrexat, 3-amino-1,2,4-benzotriazin 1,4-dioxit, aminopterin, cytosin e  $\beta$ -D-arabinofuranosit, 5-fluoro-5'-deoxyuridin, 5-fluorouracil, ganciclovir, hydroxyurea, actinomycin-D, và mitomycin C), các tác nhân xen vào giữa ADN hoặc các liên kết chéo (ví dụ như bleomycin, carboplatin, carmustin, busulfan, chlorambucil, cyclophosphorin, cis-diamminplatinum (II) diclorua (cisplatin), melphalan, mitoxantron, và oxaliplatin), và các điều hòa phiên mã ADN-ARN (ví dụ, actinomycin D, daunorubicin, doxorubicin, homoharringtonin, và idarubicin). Các tác nhân kim tế bào điển hình khác tương thích với sáng chế bao gồm các ansamycin benzoquinon, các dẫn xuất quinonoid (ví dụ như các quinolon, genistein, baccatin), busulfan, ifosfamid, mechlorethamin, triaziquon, diaziquon, carbaziquon, indoloquinon EO9, diaziridinyl-benzoquinon metyl DZQ, trietylenphosphorin, và các hợp chất nitrosourea (ví dụ carmustin, lomustin, semustin).

Các tác nhân chống ung thư nucleosit gây độc tế bào điển hình bao gồm, ví dụ, adenosin arabinosit, cytarabin, cytosin arabinosit, 5-fluorouracil, fludarabin, floxuridin, florafur, và 6-mercaptopurin. Các tác nhân liên kết tubulin chống ung thư điển hình bao gồm các taxoit (ví dụ như paclitaxel, docetaxel, taxan), nocodazol, rhizoxin, các dolastatin (ví dụ Dolastatin-10, -11, hoặc -15), colchicin và các colchicinoid (ví dụ ZD6126), các combretastatin (ví dụ combretastatin A-4, AVE-6032), và các vinca alkaloid (ví dụ như vinblastin, vincristin, vindesin, và vinorelbin (navelbin)). Các

hormon và các tác nhân đối kháng hormon chống ung thư điển hình, bao gồm các corticosteroid (như prednison), progestin (ví dụ hydroxyprogesteron hoặc medroprogesteron), các estrogen (ví dụ như diethylstilbestrol), các chất kháng estrogen (ví dụ như tamoxifen), các nội tiết tố androgen (ví dụ như testosterone), các chất ức chế aromatase (ví dụ aminoglutethimide), 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin, 4-amino-1, 8-naphthalimide, apigenin, brefeldin A, cimetidine, axit clorodiclorometylen-diphosphonic, leuprolide (leuprorelin), hormon giải phóng hormon luteinizing, pifithrin-a, rapamycin, globulin liên kết hormon giới tính, và thapsigargin. Các hợp chất chống ung thư, chống tạo mạch điển hình bao gồm Angiostatin K1-3, DL-a-difluoromethyl-ornithine, endostatin, fumagillin, genistein, minocycline, staurosporin, và ( $\pm$ )-thalidomide.

Các chất ức chế enzyme chống ung thư điển hình bao gồm nhưng không giới hạn, S(+)-camptothecin, curcumin, (-)-deguelin, 5,6-dichlorobenzimidazole 1- $\beta$ -D-ribofuranoside, etoposide, formestane, fostriecin, hispidin, axit 2-imino-1-imidazolidineacetate (cyclocreatine), mevinolin, trichostatin A, tyrphostin AG 34, và tyrphostin AG 879.

Các tác nhân điều chỉnh gen chống ung thư điển hình bao gồm 5-aza-2'-deoxycytidine, 5-azacytidine, cholecalciferol (vitamin D3), 4-hydroxytamoxifen, melatonin, mifepristone, raloxifen, trans-retinal (các vitamin A aldehyde), axit retinoic, axit vitamin A, axit 9-cis-retinoic, axit 13-cis-retinoic, retinol (vitamin A), tamoxifen, và troglitazone.

Các lớp của các chất chống ung thư được ưu tiên khác bao gồm, ví dụ, họ pteridine của các thuốc, các diene, và các podophyllotoxin. Đặc biệt hữu ích là các thành viên của các lớp bao gồm, ví dụ, các dẫn xuất metopterin, podophyllotoxin, hoặc podophyllotoxin như etoposide hoặc etoposide phosphate, leurosine, vindesine, leurosin và các chất tương tự.

Các tác nhân chống ung thư khác nữa tương thích với sáng chế bao gồm các auristatin (ví dụ auristatin E và monomethylauristatin E),

geldanamycin, calicheamicin, gramicidin D, các maytansanoid (ví dụ maytansin), neocarzinostatin, topotecan, các taxan, xytochalasin B, ethidium bromit, emetin, tenoposit, colchicin, anthracindion dihydroxy, mitoxantron, procain, tetracain, lidocain, propranolol, puromyxin, và các chất tương tự hoặc các chất tương đồng của nó.

Các chất chống ung thư khác nữa tương thích với sáng chế bao gồm các dẫn xuất tomaymyxin, các dẫn xuất maytansin, các dẫn xuất cryptophyxin, các dẫn xuất anthracyclin, các dẫn xuất bisphosphonat, các dẫn xuất leptomyxin, các dẫn xuất streptonigrin, các dẫn xuất auristatin, và các dẫn xuất duocarmyxin.

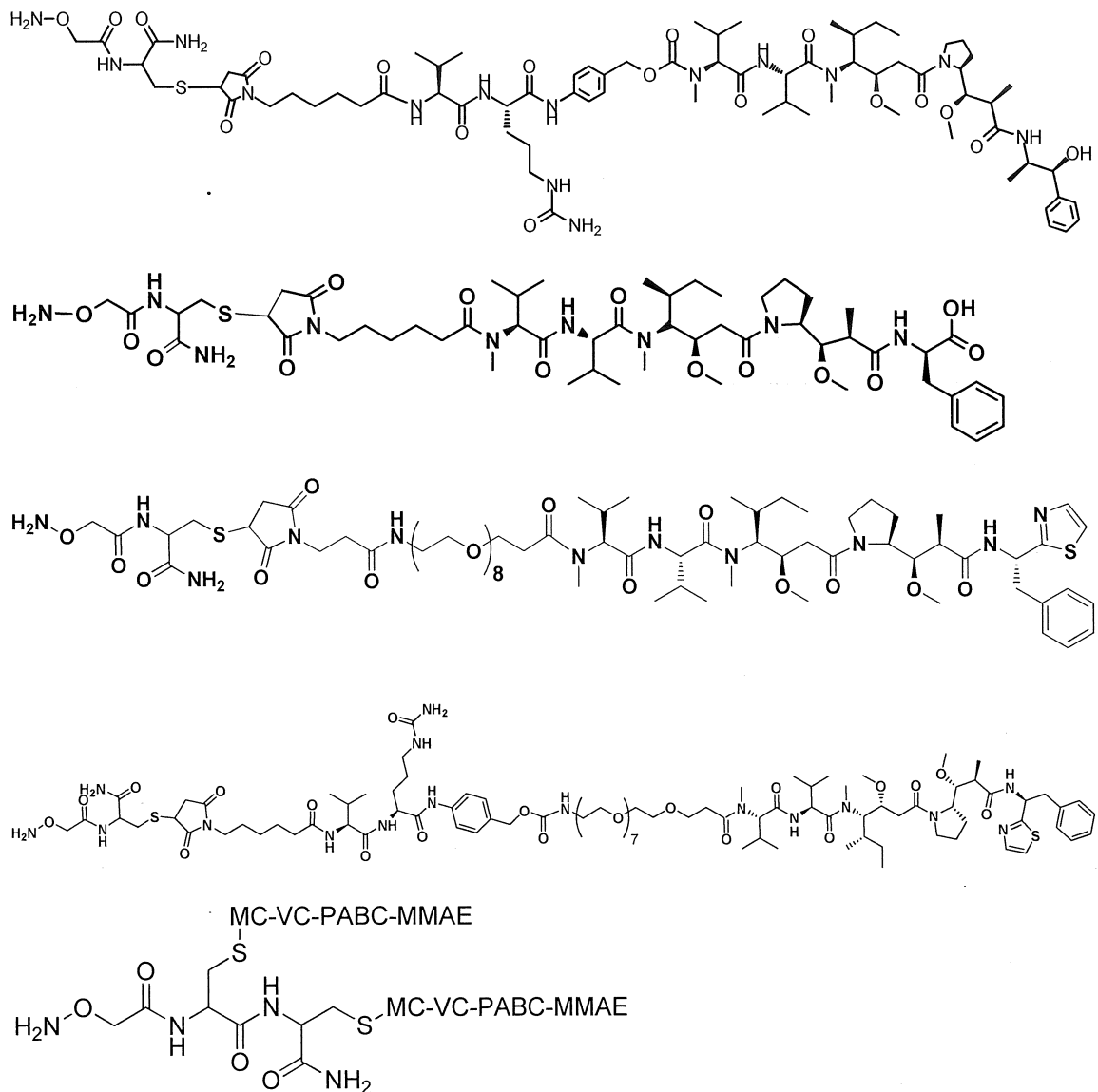
Lớp các chất chống ung thư tương thích khác có thể được sử dụng làm các nhóm chức thuốc là các thuốc nhạy phóng xạ mà có thể là hiệu quả trực tiếp với khối u hoặc các tế bào phản ứng miễn dịch. Các nhóm chức thuốc tăng cường độ nhạy với bức xạ ion hóa, do đó làm tăng hiệu quả xạ trị. Không bị giới hạn bởi lý thuyết, nhưng một kháng thể được sửa đổi với nhóm chức thuốc nhạy phóng xạ và được tiếp nhận bởi tế bào khối u sẽ vận chuyển chất nhạy phóng xạ gần nhân nơi sự nhạy phóng xạ sẽ là tối đa. Các kháng thể mất nhóm chức nhạy phóng xạ sẽ được dọn sạch nhanh chóng khỏi máu, định vị tác nhân nhạy phóng xạ còn lại trong khối u mục tiêu và cung cấp sự hấp thu tối thiểu trong các mô bình thường. Sau khi làm sạch khỏi máu, xạ trị bổ sung có thể được sử dụng bằng chùm tia bức xạ bên ngoài trực tiếp đến khối u, phóng xạ được cấy trực tiếp vào khối u, hoặc xạ trị miễn dịch hệ thống với cùng kháng thể được sửa đổi.

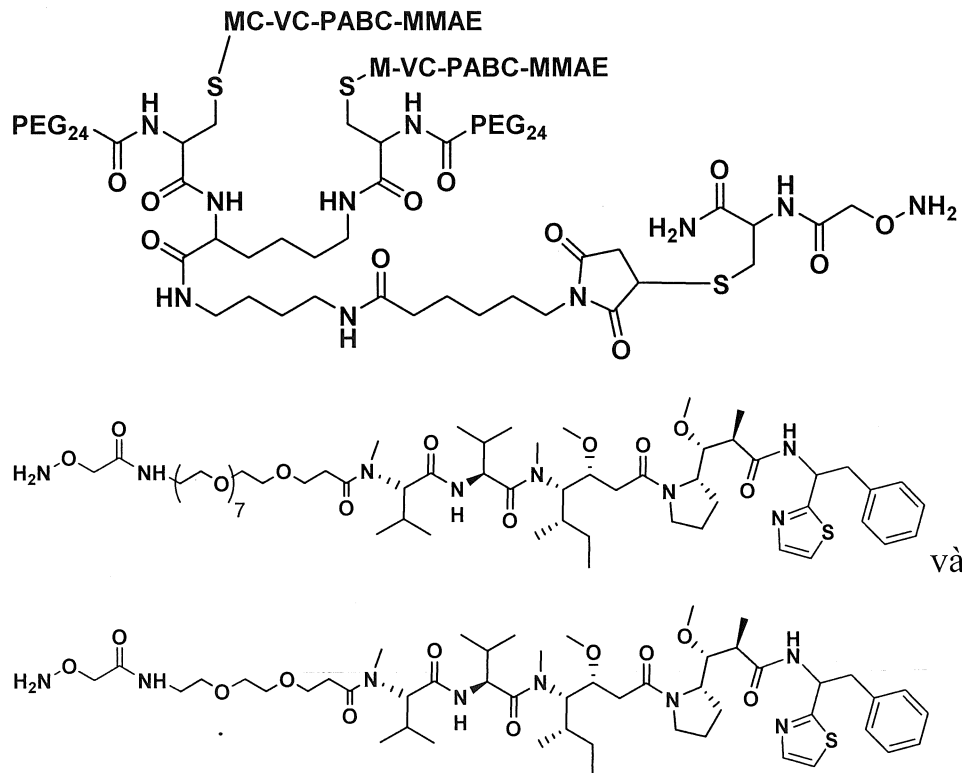
Theo một phương án, tác nhân trị liệu bao gồm các hạt nhân phóng xạ hoặc các chất đánh dấu phóng xạ với bức xạ ion hoá năng lượng cao có khả năng gây ra các sự phá vỡ nhiều sợi trong ADN hạt nhân, dẫn đến chết tế bào. Các hạt nhân phóng xạ năng lượng cao điển hình bao gồm:  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$  và  $^{188}\text{Re}$ . Các đồng vị này thường tạo ra các hạt  $\alpha$  hoặc  $\beta$  năng lượng cao có chiều dài

đường đi ngắn. Các hạt nhân phóng xạ như vậy tiêu diệt các tế bào ở gần chúng, ví dụ như các tế bào ung thư theo đó thể liên hợp được gắn vào hoặc được đưa vào. Các hạt nhân phóng xạ như vậy có rất ít hoặc không có ảnh hưởng lên các tế bào không phải địa phương và cơ bản là không miễn dịch. Ngoài ra, các đồng vị năng lượng cao có thể được tạo ra bằng cách chiếu xạ nhiệt của một đồng vị ổn định khác, ví dụ như trong trị liệu bắt neutron bo (Guan et al, PNAS, 95: 13206-10, 1998).

Theo một phương án, tác nhân trị liệu được lựa chọn từ MMAE, MMAF, và PEG8-Do110.

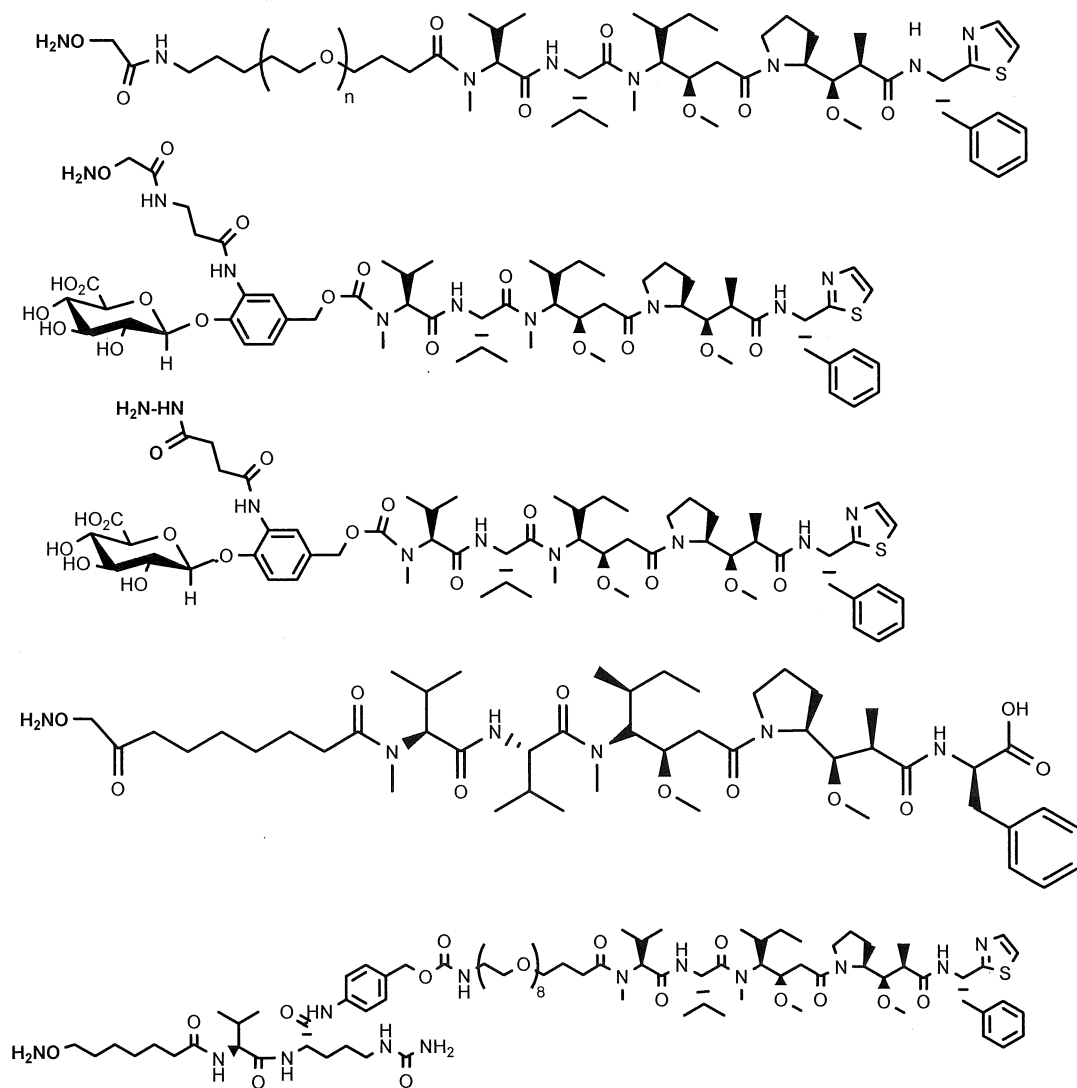
Các nhóm chức phản ứng lại kích thích trị liệu điển hình bao gồm các cấu trúc:





Theo một phương án, nhóm chức phản ứng lại kích thích được chọn từ:





Theo các phương án nhất định, nhóm chức phản ứng lại kích thích chứa nhiều hơn một tác nhân trị liệu. Các tác nhân trị liệu này có thể giống nhau hoặc khác nhau.

*i. Các nhóm chức phản ứng lại kích thích mang tính chẩn đoán*

Theo các phương án nhất định, các polypeptit liên kết theo sáng chế được liên hợp với nhóm chức phản ứng lại kích thích gồm tác nhân chẩn đoán. Theo một phương án, tác nhân chẩn đoán là các chất đánh dấu phân tử nhỏ có thể phát hiện được như biotin, các chất huỳnh quang, các chất sinh màu, các đầu dò cộng hưởng quay, hoặc các chất đánh dấu phóng xạ. Các

chất huỳnh quang điển hình bao gồm các thuốc nhuộm huỳnh quang (ví dụ fluorescein, Rhodamine, và chất tương tự) và các phân tử phát quang khác (ví dụ như luminal). Chất huỳnh quang có thể là nhạy với môi trường để huỳnh quang của nó thay đổi nếu nó nằm gần với một hoặc nhiều gốc trong polypeptit liên kết biến đổi mà trải qua các thay đổi về cấu trúc khi liên kết chất nền (ví dụ các đầu dò dansyl). Các chất đánh dấu phóng xạ điển hình bao gồm các phân tử nhỏ có chứa các nguyên tử với một hoặc nhiều hạt nhân có độ nhạy thấp ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{43}\text{K}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$  và nguyên tử tương tự). Tốt hơn là, hạt nhân phóng xạ này là hạt nhân phóng xạ phát ra gamma, photon, hoặc positron có chu kỳ bán rã phù hợp để cho phép hoạt động hoặc phát hiện sau thời gian trôi qua trong khoảng sử dụng thuốc và định vị vị trí chụp hình.

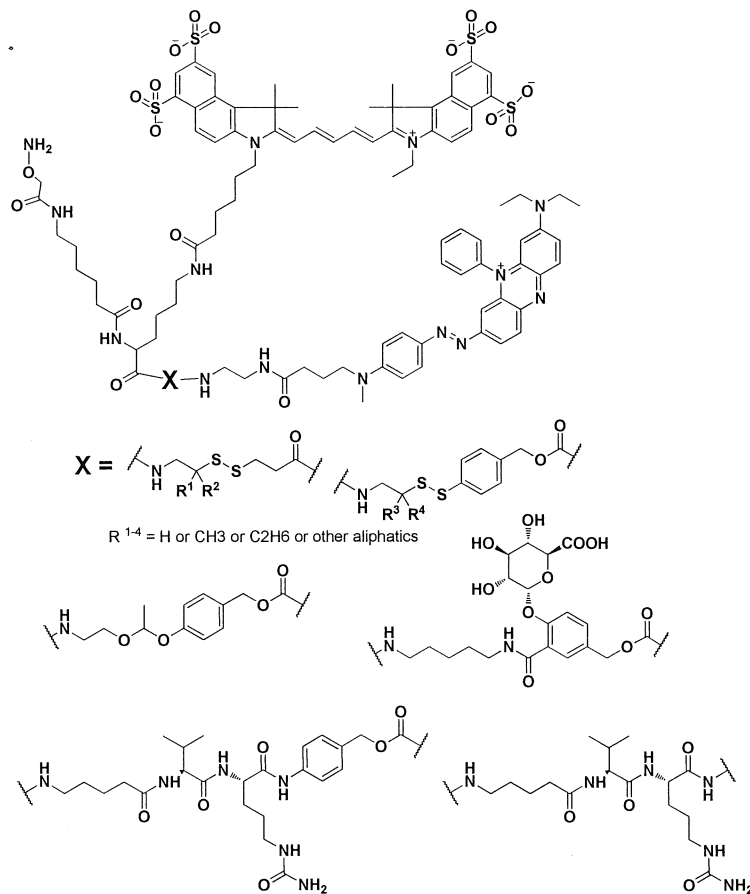
Theo một phương án, tác nhân chẩn đoán là polypeptit. Các polypeptit chẩn đoán điển hình bao gồm các enzym có hoạt tính huỳnh quang hoặc sinh màu, ví dụ như khả năng để tách chất nền mà tạo thành chất huỳnh quang hoặc sinh màu như một sản phẩm (tức là các protein báo cáo như luciferaza). Các protein chẩn đoán khác có thể có hoạt tính huỳnh quang hoặc sinh màu nội tại (ví dụ, các protein aequorin phát quang sinh học huỳnh quang màu xanh lá cây, màu đỏ, và màu vàng từ sinh vật biển phát quang sinh học) hoặc chúng có thể bao gồm protein có chứa một hoặc nhiều hạt nhân phóng xạ năng lượng thấp ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{43}\text{K}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$  và hạt nhân tương tự).

Đối với việc sử dụng các thể liên hợp đánh dấu phóng xạ kết hợp với sáng chế, các polypeptit liên kết theo sáng chế có thể được dán nhãn trực tiếp (ví dụ như thông qua phản ứng iot hoá) hoặc có thể được dán nhãn gián tiếp thông qua việc sử dụng tác nhân chelat hoá. Như được sử dụng ở đây, cả hai cụm từ "dán nhãn gián tiếp" và "phương pháp dán nhãn gián tiếp" đều có nghĩa là tác nhân chelat hoá được liên kết cộng hóa trị với polypeptit liên kết và ít nhất một hạt nhân phóng xạ được kết hợp với tác nhân chelat hoá. Các

tác nhân chelat hoá như vậy thường được gọi là các tác nhân chelat hoá nhị chức khi chúng liên kết cả polypeptit và đồng vị phóng xạ. Các tác nhân chelat hoá điển hình bao gồm các dẫn xuất axit 1-isothiocycmatobenzyl-3-metyldiothelen triaminpentaaxetic ("MX-DTPA") và axit xyclohexyl dietylntriamin pentaaxetic ("CHX-DTPA"). Các tác nhân chelat hoá khác gồm các dẫn xuất P-DOTA và EDTA. Các hạt nhân phóng xạ được đặc biệt ưu tiên để dán nhãn gián tiếp bao gồm  $^{111}\text{In}$  và  $^{90}\text{Y}$ . Hầu hết các nghiên cứu hình ảnh sử dụng 5 mCi kháng thể dán nhãn  $^{111}\text{In}$ , vì liều lượng này là an toàn và hiệu quả hình ảnh tăng lên so với các liều thấp hơn, với hình ảnh tối ưu xuất hiện tại thời điểm từ 3 đến 6 ngày sau khi sử dụng kháng thể. Xem, ví dụ, Murray, (1985), J. Nuc. Med. 26: 3328 và Carraguiillo et al, (1985), J. Nuc. Med. 26: 67. Hạt nhân phóng xạ được đặc biệt ưu tiên để dán nhãn trực tiếp là  $^{131}\text{I}$ . Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ đánh giá cao rằng các liên không phóng xạ cũng có thể được kết hợp tùy thuộc vào các tác nhân được lựa chọn để được liên hợp.

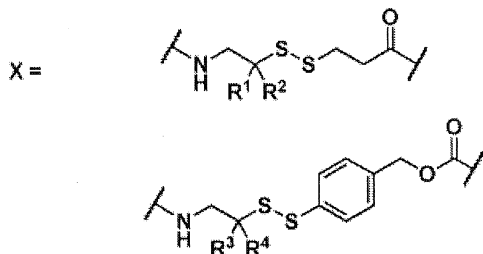
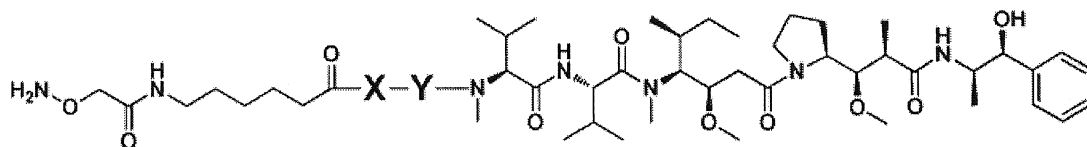
Theo các phương án nhất định, các nhóm chức phản ứng lại kích thích mang tính chẩn đoán là đầu dò FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). FRET đã được sử dụng cho một loạt các ứng dụng chẩn đoán bao gồm các chẩn đoán ung thư. Đầu dò FRET có thể bao gồm một mối liên kết có thể tách ra được (mối liên kết nhạy enzym hoặc pH) kết nối các nhóm chức cho và nhận của đầu dò FRET, trong đó sự phân tách dẫn đến sự phát huỳnh quang được tăng cường (bao gồm hồng ngoại gần) (xem, ví dụ như: A. Cobos-Correa et. al. *Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation*, Nature Chemical Biology (2009), 5(9), 628-63; S. Gehrig et.al. *Spatially Resolved Monitoring of Neutrophil Elastase Activity with Ratiometric Fluorescent Reporters* (2012) Angew. Chem. Int. Ed., 51, 6258–6261).

Theo một phương án, nhóm chức phản ứng lại kích thích được chọn từ:

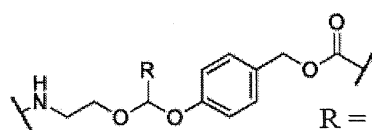


*c. Các nhóm chức phản ứng lại kích thích được chức năng hóa*

Theo các phương án nhất định, các nhóm chức phản ứng lại kích thích theo sáng chế có thể được chức năng hóa để chứa các nhóm bổ sung thêm vào chính nhóm chức phản ứng lại kích thích. Ví dụ, nhóm chức phản ứng lại kích thích có thể chứa các mối liên kết có thể tách ra được mà giải phóng nhóm chức phản ứng lại kích thích từ polypeptit liên kết dưới các điều kiện cụ thể. Theo các phương án điển hình, nhóm chức phản ứng lại kích thích có thể bao gồm một mối liên kết mà có thể tách ra được bằng các enzym tế bào và/hoặc là nhạy pH. Ngoài ra hoặc cách khác, nhóm chức phản ứng lại kích thích có thể chứa liên kết disulfua mà được tách bằng glutathion trong tế bào khi hấp thụ vào tế bào. Disulfua điển hình và các mối liên kết nhạy pH được cung cấp dưới đây:

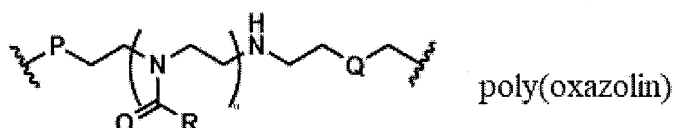
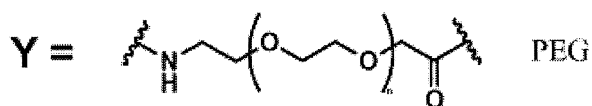
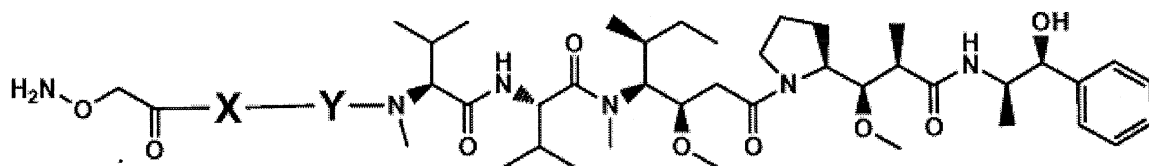


$R^{1-4} = H$  hoặc  $CH_3$  hoặc  $C_2H_5$  hoặc các aliphatic khác



$R = H$  hoặc các nhóm alkyl, alkylaryl được thay thế hoặc chưa được thay thế

Theo các phương án khác nữa, nhóm chức phản ứng lại kích thích có thể bao gồm các nhóm chức ưa nước và tương thích sinh học như poly(glyxin), poly(oxazolin), hoặc các nhóm chức PEG. Các cấu trúc điển hình ("Y") được cung cấp dưới đây:

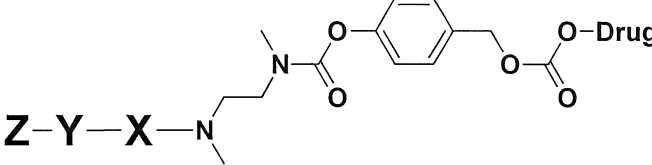
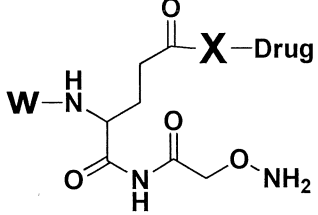
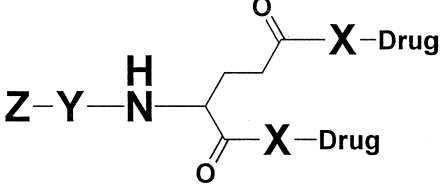


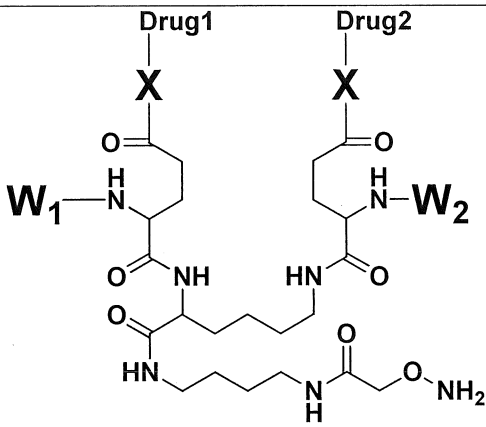
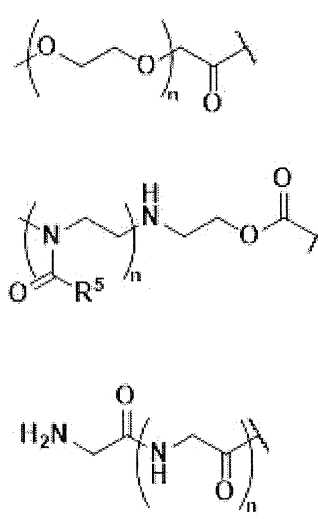
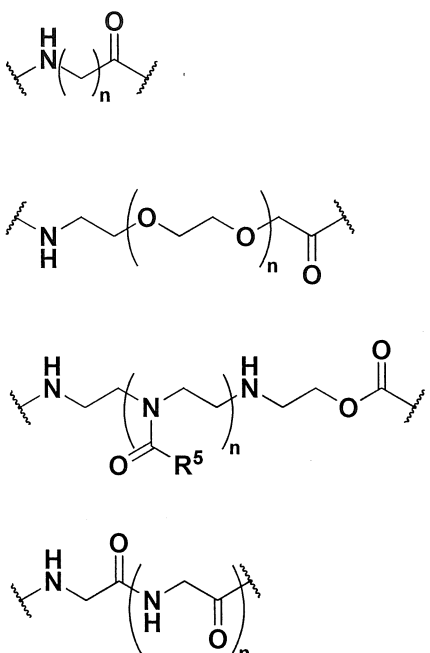
R = H, nhóm chưa được thay thế hoặc nhóm chức chứa các nhóm alkyl  
P và Q = các nhóm chức giống hoặc khác nhau để liên kết các thuốc, các phân tử và protein báo cáo

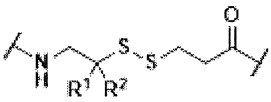
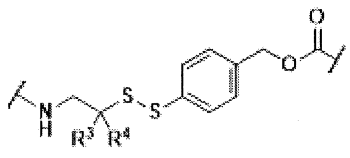
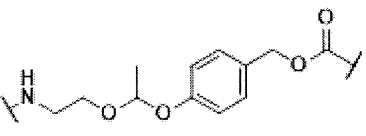
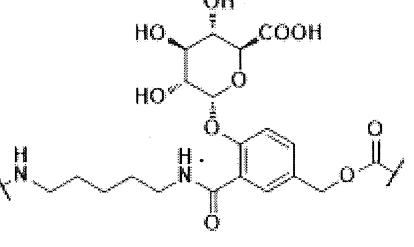
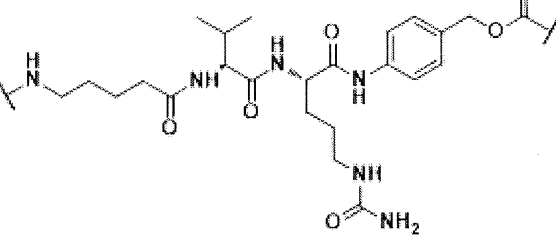
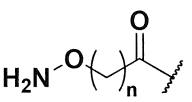
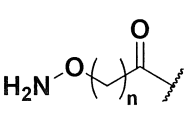
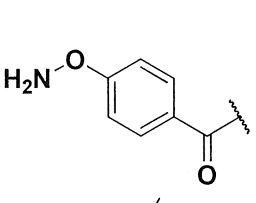
Theo các phương án nhất định, nhóm chức phản ứng lại kích thích chứa nhóm aminooxy mà tạo điều kiện cho sự liên hợp với polypeptit liên kết thông qua liên kết oxim ổn định. Các nhóm chức phản ứng lại kích thích điển hình có chứa các nhóm aminooxy được nêu trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Các nhóm chức phản ứng lại kích thích aminooxy điển hình (trong đó X có thể là mỗi liên kết bất kỳ, Y là vùng đệm bất kỳ, và trong đó X và/hoặc Y là không bắt buộc)

Thuốc (Drug) ở đây có thể là bất kỳ loại thuốc nào của bảng 1 ở đây. Thuốc1 (Drug1) và Thuốc2 (Drug2) có thể giống hoặc khác nhau.

|                                                                                     |                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Z-Y-X-Drug</b>                                                                   |  |
|  |  |

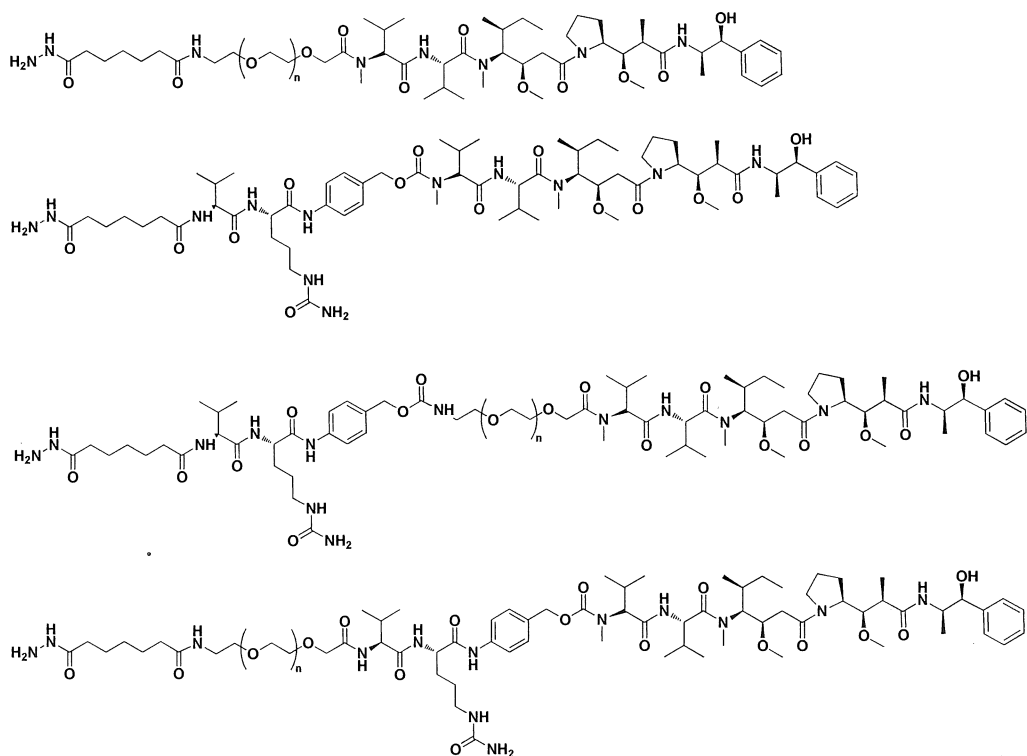
|                                                                                   |                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>W, W1 và W2 =</p>  |
|                                                                                   | <p>Y =</p>           |

| X =                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Z =                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <br><br><br><br><br><p><math>R^{1-5} = H, \text{ Alkyl hoặc Aryl}</math></p> | <br><br><br> |

Theo các phương án khác, nhóm chức phản ứng lại kích thích chứa nhóm hydrazit và/hoặc nhóm hydrazin được alkyl hoá ở vị trí nguyên tử N để tạo điều kiện cho sự liên hợp với polypeptit liên kết thông qua liên kết hydrazon ổn định. Các nhóm chức phản ứng lại kích thích điển hình có chứa các nhóm aminooxy được nêu trong Bảng 14 dưới đây.

Bảng 14. Các nhóm chức phản ứng lại kích thích hyzarin và/hoặc hydrazit điển hình

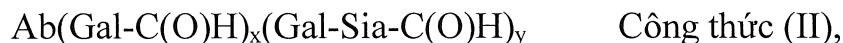




## V. Sự liên hợp của các nhóm chức phản ứng lại kích thích với các polypeptit liên kết

Theo các phương án nhất định, các nhóm chức phản ứng lại kích thích được liên hợp (trực tiếp hoặc thông qua nhóm chức liên kết) với polysacarit được oxy hóa (ví dụ, polysacarit liên kết ở vị trí nguyên tử N được oxy hóa) của polypeptit liên kết được thay đổi, (ví dụ, polysacarit được thiết kế tại vị trí N298 của miền Fc kháng thể). Thuật ngữ "polysacarit được oxy hóa" có nghĩa là nhóm thế rượu trên polysacarit đã được oxy hóa, tạo ra nhóm thế cacbonyl. Nhóm thế cacbonyl có thể phản ứng với ái nhân nitơ thích hợp để tạo thành liên kết đôi cacbon-nitơ. Ví dụ, phản ứng của nhóm cacbonyl với nhóm aminooxy hoặc nhóm hydrazin sẽ tạo thành oxim hoặc hydrazin, tương ứng. Theo một phương án, nhóm thế cacbonyl là andehyt. Các polysacarit được oxy hóa phù hợp bao gồm galactose được oxy hóa và axit sialic được oxy hóa.

Theo một phương án, polypeptit được biến đổi có công thức (II) có thể là công thức (II):



trong đó:

- A) Ab là một kháng thể hoặc polypeptit liên kết khác như được xác định ở đây;
- B) Gal là thành phần có nguồn gốc từ galactose;
- C) Sia là thành phần có nguồn gốc từ axit sialic;
- D) x là 0 đến 5; và
- E) y là 0 đến 5,

trong đó ít nhất một x và y không phải là 0.

Bất kỳ kỹ thuật hóa học được công nhận có thể được sử dụng để liên hợp nhóm chức phản ứng lại kích thích (ví dụ, nhóm chức phản ứng lại kích thích gồm nhóm chức liên kết) với polysacarit (xem ví dụ, Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques. Academic Press (1996)). Theo các phương án nhất định, gốc sacarit (ví dụ, axit sialic hoặc gốc galactose) của polysacarit bị oxy hóa trước tiên (ví dụ như, bằng cách sử dụng Natri periodat hoặc xử lý galactose oxidaza) để tạo ra nhóm andehyt phản ứng. Nhóm andehyt này được phản ứng với nhóm aminooxy hoặc nhóm hydrazin của nhóm chức phản ứng lại kích thích để tạo thành mối liên kết oxim hoặc hydrazon, tương ứng. Các phương pháp điển hình sử dụng sơ đồ phản ứng chung này được nêu trong các ví dụ từ 10 đến 15.

Theo các phương án nhất định, các polysacarit tự nhiên hoặc được thiết kế của polypeptit liên kết trước tiên được xử lý trước với enzym glycosyltransferaza *in vitro* để tạo ra gốc sacarit cuối mà có hoạt tính phù hợp. Ví dụ, sialyl hóa có thể đạt được đầu tiên bằng cách sử dụng sự kết hợp của galactosyltransferaza (Gal T) và sialyltransferaza (Sial T). Theo các phương án nhất định, các polysacarit có hai nhánh thiếu galactose (G0F hoặc

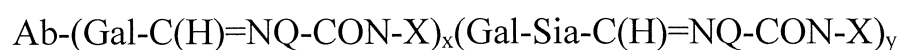
G0) hoặc chỉ chứa một galactose (G1F hoặc G1) có thể được biến đổi thành các cấu trúc được galactosyl hóa hoặc sialyl hoá cao hơn phù hợp cho sự liên hợp (G1F, G1, G2F, G2, G1S1F, G1S1, G2S1F, G2S1, G2S2F, hoặc G2S2).

Sơ đồ liên hợp điển hình để tạo ra các liên hợp glyco được sialyl hóa được thể hiện trong Hình 25C. Các gốc axit sialic được đưa vào bằng enzym và ở vị trí cụ thể của polysacarit của kháng thể (ví dụ, polysacarit được thiết kế tại vị trí N298 của miền Fc) bằng cách sử dụng sự kết hợp của galactosyltransferaza (Gal T) và sialyltransferaza (Sial T). Các gốc axit sialic được đưa vào sau đó bị oxy hóa với nồng độ thấp của Natri periodat để thu được các andehyt axit sialic hoạt tính phản ứng thích hợp với các mối liên kết thuốc (ví dụ, các mối liên kết thuốc aminooxy) để tạo ra các liên hợp thuốc kháng thể (ADC) (ví dụ, các ADC được liên kết oxim). Bằng cách kiểm soát số lượng các polysacarit và số lượng các gốc sialic với việc tái cấu trúc *in vitro*, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật có thể kiểm soát chính xác tỷ lệ thuốc-kháng thể (DAR) của các ADC. Ví dụ, nếu ~ 1 axit sialic được thêm vào polysacarit có hai nhánh đơn (A1F) trong mỗi chuỗi nặng, kháng thể hoặc polypeptit liên kết với DAR của 2 có thể thu được đồng nhất.

## VI. Polypeptit liên kết được thay đổi

Theo các phương án nhất định, phát minh cung cấp các polypeptit mà là sản phẩm của các nhóm chức thuốc phản ứng kết hợp được hợp chất (trực tiếp hoặc thông qua một một nửa mối liên kết) đến một polysacarit oxy hóa (ví dụ, một N-glycan liên kết bị oxy hóa) của polypeptit liên kết polypeptit liên kết thay đổi sửa đổi (ví dụ: , một polysacarit kế tại N298 của miền Fc kháng thể).

Theo các phương án nhất định, polypeptit liên kết có thể có công thức (III):

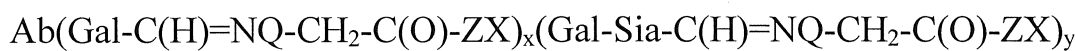


Công thức (III),

trong đó:

- A) Ab là một kháng thể như được xác định ở đây;
  - B) Q là NH hoặc O;
  - C) CON là nhóm chức kết nối như được định nghĩa ở đây; và
  - D) X là một tác nhân điều trị hoặc chẩn đoán bệnh như được xác định ở đây;
  - E) Gal là thành phần có nguồn gốc từ galactose;
  - F) Sia là thành phần có nguồn gốc từ axit sialic;
  - G) x là từ 0 đến 5; và
  - H) y là từ 0 đến 5,
- trong đó ít nhất một x và y không phải là 0.

Theo một phương án, polypeptit liên kết có thể có công thức (III) có thể có công thức (IIIa):



Formula (IIIa),

trong đó:

- A) Ab là kháng thể;
- B) Q là NH hoặc O;
- C) Z là  $\text{Cys}-(\text{MC})_a-(\text{VC})_b-(\text{PABC})_c-(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4)_f$ , trong đó
  - i. Cys là thành phần có nguồn gốc cysteinamit;
  - ii. MC là thành phần có nguồn gốc từ maleimit;
  - iii. VC là thành phần có nguồn gốc từ valin kết hợp với citrulin;
  - iv PABC là thành phần có nguồn gốc từ 4-aminobenzyl cacbamat;
  - v. X là một tác nhân điều trị hoặc chẩn đoán bệnh như được xác định ở đây;
  - vi. a là 0 hoặc 1;
  - vii. b là 0 hoặc 1;

viii.  $c$  là 0 hoặc 1; và

ix.  $f$  là 0 hoặc 1;

D) X là tác nhân tri liệu như được định nghĩa ở đây;

E) Gal là thành phần có nguồn gốc từ galactose;

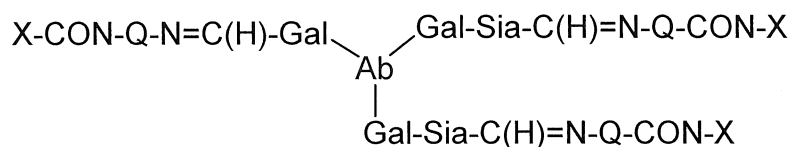
F) Sia là thành phần có nguồn gốc từ axit sialic;

G)  $x$  là từ 0 đến 5; và

H)  $y$  là từ 0 đến 5,

trong đó ít nhất một  $x$  và  $y$  không phải là 0.

Nó được hiểu rằng công thức (III) không nhằm đề nghị rằng kháng thể, nhóm thế Gal, và nhóm thế Gal-Sia được kết nối theo cách giống như chuỗi. Đúng hơn là, khi các nhóm thế như vậy có mặt, kháng thể được kết nối trực tiếp với từng nhóm thế. Ví dụ, polypeptit liên kết có công thức (III) trong đó x là 1 và y là 2 có thể có sự sắp xếp được thể hiện dưới đây:



Công thức (III)

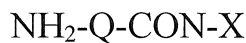
Nhóm thế CON trong công thức (III) và các thành phần như được được mô tả trong đó có liên quan đến công thức (I) đối với các nhóm chức phản ứng lại kích thích.

Theo một phương án, Q là NH. Theo phương án khác, Q là O.

Theo một phương án,  $x$  là 0.

Kháng thể Ab có công thức (III) có thể là bất kỳ kháng thể phù hợp như được mô tả trong tài liệu này.

Theo một khía cạnh, có một phương pháp điều chế polypeptit liên kết có công thức (III) được đề xuất, phương pháp này gồm phản ứng của nhóm chức phản ứng lại kích thích có công thức (I):

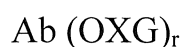


Công thức (I),

trong đó:

- A) Q là NH hoặc O;
- B) CON là nhóm chức kết nối; và
- C) X là tác nhân điều trị hoặc chẩn đoán bệnh như được xác định ở đây,

với kháng thể được biến đổi có công thức (II)

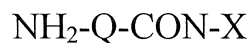


Công thức (II)

trong đó:

- A) OXG là polysacarit được oxy hóa; và
- B) r được chọn từ 0 đến 4;

Theo một khía cạnh, có một phương pháp điều chế polypeptit liên kết có công thức (III), phương pháp này gồm phản ứng của nhóm chức phản ứng lại kích thích có công thức (I):

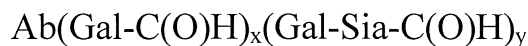


Công thức (I),

trong đó:

- A) Q là NH hoặc O;
- B) CON là nhóm chức kết nối; và
- C) X là tác nhân điều trị hoặc chẩn đoán bệnh như được xác định ở đây,

với kháng thể được sửa đổi có công thức (IIa)



Formula (IIa),

trong đó:

- A) Ab là kháng thể như được mô tả trong tài liệu này;
  - B) Gal là thành phần có nguồn gốc từ galactose;
  - C) Sia là thành phần có nguồn gốc từ axit sialic;
  - D) x là từ 0 đến 5; và
  - E) y là từ 0 đến 5,
- trong đó ít nhất một x và y không phải là 0.

#### IX. Các phương pháp xử lý các kháng thể bị biến đổi

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị hoặc chẩn đoán bệnh nhân trong đó bao gồm dùng một lượng hiệu quả polypeptit liên kết được bộc lộ ở đây. Theo các khía cạnh được ưu tiên theo sáng chế là đề xuất các bộ kit và các phương pháp để chẩn đoán và/hoặc điều trị các rối loạn, ví dụ như, các rối loạn ung thư ở đối tượng là động vật có vú cần sự điều trị như vậy. Tốt hơn là, đối tượng này là con người.

Các polypeptit liên kết theo sáng chế là rất hữu ích trong nhiều ứng dụng khác nhau. Ví dụ, theo một phương án, các polypeptit liên kết là hữu ích cho việc làm giảm hoặc loại bỏ các tế bào mang epitop được công nhận bởi miễn liên kết của polypeptit liên kết. Theo phương án khác, các polypeptit liên kết có hiệu quả trong việc làm giảm nồng độ hoặc loại bỏ kháng nguyên hòa tan trong sự tuần hoàn. Theo một phương án, các polypeptit liên kết có thể làm giảm kích thước khối u, ức chế sự tăng trưởng của khối u và/hoặc kéo dài thời gian sống của động vật mang khối u. Do đó, sáng chế này cũng đề cập đến phương pháp điều trị các khối u ở người hoặc động vật khác bằng cách dùng một lượng kháng thể được biến đổi không độc hại, hiệu quả cho người hoặc động vật như vậy. Một chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ có thể, bằng thử nghiệm thông thường, xác định như thế nào là một lượng polypeptit liên kết được biến đổi không độc hại, hiệu quả sẽ được dành cho mục đích điều trị các khối u ác tính. Ví dụ, một lượng có hoạt tính trị liệu của

kháng thể hoặc các đoạn của nó được biến đổi có thể thay đổi theo các yếu tố như giai đoạn bệnh (ví dụ, giai đoạn I so với giai đoạn IV), độ tuổi, giới tính, các biến chứng y khoa (ví dụ, các tình trạng hoặc các bệnh suy giảm miễn dịch) và trọng lượng của đối tượng, và khả năng của kháng thể được biến đổi để gây ra phản ứng mong muốn ở đối tượng. Phác đồ liều lượng có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng điều trị tối ưu. Ví dụ, một số liều được chia ra có thể được dùng hàng ngày, hoặc có thể giảm liều lượng tương ứng như được chỉ ra bởi các nhu cầu cấp bách của tình hình điều trị.

Nhìn chung, các dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị dự phòng hoặc trị liệu khối u bất kỳ bao gồm chất đánh dấu kháng nguyên mà cho phép nhắm mục tiêu là các tế bào ung thư bằng kháng thể được biến đổi.

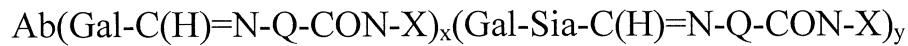
#### X. Phương pháp sử dụng các Kháng thể hoặc các đoạn của chúng được biến đổi

Phương pháp điều chế và sử dụng các polypeptit liên kết theo sáng chế cho đối tượng được biết đến rộng rãi hoặc dễ dàng được xác định bởi các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật. Cách sử dụng các polypeptit liên kết theo sáng chế có thể là đường uống, đường tiêm, đường hô hấp hoặc bôi tại chỗ. Thuật ngữ đường tiêm như được sử dụng ở đây bao gồm tiêm tĩnh mạch, động mạch, màng bụng, tiêm bắp, tiêm dưới da, trực tràng hoặc âm đạo. Các hình thức tiêm tĩnh mạch, động mạch, tiêm dưới da và tiêm bắp tiêm thường được ưu tiên hơn. Trong khi tất cả các hình thức tiêm này đã được dự tính rõ ràng như là trong phạm vi của sáng chế, dạng sử dụng sẽ là dung dịch để tiêm, cụ thể là tiêm tĩnh mạch hoặc động mạch hoặc nhỏ giọt. Thông thường, dược phẩm phù hợp để tiêm có thể bao gồm chất đệm (ví dụ như chất đệm axetat, phosphat hoặc citrat), chất hoạt động bề mặt (ví dụ polysorbat), tùy ý tác nhân ổn định (ví dụ albumin của người), v.v. Tuy nhiên, trong các phương pháp khác phù hợp với sáng chế, các kháng thể được biến đổi có thể được



chuyển trực tiếp đến các vị trí tập trung nhiều tế bào xấu do đó làm tăng sự tiếp xúc của các mô bệnh với tác nhân trị liệu.

Theo một phương án, polypeptit liên kết được sử dụng là polypeptit liên kết có công thức (III):



Công thức (III),

trong đó:

- A) Ab là kháng thể như được xác định ở đây;
- B) Q là NH hoặc O;
- C) CON là nhóm chức nối như được định nghĩa ở đây; và
- D) X là tác nhân điều trị hoặc chẩn đoán bệnh như được xác định ở đây;
- E) Gal là thành phần có nguồn gốc từ galactose;
- F) Sia là thành phần có nguồn gốc từ axit sialic;
- G) x là từ 0 đến 5; và
- H) y là từ 0 đến 5,

trong đó ít nhất một x và y không phải là 0.

Các dược phẩm dùng để tiêm bao gồm các dung dịch nước hoặc không chứa nước vô trùng, huyền phù, và nhũ tương. Các ví dụ về các dung môi không chứa nước là propylen glycol, polyetylen glycol, các dầu thực vật như dầu ô liu, và các este hữu cơ có thể tiêm được như etyl oleat. Các chất mang dạng nước bao gồm nước, các dung dịch cồn/dạng nước, nhũ tương hoặc huyền phù, bao gồm các dung dịch nước muối và đậm. Trong các dược phẩm và phương pháp theo sáng chế, các chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn, dung dịch đậm phosphat với nồng độ từ 0,01 đến 0,1 M và tốt hơn là 0,05M hoặc nước muối 0,8%. Các tá dược lỏng dùng cho tiêm phổ biến khác bao gồm dung dịch natri phosphat, dextroza của Ringer, dextroza và natri clorua, Lactated của Ringer, hoặc các loại dầu ổn định. Các tá dược lỏng dùng cho tiêm tĩnh mạch bao gồm các chất bổ sung chất lỏng và chất

dinh dưỡng, các chất bổ sung điện giải, như các chất bổ sung trên cơ sở dextroza của Ringer, và chất tương tự. Các chất bảo quản và các phụ gia khác cũng có thể có mặt, ví dụ như, các tác nhân kháng vi sinh vật, các tác nhân chống oxy hóa, các tác nhân chelat hoá, và các khí trơ và chất tương tự. Cụ thể hơn, các dược phẩm phù hợp dùng để tiêm bao gồm các dung dịch dạng nước vô trùng (có nước hoà tan) hoặc các dạng huyền phù và các dạng bột vô trùng để pha chế đột xuất các dung dịch hoặc các huyền phù có thể tiêm được vô trùng. Trong các trường hợp như vậy, dược phẩm phải là vô trùng và nên là lỏng trong phạm vi mà khả năng tiêm được dễ dàng tồn tại. Nó phải là ổn định dưới các điều kiện sản xuất và lưu trữ và sẽ tốt hơn là được bảo quản chống lại hoạt động gây ô nhiễm của vi sinh vật, như vi khuẩn và nấm. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerin, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng, và chất tương tự), và các hỗn hợp phù hợp của chúng. Tính lưu động phù hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng lớp phủ như lexithin, bằng cách duy trì kích thước hạt yêu cầu trong trường hợp huyền phù và bằng cách sử dụng các chất hoạt động bề mặt.

Việc ngăn ngừa hoạt động của các vi sinh vật có thể đạt được bằng các tác nhân kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví dụ, các paraben, clorobutanol, phenol, axit ascorbic, thimerosal và chất tương tự. Trong nhiều trường hợp, nó sẽ là tốt hơn để bao gồm các tác nhân đẳng trương, ví dụ, các đường, các rượu đa chức, như mannitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong dược phẩm. Sự hấp thu kéo dài của các dược phẩm có thể tiêm được có thể xảy ra bằng cách bao gồm trong chế phẩm tác nhân mà làm chậm sự hấp thụ, ví dụ, nhôm monostearat và gelatin.

Trong bất kỳ trường hợp nào, các dung dịch có thể tiêm được vô trùng có thể được pha chế bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính (ví dụ, polypeptit liên kết được biến đổi bởi chính nó hoặc kết hợp với các tác nhân hoạt tính khác) ở lượng yêu cầu trong dung môi phù hợp với một hoặc sự kết hợp của

các thành phần được liệt kê ở đây, theo yêu cầu, tiếp theo là lọc khử trùng. Nói chung, các huyền phù được pha chế bằng cách kết hợp hợp chất hoạt tính vào tá dược vô trùng, mà chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần khác theo yêu cầu từ các thành phần được liệt kê ở trên. Trong trường hợp của các bột vô trùng để pha chế các dung dịch có thể tiêm được vô trùng, các phương pháp pha chế được ưu tiên là sấy chân không và đông khô, mà thu được bột của thành phần hoạt tính cộng với bất kỳ thành phần mong muốn bổ sung từ dung dịch được lọc vô trùng trước đây của nó. Các dược phẩm dùng để tiêm được xử lý, rót đầy vào các đồ chứa như ống, túi, chai, ống tiêm hoặc lọ, và được gắn kín dưới các điều kiện vô trùng theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ngoài ra, các dược phẩm có thể được đóng gói và bán ở dạng bộ kit như được mô tả trong U.S.S.N. 09/259.337 và U.S.S.N. 09/259.338. Các mặt hàng như vậy của nhà sản xuất sẽ tốt hơn là có nhãn quảng cáo cài trong thùng hàng chỉ ra rằng các dược phẩm liên quan là rất hữu ích cho việc điều trị đối tượng bị các rối loạn dẫn đến tự miễn hoặc ung thư.

Liệu có hiệu quả của các dược phẩm theo sáng chế, để điều trị các tình trạng bệnh được mô tả ở trên thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm phương thức sử dụng, vị trí mục tiêu, trạng thái sinh lý của bệnh nhân, cho dù bệnh nhân là người hoặc động vật, các thuốc khác được sử dụng, và việc điều trị là dự phòng hoặc trị liệu. Thông thường, bệnh nhân là người nhưng các loại động vật có vú không phải người bao gồm các loại động vật có vú biến đổi gen cũng có thể được điều trị. Liệu điều trị có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật để tối ưu hóa sự an toàn và hiệu quả.

Đối với miễn dịch thụ động với polypeptit liên kết, liều lượng có thể dao động, ví dụ, trong khoảng từ 0,0001 đến 100 mg/kg, và thường là trong khoảng từ 0,01 đến 5 mg/kg (ví dụ, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg 0,75 mg/kg, 1mg/kg, 2 mg/kg, v.v.), trọng lượng cơ thể vật chủ. Ví dụ liều lượng

có thể là 1 mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 10 mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc trong khoảng từ 1 đến 10 mg/kg, tốt hơn là ít nhất 1 mg/kg. Liều trung bình trong các khoảng ở trên cũng được nhằm mục đích là trong phạm vi của sáng chế. Các đối tượng có thể được dùng các liều như vậy hàng ngày, vào các ngày khác, hàng tuần hoặc theo bất kỳ lịch trình khác được xác định bằng cách phân tích thực nghiệm. Phương pháp điều trị điển hình đòi hỏi việc dùng nhiều liều trong một thời gian dài, ví dụ, ít nhất sáu tháng. Các phác đồ điều trị điển hình bổ sung đòi hỏi dùng một lần mỗi hai tuần hoặc một lần mỗi tháng hoặc một lần mỗi 3 đến 6 tháng. Lịch trình liều lượng điển hình bao gồm từ 1 đến 10 mg/kg hoặc 15 mg/kg vào những ngày liên tiếp, 30 mg/kg vào những ngày khác hoặc 60 mg/kg hàng tuần. Trong một số phương pháp, hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có các đặc tính liên kết khác nhau được dùng đồng thời, trong trường hợp đó liều lượng của mỗi kháng thể được dùng nằm trong phạm vi được chỉ định.

Các polypeptit liên kết theo sáng chế có thể được dùng trong nhiều trường hợp. Khoảng thời gian giữa các liều đơn có thể là hàng tuần, hàng tháng hoặc hàng năm. Khoảng thời gian cũng có thể là không đều như được chỉ ra bằng cách đo nồng độ trong máu của polypeptit liên kết được biến đổi hoặc kháng nguyên ở bệnh nhân. Trong một số phương pháp, liều lượng được điều chỉnh để đạt được nồng độ polypeptit liên kết được biến đổi trong huyết tương nằm trong khoảng từ 1 đến 1000 mg/ml và trong một số phương pháp nồng độ này nằm trong khoảng từ 25 đến 300 mg/ml. Ngoài ra, các polypeptit liên kết có thể được dùng làm dược phẩm giải phóng lâu dài, trong trường hợp đó việc dùng ít thường xuyên hơn là cần thiết. Đối với các kháng thể, liều lượng và tần suất thay đổi tùy theo thời gian bán hủy của kháng thể ở bệnh nhân. Nói chung, các kháng thể ở người cho thấy thời gian bán hủy dài nhất, tiếp theo là các kháng thể khảm và các kháng thể không phải ở người.

Liều lượng và tần suất dùng có thể thay đổi tùy thuộc vào việc điều trị là dự phòng hoặc trị liệu. Trong các ứng dụng dự phòng, các dược phẩm có

chứa các kháng thể theo sáng chế hoặc hỗn hợp của nó được dùng cho bệnh nhân chưa có tình trạng bệnh để tăng cường sức đề kháng của bệnh nhân. Lượng như vậy được xác định là "liều hữu hiệu để phòng ngừa". Trong việc sử dụng này, các lượng chính xác lại phụ thuộc vào tình trạng sức khỏe của bệnh nhân và khả năng miễn dịch nói chung, nhưng thường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 25 mg mỗi liều, nhất là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 2,5 mg mỗi liều. Liều lượng tương đối thấp được dùng ở các khoảng thời gian tương đối không thường xuyên trong một thời gian dài. Một số bệnh nhân tiếp tục được điều trị trong suốt quãng đời còn lại của họ. Trong các ứng dụng điều trị, liều lượng tương đối cao (ví dụ, nằm trong khoảng từ 1 đến 400 mg/kg kháng thể mỗi liều, với các liều lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 25 mg được sử dụng nhiều hơn đối với các liên hợp miễn dịch phóng xạ và các liều cao hơn đối với các kháng thể được biến đổi độc tố tế bào thuốc) ở các khoảng thời gian tương đối ngắn đôi khi được yêu cầu cho đến khi sự tiến triển của bệnh được giảm bớt hoặc chấm dứt, và tốt hơn là cho đến khi bệnh nhân cho thấy sự cải thiện một phần hoặc hoàn toàn các triệu chứng của bệnh. Sau đó, bệnh nhân có thể được dùng chế độ dự phòng.

Các polypeptit liên kết theo sáng chế có thể tùy ý được dùng kết hợp với các tác nhân khác mà có hiệu quả trong điều trị các rối loạn hoặc tình trạng cần điều trị (ví dụ, phòng bệnh hoặc chữa bệnh). Các liều lượng điều trị đơn hiệu quả (tức là, các lượng có hiệu quả trị liệu) của các kháng thể được sửa đổi được dán nhãn 90Y theo sáng chế nằm trong khoảng giữa 5 và 75 mCi, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng giữa 10 và khoảng 40 mCi. Các liều lượng điều trị đơn hiệu quả không xâm lấn tủy của các kháng thể được biến đổi 131I nằm trong khoảng giữa 5 và 70 mCi, tốt hơn là nằm trong khoảng giữa 5 và 40 mCi. Các liều lượng điều trị đơn hiệu quả xâm lấn (tức là, có thể yêu cầu ghép tủy xương tự thân) của các kháng thể được dán nhãn 131I nằm trong khoảng giữa 30 và 600 mCi, tốt hơn là nằm trong khoảng giữa 50 và thấp hơn 500 mCi. Kết hợp với kháng thể khảm, do thời gian bán hủy tuần

hoàn lâu hơn so với các kháng thể chuột, các liều lượng điều trị đơn hiệu quả không xâm lấn tủy của các kháng thể khảm dán nhãn iot-131 nằm khoảng từ giữa 5 và 40 mCi, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 30 mCi. Tiêu chí hình ảnh cho, ví dụ như, nhãn  $^{111}\text{In}$ , thường nhorr hơn khoảng 5 mCi.

Trong khi các polypeptit liên kết có thể được dùng như được mô tả ngay ở trên, cần phải nhấn mạnh rằng theo các phương án khác, các polypeptit liên kết có thể được dùng cho các bệnh nhân khỏe mạnh như một liệu pháp đầu tiên. Theo các phương án như vậy, các polypeptit liên kết có thể được dùng cho các bệnh nhân có dự trữ tủy đỏ bình thường hoặc trung bình và/hoặc cho các bệnh nhân mà chưa trải qua, và đang không trải qua các phương pháp điều trị khác. Như được sử dụng trong tài liệu này, việc sử dụng các kháng thể được sửa đổi hoặc các đoạn của nó cùng hoặc kết hợp với liệu pháp bổ sung có nghĩa là dùng hoặc áp dụng liệu pháp và các kháng thể theo sáng chế tuần tự, cùng lúc, cùng tồn tại, đồng thời, đi kèm hoặc đồng thời. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ đánh giá cao việc dùng hoặc áp dụng các thành phần khác nhau của phác đồ điều trị kết hợp có thể được điều chỉnh để nâng cao hiệu quả điều trị tổng thể. Ví dụ, các tác nhân hóa trị liệu có thể được dùng trong các đợt điều trị tiêu chuẩn, được biết đến rộng rãi theo sau trong vòng vài tuần bằng các liên hợp miễn dịch phóng xạ theo sáng chế. Ngược lại, các polypeptit liên kết được kết hợp độc tố tế bào có thể được tiêm tĩnh mạch sau đó là bức xạ chùm tia bên ngoài khu trú khối u. Theo các phương án khác nữa, polypeptit kết được biến đổi có thể được dùng đồng thời với một hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu được lựa chọn trong một lần thăm khám. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ như một bác sĩ chuyên khoa ung thư có kinh nghiệm) sẽ dễ dàng có thể nhận ra các phác đồ điều trị kết hợp có hiệu quả mà không cần thử nghiệm quá mức dựa trên liệu pháp bổ sung được lựa chọn và nội dung bản mô tả của sáng chế.

Về vấn đề này, nó sẽ được đánh giá cao rằng sự kết hợp của các polypeptit liên kết và tác nhân hóa trị liệu có thể được dùng theo thứ tự bất kỳ

và trong khoảng thời gian bất kỳ mà mang lại lợi ích điều trị cho bệnh nhân. Đó là, tác nhân hóa trị liệu và các polypeptit liên kết có thể được dùng theo thứ tự bất kỳ hoặc đồng thời. Theo các phương án được lựa chọn, các polypeptit liên kết theo sáng chế sẽ được dùng cho các bệnh nhân mà đã trải qua hóa trị liệu trước đó. Theo các phương án khác nữa, các polypeptit liên kết và điều trị hóa trị liệu về cơ bản sẽ được dùng đồng thời hoặc song song. Ví dụ, bệnh nhân có thể được cung cấp các polypeptit liên kết trong khi trải qua đợt hóa trị. Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể được sửa đổi sẽ được dùng trong vòng một năm đối với bất kỳ tác nhân hoặc điều trị hóa trị liệu nào. Theo các phương án được ưu tiên khác, các polypeptit liên kết sẽ được tiêm trong vòng 10, 8, 6, 4, hoặc 2 tháng đối với bất kỳ tác nhân hoặc điều trị hóa trị liệu nào. Vẫn theo các phương án được ưu tiên khác, polypeptit liên kết sẽ được dùng trong vòng 4, 3, 2 hoặc 1 tuần đối với bất kỳ tác nhân hoặc điều trị hóa trị liệu nào. Theo các phương án khác nữa, các polypeptit liên kết sẽ được dùng trong vòng 5, 4, 3, 2 hoặc 1 ngày đối với tác nhân hoặc điều trị hóa trị liệu được lựa chọn. Nó sẽ còn được đánh giá cao rằng hai tác nhân hoặc phương pháp điều trị có thể được dùng cho bệnh nhân trong vòng một vài giờ hoặc một vài phút (tức là, về cơ bản là đồng thời).

Nó sẽ còn được đánh giá cao rằng các polypeptit liên kết theo sáng chế có thể được sử dụng cùng hoặc kết hợp với bất kỳ tác nhân hóa trị liệu nào hoặc các tác nhân (ví dụ, để cung cấp phác đồ điều trị kết hợp) mà loại bỏ, làm giảm, ức chế hoặc kiểm soát sự tăng trưởng của tế bào ung thư *in vivo*. Các tác nhân hoá hoá trị liệu điển hình mà phù hợp với sáng chế bao gồm các tác nhân alkyl hóa, các vinca alkaloid (ví dụ, vincristin và vinblastin), procarbazine, metotrexat và prednison. Sự kết hợp bốn loại thuốc MOPP (mechlorethamine (nitrogen mustard), vincristin (Oncovin), procarbazine và prednison) là rất hiệu quả trong điều trị nhiều loại ung thư lympho khác nhau và bao gồm một phương án được ưu tiên theo sáng chế. Ở các bệnh nhân kháng MOPP, các sự kết hợp ABVD (ví dụ, adriamycin, bleomycin,

vinblastin và dacarbazin), ChIVPP (CHlorambuxil, vinblastin, procarbazin và prednison), CABS (lomustin, doxorubixin, bleomycin và streptozotocin), MOPP cộng với ABVD, MOPP cộng với ABV (doxorubixin, bleomycin và vinblastin) hoặc BCVPP (carmustin, xyclophosphamit, vinblastin, procarbazin và prednison) có thể được sử dụng. Arnold S. Freedman và Lee M. Nadler, Malignant Lymphomas, in HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 1774-1788 (Kurt J. Isselbacher et al, eds., 13th ed. 1994) và V.T. DeVita et al, (1997) và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó đối với liều lượng dùng và lên lịch tiêu chuẩn. Các liệu pháp này có thể được sử dụng không thay đổi, hoặc thay đổi khi cần thiết đối với bệnh nhân cụ thể, kết hợp với một hoặc nhiều polypeptit liên kết theo sáng chế như được mô tả trong tài liệu này.

Các phác đồ bổ sung hữu ích trong phạm vi của sáng chế bao gồm sử dụng các tác nhân alkyl hóa đơn như xyclophosphamit hoặc clorambuxil, hoặc các sự kết hợp như CVP (xyclophosphamit, vincristin và prednison), CHOP (CVP và doxorubixin), C-MOPP (xyclophosphamit, vincristin, prednison và procarbazin), CAP-BOP (CHOP cộng với procarbazin và bleomycin), m-BACOD (CHOP cộng với metotrexat, bleomycin và leucovorin), ProMACE-MOPP (prednison, metotrexat, doxorubixin, xyclophosphamit, etoposít và leucovorin cộng với MOPP tiêu chuẩn), ProMACE-CytaBOM (prednison, doxorubixin, xyclophosphamit, etoposít, xytarabin, bleomycin, vincristin, metotrexat và leucovorin) và MACOP-B (metotrexat, doxorubixin, xyclophosphamit, vincristin, prednison liều cố định, bleomycin và leucovorin). Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ dễ dàng có thể xác định các liều lượng tiêu chuẩn và lên lịch cho mỗi trong số các phác đồ điều trị này. CHOP cũng đã được kết hợp với bleomycin, metotrexat, procarbazin, nitrogen mustard, cytosin arabinosít và etoposít. Các tác nhân hoá trị liệu tương thích khác bao gồm, nhưng không giới hạn, 2-clorodeoxyadenosin (2-CDA), 2'-deoxycoformycin và fludarabin.



Đối với các bệnh nhân có mức NHL trung bình và cao, người không đạt được sự thuyên giảm hoặc tái phát, liệu pháp cứu hộ được sử dụng. Các liệu pháp cứu hộ sử dụng các loại thuốc như cytosin arabinosit, carboplatin, cisplatin, etoposit và ifosfamid riêng lẻ hoặc kết hợp. Ở các dạng tái phát hoặc nặng hơn của các rối loạn ung thư nhất định, các giao thức sau đây thường được sử dụng: IMVP-16 (ifosfamid, metotrexat và etoposit), MIME (methyl-gag, ifosfamid, metotrexat và etoposit), DHAP (dexamethason, xytarabin liều cao và cisplatin), ESHAP (etoposit, methylpredisolon, HD xytarabin, cisplatin), CEPP(B) (xyclophosphamid, etoposit, procarbazin, prednison và bleomycin) và CAMP (lomustin, mitoxantron, xytarabin và prednison) mỗi loại với tỷ lệ liều lượng và lịch trình dùng thuốc được biết đến rộng rãi.

Lượng tác nhân hoá trị liệu được sử dụng kết hợp với các kháng thể được biến đổi theo sáng chế có thể thay đổi theo đối tượng hoặc có thể được dùng theo cách được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem ví dụ, Bruce A. Chabner et al, Antineoplastic Agents, trong GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THEREPEUTICS 1233-1287 (Joel Hardman G. et al., eds., 9th ed. 1996).

Như đã thảo luận trước đó, các polypeptit liên kết theo sáng chế, các đoạn phản ứng miễn dịch hoặc các tái tổ hợp của chúng có thể được dùng với lượng được dùng để điều trị các rối loạn ở động vật có vú in vivo. Về vấn đề này, nó sẽ được đánh giá là các polypeptit liên kết theo sáng chế sẽ được lập công thức để tạo điều kiện thuận lợi cho việc dùng và thúc đẩy sự ổn định của tác nhân hoạt động.

Tốt hơn là, các dược phẩm theo sáng chế bao gồm chất mang được dùng, không độc hại, tiết trùng như nước muối sinh lý, các chất đệm không độc hại, các chất bảo quản và các chất tương tự. Đối với các mục đích của sáng chế, một lượng được dùng của polypeptit liên kết được sửa đổi, đoạn phản ứng miễn dịch hoặc tái tổ hợp của chúng, được liên hợp hoặc không được liên hợp với tác nhân trị liệu, sẽ được giữ có nghĩa là một lượng vừa đủ

để đạt được liên kết có hiệu quả với kháng nguyên và để đạt được lợi ích, ví dụ, để cải thiện các triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn hoặc để phát hiện chất hoặc tế bào. Trong trường hợp của các tế bào khối u, polypeptit liên kết được biến đổi tốt hơn là sẽ có khả năng tương tác với các kháng nguyên phản ứng miễn dịch được chọn trên các tế bào ung thư hoặc phản ứng miễn dịch và tạo ra sự gia tăng cái chết của các tế bào đó. Tất nhiên, các dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng một hoặc nhiều liều để cung cấp một lượng dược dụng của polypeptit liên kết được biến đổi.

Để phù hợp với phạm vi của sáng chế, các polypeptit liên kết theo sáng chế có thể được dùng cho người hoặc động vật khác theo các phương pháp điều trị đã nói trên với một lượng vừa đủ để tạo ra hiệu quả điều trị hoặc dự phòng. Các polypeptit liên kết theo sáng chế có thể được dùng cho người hoặc động vật khác như vậy ở dạng bào chế thông thường được pha chế bằng cách kết hợp các kháng thể theo sáng chế với chất mang hoặc chất pha loãng được dụng thông thường theo các kỹ thuật đã được biết đến. Nó sẽ được công nhận bởi một chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật là dạng và đặc tính của chất mang hoặc chất pha loãng được dụng được quyết định bởi số lượng thành phần hoạt chất mà nó được kết hợp, cách dùng thuốc và các biến số được biết đến rộng rãi khác. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ đánh giá cao hơn nữa dung dịch hỗn hợp gồm một hoặc nhiều loại polypeptit liên kết được mô tả trong sáng chế có thể chứng tỏ là đặc biệt hiệu quả.

#### V. Biểu hiện của các polypeptit liên kết

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các polynucleotit mã hóa các polypeptit liên kết được bộc lộ ở đây. Phương pháp tạo ra polypeptit liên kết bao gồm biểu hiện các polynucleotit này cũng được đề xuất.

Các polynucleotit mã hóa các polypeptit liên kết được bộc ở đây thường được chèn vào vector biểu hiện để đưa vào tế bào vật chủ mà có thể được sử dụng để sản xuất số lượng mong muốn các kháng thể được yêu cầu bảo hộ, hoặc các đoạn của chúng. Do đó, theo các khía cạnh nhất định, sáng

chế đề xuất các vector biểu gồm các polynucleotit được bộ lộ ở đây và các tế bào vật chủ bao gồm các vector và các polynucleotit này.

Thuật ngữ "vector" hay "vector biểu hiện" được sử dụng ở đây cho các mục đích của bản mô tả và các yêu cầu bảo hộ của sáng chế, có nghĩa là các vector được sử dụng theo sáng chế như một phương tiện để đưa vào và biểu hiện gen mong muốn trong tế bào. Như đã được các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật biết đến, các vector như vậy có thể dễ dàng được chọn từ nhóm gồm các plasmit, các thể thực khuẩn, các virus và các retrovirus. Nói chung, các vector tương thích với sáng chế sẽ bao gồm chất đánh dấu chọn lọc, các vị trí hạn chế thích hợp để tạo điều kiện nhân bản của gen mong muốn và khả năng đi vào và/hoặc tái tạo trong các tế bào nhân chuẩn hoặc nhân sơ.

Nhiều hệ thống vector biểu hiện có thể được sử dụng cho các mục đích của sáng chế. Ví dụ, một lớp vector sử dụng các yếu tố ADN có nguồn gốc từ vi rút động vật như vi rút u nhú ở bò, vi rút polyoma, vi rút Adeno, virus Vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV hoặc MOMLV) hoặc virus SV40. Các yếu tố liên quan đến việc sử dụng các hệ thống polycistronic với các vị trí liên kết ribosome nội bộ. Ngoài ra, các tế bào đã tích hợp các ADN vào các nhiễm sắc thể của chúng có thể được lựa chọn bằng cách đưa một hoặc nhiều chất đánh dấu mà cho phép chọn lọc các tế bào vật chủ chuyển nhiễm. Chất đánh dấu này có thể cung cấp thể nguyên dưỡng cho vật chủ dinh dưỡng thụ động, kháng chất diệt khuẩn (ví dụ, thuốc kháng sinh) hoặc kháng các kim loại nặng như đồng. Chất đánh dấu có thể được chọn có thể liên kết trực tiếp với các trình tự ADN được biểu hiện, hoặc đưa vào cùng tế bào bởi cùng sự biến đổi. Các yếu tố khác cũng có thể cần thiết cho sự tổng hợp tối ưu của mRNA. Các yếu tố này có thể bao gồm các trình tự tín hiệu, các tín hiệu nối, cũng như các yếu tố thúc đẩy, các yếu tố tăng cường, và các tín hiệu kết thúc phiên mã. Theo các phương án đặc biệt ưu tiên, các gen biến vùng biến đổi nhân bản vô tính được đưa vào vector biểu hiện cùng với các gen

vùng không đối mạch nặng và nhẹ (tốt hơn là ở người) tổng hợp như đã trình bày ở trên.

Theo các phương án ưu tiên khác, các polypeptit liên kết theo sáng chế có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng các cấu trúc polycistronic. Trong các hệ thống biểu hiện như vậy, nhiều sản phẩm gen quan tâm như các mạch nặng và nhẹ của các kháng thể có thể được tạo ra từ cấu trúc polycistronic đơn. Các hệ thống này sử dụng thuận lợi vị trí đi vào ribosome nội bộ (IRES) để cung cấp mức độ tương đối cao của các polypeptit theo sáng chế trong các tế bào vật chủ nhân chuẩn. Các trình tự IRES tương thích được bộc lộ trong U.S. Pat. No 6.193.980. Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ đánh giá cao là các hệ thống biểu hiện như vậy có thể được sử dụng để tạo ra có hiệu quả đầy đủ các polypeptit theo sáng chế.

Tổng quát hơn, một khi vectơ hoặc chuỗi ADN mã hóa kháng thể, hoặc đoạn của nó, đã được pha chế, vectơ biểu hiện này có thể được đưa vào tế bào vật chủ thích hợp. Đó là, các tế bào vật chủ có thể được biến đổi. Việc đưa plasmit vào tế bào vật chủ có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật khác nhau được biết đến rộng rãi với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật. Các kỹ thuật này bao gồm, nhưng không giới hạn, chuyển nhiễm (bao gồm cả điện di và công nghệ điện di), hợp nhất tế bào nguyên sinh, kết tủa canxi phosphat, hợp nhất tế bào với ADN có vỏ, vi tiêm, và nhiễm virus còn nguyên vẹn. Xem, Ridgway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez và Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Tốt nhất là, việc đưa plasmit vào vật chủ là thông qua công nghệ điện di. Các tế bào biến đổi được phát triển trong các điều kiện phù hợp cho việc tạo ra các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng, và xét nghiệm đối với sự tổng hợp protein chuỗi nặng và/hoặc nhẹ. Các kỹ thuật xét nghiệm điển hình bao gồm xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), xét nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), hoặc phân tích phân loại tế bào hoạt hoá huỳnh quang (FACS), hoá mô miễn dịch và xét nghiệm tương tự.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chuyển đổi" sẽ được sử dụng theo nghĩa rộng để đề cập đến việc đưa ADN vào tế bào vật chủ nhận mà thay đổi kiểu gen và do đó dẫn đến sự thay đổi trong tế bào nhận.

Tương tự, "các tế bào vật chủ" đề cập đến các tế bào đã được biến đổi với các vector được cấu trúc bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp và mã hóa ít nhất một gen khác loại. Trong việc mô tả các quy trình để tách các polypeptit từ các vật chủ tái tổ hợp, các thuật ngữ "tế bào" và "nuôi cấy tế bào" được sử dụng thay thế cho nhau để biểu thị nguồn gốc của kháng thể trừ khi được quy định khác đi. Nói cách khác, sự thu hồi polypeptit từ "các tế bào" có thể có nghĩa hoặc từ ly tâm lắng nhanh toàn bộ các tế bào, hoặc từ nuôi cấy tế bào có chứa cả môi trường và các tế bào lơ lửng.

Theo một phương án, dòng tế bào vật chủ được sử dụng để biểu hiện kháng thể có nguồn gốc từ động vật có vú; các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định cụ thể các dòng tế bào vật chủ mà phù hợp nhất cho việc tạo ra gen mong muốn được biểu hiện trong đó. Các dòng tế bào vật chủ điển hình bao gồm, nhưng không giới hạn, DG44 và DUXB11 (các dòng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc, DHFR âm), HELA (dòng tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung ở người), CVI (dòng tế bào thận ở khỉ), COS (dẫn xuất của CVI với kháng nguyên SV40 T), R1610 (nguyên bào sợi chuột đồng Trung Quốc) BALBC/3T3 (nguyên bào sợi ở chuột), HAK (dòng tế bào thận ở chuột), SP2/O (dòng tế bào u tủy ở chuột), BFA-1c1BPT (các tế bào nội mô của bò), Raji (các tế bào lympho ở người), 293 (dòng tế bào thận ở người). Theo một phương án, dòng tế bào này tạo ra glycosyl hóa bị thay đổi, ví dụ như, afucosyl hoá, của kháng thể được biểu hiện từ đó (ví dụ, các dòng tế bào PER.C6.RTM. (Crucell) hoặc FUT8-knock-out CHO (Potelligent.RTM. Cells) (Biowa, Princeton, N.J.)). Theo một phương án, các tế bào NS0 có thể được sử dụng. Các tế bào CHO được đặc biệt ưu tiên. Các dòng tế bào vật chủ thường có sẵn từ các dịch vụ thương mại, American Tissue Culture Collection hoặc từ tài liệu đã được công bố.

Việc tạo ra *in vitro* cho phép mở rộng quy mô để cung cấp một lượng lớn các polypeptit mong muốn. Các kỹ thuật đối với nuôi cấy tế bào động vật có vú trong các điều kiện nuôi cấy mô được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm nuôi cấy huyền phù đồng nhất, ví dụ như trong lò phản ứng nâng khí nén hoặc trong lò phản ứng khuấy liên tục, hoặc nuôi cấy tế bào cố định hoặc bầy, ví dụ như trong các sợi rỗng, viên nang siêu nhỏ, trên các vi hạt agarosa hoặc các hộp gôm. Nếu cần thiết và/hoặc mong muốn, các dung dịch của các polypeptit có thể được tinh chế bằng các phương pháp sắc ký thông thường, ví dụ lọc gel, sắc ký trao đổi ion, sắc ký trên DEAE-xenluloza và/hoặc sắc ký (miễn dịch) ái lực.

Các gen mã hóa các polypeptit liên kết theo các sáng chế cũng có thể là các tế bào không phải của động vật có vú được biểu hiện như các tế bào vi khuẩn hoặc nấm men hay thực vật. Về vấn đề này, nó sẽ được đánh giá cao là vi sinh vật đơn bào không phải của động vật có vú như vi khuẩn cũng có thể được chuyển đổi; tức là chúng có khả năng phát triển trong các môi trường nuôi cấy hoặc quá trình lên men. Vi khuẩn, mà dễ bị biến đổi, bao gồm các loại của họ enterobacteriaceae, như các chủng *Escherichia coli* và *Salmonella*; Bacillaceae, như *Bacillus subtilis*; Phế cầu; *Streptococcus*, và *Haemophilus influenzae*. Nó còn được đánh giá cao là, khi được biểu hiện trong vi khuẩn, các polypeptit có thể trở thành một phần của cơ quan thu nhận. Các polypeptit phải được tách, làm sạch và sau đó được ghép vào các phân tử chức năng.

Ngoài sinh vật nhân sơ, vi sinh vật nhân chuẩn cũng có thể được sử dụng. *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc nấm men làm bánh thông thường, được sử dụng phổ biến nhất trong số các vi sinh vật nhân chuẩn mặc dù một số chủng khác thường có sẵn. Đối với biểu hiện ở *Saccharomyces*, các plasmit YRp7, ví dụ, (Stinchcomb *et al*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al*, Gene, 10:157 (1980)) thường được sử dụng. Plasmi này đã có chứa gen TRP1 mà cung cấp chất đánh dấu chọn lọc cho chủng nấm men đột biến không có khả năng phát triển trong tryptophan,

ví dụ ATCC No. 44076 hoặc PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). Sự có mặt của thương tổn TRP1 như một đặc tính của bộ gen tế bào vật chủ men sau đó cung cấp môi trường hiệu quả để phát hiện sự biến đổi bằng sự phát triển trong điều kiện không có tryptophan.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa thêm bằng các ví dụ dưới đây mà không nên được hiểu là giới hạn thêm nữa.

Ví dụ 1. Thiết kế, điều chế và mô tả đặc tính của các đột biến kháng thể 2C3 kháng-CD-52 hyperglycosyl hóa

Nhiều sự đột biến hyperglycosyl hóa được thiết kế trong chuỗi nặng của kháng thể kháng-CD-52, 2C3, với mục đích bổ sung nhóm cồng kênh vào bề mặt tương tác (ví dụ, vị trí liên kết FcRn để điều chỉnh được động học kháng thể), để điều chỉnh chức năng phản ứng lại kích thích của kháng thể bằng cách thay đổi sự tương tác của nó với FcγRs, hoặc để đưa vào vị trí liên kết chéo mới sau sự biến đổi hóa học cho sự liên hợp nhóm chức phản ứng lại kích thích, bao gồm nhưng không giới hạn, các thuốc, các độc tố, các tác nhân gây độc tế bào, và các nucleotit phóng xạ. Các đột biến 2C3 được hyperglycosyl hóa được nêu trong Bảng 3.

Bảng 3. Các đột biến 2C3 kháng-CD-52 được hyperglycosyl hóa

| Sự đột biến | Lợi ích mong muốn                             | Các ứng dụng                                                    |
|-------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| A114N       | Glycosyl hóa ở Asn-Ser-Thr                    | 1) Đối chứng<br>2) Liên hợp nhóm chức phản ứng lại kích thích   |
| Y436T       | Glycosyl hóa ở Asn434<br>Ức chế liên kết FcRn | 1) Ghép tạng và các chỉ định khác cần có thời gian bán hủy ngắn |
| Y436S       | Glycosyl hóa ở                                | 1) Ghép tạng và các chỉ định                                    |

|                               |                                                        |                                                                                       |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|                               | Asn434<br>Ức chế liên kết FcRn                         | khác cần có thời gian bán<br>hủy ngắn                                                 |
| S440N                         | Glycosyl hóa ở Asn-<br>Leu-Ser                         | 1) Đối chứng<br>2) Liên hợp nhóm chức phản<br>ứng lại kích thích                      |
| S442N                         | Glycosyl hóa ở Asn-<br>Leu-Ser                         | 1) Đối chứng<br>2) Liên hợp nhóm chức phản<br>ứng lại kích thích                      |
| Thêm NGT<br>vào C-kết<br>thúc | Glycosyl hoá                                           | 1) Đối chứng<br>2) Liên hợp nhóm chức phản<br>ứng lại kích thích                      |
| S298N/Y300S                   | Glycosyl hóa ở<br>Asn298<br>Chức năng phản ứng<br>giảm | 1) Làm giảm chức năng<br>phản ứng<br>2) Liên hợp nhóm chức phản<br>ứng lại kích thích |

#### 1A. Tạo ra các đột biến kháng thể 2C3 kháng-CD-52 hyperglycosyl hóa

Đột biến A114N, được đặt tên dựa trên hệ thống đánh số Kabat, được đưa vào miền CH1 của 2C3 bởi PCR gây đột biến. Để tạo ra kháng thể đầy đủ độ dài, miền VH cộng với gốc A114N đột biến đã được chèn bằng nhân bản độc lập thất (LIC) vào vector pENTR-LIC-IgG1 mã hóa các miền CH 1 đến 3 của kháng thể. Tất cả các sự đột biến khác được đưa vào pENTR-LIC-IgG1 bằng đột biến có chủ đích với bộ kit đột biến có chủ đích QuikChange (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). WT 2C3 VH đã được nhân bản thành các vector đột biến bởi LIC. Các đột biến đầy đủ độ dài được nhân bản vô tính thành vector biểu hiện pCEP4(-E+I)Dest bằng nhân bản Gateway. Các sự đột biến Fc đã được chỉ định dựa trên hệ thống đánh số EU. Các sự đột biến đã được xác nhận bởi trình tự ADN. Các trình tự axit amin của các chuỗi nặng và nhẹ WT 2C3 và các chuỗi nặng 2C3 đột biến được nêu



trong Bảng 4. Các axit amin đột biến được đánh dấu bằng màu xám và các vị trí mục tiêu glycosyl hóa liên ứng được tạo ra bởi sự đột biến này được gạch chân.

Bảng 4. Các trình tự axit amin của các kháng thể 2C3 kháng-CD-52

| SEQ ID NO | Tên                       | Trình tự Axit Amin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1         | Chuỗi nhẹ kháng-CD-52 WT  | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGK<br>TYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSG<br>SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHLHTFG<br>QGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC<br>LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD<br>SKDSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL<br>SSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 2.        | Chuỗi nặng kháng-CD-52 WT | VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWM<br>NWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESV<br>KGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTP<br>VDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG<br>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP<br>SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS<br>KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS |

|    |                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                           | LSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 3. | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>CD-52<br>A114N | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYW<br>MNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAES<br>VKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCT<br>PVDFWGQGTTVTVSSNSTKGPSVFPLAPSSKSTSG<br>GTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP<br>SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS<br>KLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSPGK |
| 4. | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>CD-52<br>Y436S | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYW<br>MNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAES<br>VKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCT<br>PVDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG<br>GTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP<br>SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS                                                 |

|   |                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |                                           | KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHSTQKSL<br>SLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 5 | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>CD-52<br>S440N | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYW<br>MNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAES<br>VKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCT<br>PVDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG<br>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP<br>SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS<br>KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKN<br>LSLSPGK |
| 6 | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>CD-52<br>S442N | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYW<br>MNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAES<br>VKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCT<br>PVDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG<br>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP<br>SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK                                                                                                                            |

|    |                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                                     | GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS<br>KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LNLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 7. | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>CD-52<br>NGT             | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYW<br>MNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAES<br>VKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCT<br>PVDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG<br>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP<br>SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS<br>KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSPGKNGT |
| 8  | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>CD-52<br>S298N/<br>Y300S | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYW<br>MNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAES<br>VKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCT<br>PVDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG<br>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP<br>SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF                                                                                                                                                                                                        |

|  |  |                                                                                                                                                                                                  |
|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNTSRVVSFLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS<br>KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKS<br>LSLSPGK |
|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Các đột biến và kiểm soát WT được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK293-EBNA ở dạng đĩa 6 giếng. Như được thể hiện trong Hình 9, mức biểu hiện được tìm thấy là ~ 0,1 µg/ml, như được phân tích bởi SDS-PAGE và Western blot. Biểu hiện của các đột biến trong các môi trường có điều kiện cũng được đo bằng chụp protein A trên Biacore. Nồng độ được xác định bằng cách sử dụng phản ứng phân ly 6 phút sau khi tiêm vào Protein A cố định. WT 2C3 tạo ra CHO được pha loãng lần lượt trong các môi trường từ 90µg/mL xuống đến 1,5ng/mL được dùng làm đường cong chuẩn. Các nồng độ được tính toán xuống đến ~ 0,2µg/mL bằng đường chuẩn sử dụng 4-tham số phù hợp. Như được thể hiện trong Hình 9, các mức biểu hiện là tương đối thấp và thường tương ứng với các kết quả Western blot.

#### 1B. Xác minh hyperglycosyl hóa

Để xác định xem có các vị trí glycosyl hoá bổ sung đã được đưa vào bởi sự đột biến không, các protein đột biến 2C3 và dạng tự nhiên được xử lý với enzym deglycosyl hoá phổ biến PNGase F và các mẫu protein đã được phân tích bằng SDS-PAGE và Western blot. Như được thể hiện trong hình 10, chỉ có đột biến A114N có trọng lượng phân tử biểu kiến tăng lên, cho thấy sự có mặt của cacbohydrat liên kết ở vị trí nguyên tử N bổ sung.

Các sự pha chế kháng thể quy mô nhỏ đã được tạo ra để làm sạch các đột biến 2C3 với mục đích xác minh tiếp về sự đưa vào vị trí glycosyl hóa. Như thể hiện trong Hình 11, nó đã được khẳng định bởi SDS-PAGE đó là chỉ có đột biến A114N có các vị trí glycosyl hóa bổ sung được đưa vào.

### 1C. Các đặc tính liên kết của các đột biến 2C3 kháng-CD-52

Biacore đã được sử dụng để so sánh các đặc tính liên kết của các protein tinh khiết. FcRn-HPC4 ở chuột và ở người đã được làm sạch SEC được cố định trên chip CM5 qua liên kết amin. Mỗi kháng thể được pha loãng đến 200, 50, và 10nM và được tiêm trên các thụ thể Fc cố định. Campath, WT 2C3 tạo ra CHO, và Campath được xử lý DEPC được bao gồm làm các mẫu đối chứng dương tính và âm tính. Như được thể hiện trong Hình 13, đột biến Y436S hiển thị sự giảm 2 lần trong liên kết với FcRn ở người. Điều thú vị là, liên kết của đột biến này với FcRn ở chuột không bị ảnh hưởng. Không đột biến nào trong số các đột biến 2C3 khác có bất kỳ tác động đáng kể nào đối với liên kết FcRn ở người hoặc ở chuột.

Biacore đã được sử dụng để so sánh các đặc tính liên kết kháng nguyên của các protein tinh khiết bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết Biacore CD-52 peptit 741. Peptit CD-52 peptit 741 và peptit đối chứng 777 được cố định vào chip CM5. Các kháng thể được pha loãng lần lượt 2 lần từ 60 xuống đến 0,2nM trong HBS-EP và được hai lần trong 3 phút tiếp theo là phân ly 5 phút trong dung dịch đệm ở tốc độ dòng chảy 50 $\mu$ L/phút. GLD52 lô 17200-084 được bao gồm làm đối chứng. Bề mặt được tái sinh với xung HCl 40mM. Mô hình liên kết 1:1 được sử dụng để phù hợp với các đường cong 7,5 xuống đến 0,2nM. Như được thể hiện trong Hình 16, đột biến A114N có ái lực liên kết CD-52 thấp hơn một chút trong khi đột biến NGT có ái lực cao hơn một chút so với phần còn lại của các đột biến trong thử nghiệm này. Thử nghiệm liên kết Biacore CD-52 peptit 741 được lặp lại với protein tinh chế từ pha chế quy mô lớn hơn. Như được thể hiện trong Hình 17, đột biến A114N thể hiện liên kết CD-52 peptit mà có thể so sánh được với WT 2C3.

### 1D. Mô tả đặc điểm điện tích của đột biến A114N

Tập trung đẳng điện (IEF) được thực hiện để mô tả đặc điểm điện tích của các đột biến 2C3. Protein tinh khiết được chạy trên các gel acrylamit Gradient pH cố định (pH trong khoảng từ 3 đến 10) (IPG). Như được thể hiện

trong Hình 18A, A114N đã được tìm thấy là có nhiều điện tích âm hơn, có thể do các gốc axit sialic. Dữ liệu MS không thay đổi xác nhận cấu trúc phức tạp với các axit sialic trên đột biến A114N. Ngược lại, WT 2C3 đã được chứng minh là có G0F và G1F là các dạng glycosyl hoá chủ yếu (Hình 18C và 18D, tương ứng).

Ví dụ 2. Điều chế các đột biến hyperglycosyl hóa trong một số chuỗi chính của kháng thể

Ngoài kháng thể 2C3 kháng-CD-52, đột biến A114N được thiết kế trong một số chuỗi chính của kháng thể khác để xác nhận rằng vị trí hyperglycosyl hóa duy nhất có thể được đưa vào các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng không liên quan. Các đột biến kháng-TEM1, kháng-FAP, và kháng-HER2 đã được hyperglycosyl hóa được nêu trong Bảng 5.

Bảng 5. Các đột biến A114N và/hoặc S298N được thiết kế trong một số chuỗi chính của kháng thể không liên quan

| Sự đột biến              | Kháng thể                             | Lợi ích mong muốn                                                                                                    | Ứng dụng                                                                                                    |
|--------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A114N                    | Kháng-TEM1<br>kháng-FAP<br>kháng-HER2 | Vị trí glycosyl hóa bổ sung ở bản lề khuỷu của chuỗi nặng cho sự liên hợp qua trung gian cacbohydrat ở vị trí cụ thể | 1) Đối chứng<br>2) Liên hợp độc tố aminooxy qua tiếp xúc với axit sialic hoặc nhóm galactose (SAM hoặc GAM) |
| S298N/T299A/Y300S (NNAS) | kháng-HER2                            | Chuyển glycosyl hoá từ Asn297 sang Asn298 được thiết                                                                 | 1) Liên hợp độc tố aminooxy qua tiếp xúc với axit                                                           |

|            |            |                                                                                                                                                           |                                                                                                             |
|------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |            | kế. Chờ đợi dung môi tiếp xúc và các cacbohydrat phức tạp tại S298N, cung cấp vị trí liên hợp và phương tiện để loại bỏ chức năng phản ứng lại kích thích | sialic hoặc nhóm galactoze (SAM hoặc GAM)<br>2) Làm giảm chức năng phản ứng lại kích thích                  |
| A114N/NNAS | kháng-HER2 | Tiềm năng có được sự liên hợp tăng lên với hai vị trí liên hợp                                                                                            | 1) Đối chứng<br>2) Liên hợp độc tố aminooxy qua tiếp xúc với axit sialic hoặc nhóm galactoze (SAM hoặc GAM) |

## 2A. Tạo ra các đột biến hyperglycosyl hóa của kháng thể kháng-TEM1 và kháng-FAP

Đột biến A114N, được đặt tên dựa trên hệ thống đánh số Kabat, đã được đưa vào miền CH1 của kháng-TEM1 và kháng-FAP bằng PCR gây đột biến. Để tạo ra kháng thể đầy đủ chiều dài, VH đột biến cộng với gốc 114 đã được chèn bằng nhân bản độc lập thất (LIC) vào vector pENTR-LIC-IgG1 mã hóa các miền từ CH1 đến CH3 của kháng thể. Sau đó, các đột biến đầy đủ chiều dài được nhân bản vô tính thành vector biểu hiện pCEP4(-E+I)Dest bằng nhân bản vô tính Gateway. Các đột biến đã được xác nhận bởi trình tự ADN. Các trình tự axit amin của dạng tự nhiên kháng-TEM1 và các chuỗi nặng và nhẹ đột biến được nêu trong Bảng 6. Các axit amin đột biến được đánh dấu bằng màu xám và các vị trí mục tiêu glycosyl hóa liên ứng được tạo ra bằng sự đột biến này được gạch chân.



Bảng 6. Các trình tự axit amin của các kháng thể kháng-TEM1 và kháng-FAP

| SEQ<br>ID NO | Tên                                                       | Trình tự axit amin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9            | Chuỗi<br>nhẹ<br>kháng-<br>TEM1<br>WT<br>(Clone<br># 187)  | EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ<br>QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTIS<br>RLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGKVEIKRTVAAP<br>SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV<br>DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYE<br>KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 10           | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>TEM1<br>WT<br>(Clone<br># 187) | QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYWSWIR<br>QPPGKGGLEYIGYIYYTGSAIYNPSLQSRVTISVDTSKN<br>QFSLKLNSVTAADTAVYYCAREGVRGASGYYYYGM<br>DVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG<br>LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV<br>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT<br>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH<br>YTQKSLSLSPGK |
| 11           | Kháng-<br>TEM1<br>A114N                                   | QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYWSWIR<br>QPPGKGGLEYIGYIYYTGSAIYNPSLQSRVTISVDTSKN<br>QFSLKLNSVTAADTAVYYCAREGVRGASGYYYYGM                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

|  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  | DVWGQGTTVTVSSNSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG<br>LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV<br>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT<br>KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD<br>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH<br>YTQKSLSLSPGK* |
|--|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Các đột biến và đối chứng dạng tự nhiên được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK293-EBNA trong định dạng bình ba được làm sạch trên các cột HiTrap protein A (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). Như được phân tích bằng A280 trên quang phổ kế NanoDrop, biểu hiện của kháng-FAP A114N và kháng-FAP A114C là khoảng 3µg/ml và 1µg/ml, tương ứng. Biểu hiện của kháng-TEM1 A114N là khoảng 0,04µg/ml.

## 2B. Xác minh hyperglycosyl hóa

Để xác nhận rằng vị trí glycosyl hoá bổ sung đã được đưa vào các đột biến A114N, protein tinh chế từ các đột biến A114N được phân tích về việc làm giảm SDS-PAGE cùng với protein đối chứng dạng tự nhiên. Một vị trí glycosyl hoá bổ sung sẽ thêm 2000 đến 3000 Dalton vào trọng lượng phân tử của chuỗi nặng. Như được thể hiện trong Hình 20, SDS-PAGE cho thấy các dải chuỗi nặng của đột biến kháng-FAP và kháng-TEM1 A114N đã tăng trọng lượng phân tử biểu kiến, phù hợp với sự đưa thành công vị trí glycosyl hóa bổ sung vào cả hai kháng thể.

## 2C. Tạo ra các đột biến hyperglycosyl hóa của kháng thể kháng-HER2

Các kháng thể Her-2 A114N, Her-2 A114N/NNAS, và WT Her-2 được tạo ra bằng cách nhân bản độc lập thất. Miền VH của Herceptin được tổng

hợp và khuếch đại PCR với hai bộ các mồi tương thích LIC, hoặc WT hoặc mang đột biến A114N. Để có được kháng thể đầy đủ độ dài, các đột biến VH đã khuếch đại (WT hoặc A114N) đã được nhân bản vô tính thành hai vector pENTR mã hóa các miền CH1 đến CH3, pENTR-LIC-IgG1 WT và pENTR-LIC-IgG1 NNAS, thu được ba đột biến đầy đủ chiều dài (A114N, NNAS, A114N/NNAS) và đối chứng WT là đầu vào nhân bản trên pENTR. Các đột biến này được nhân bản vô tính thành vector biểu hiện pCEP4(-E+I)Dest, bằng cách nhân bản Gateway. Các đột biến đã được xác nhận bằng trình tự ADN. Các trình tự axit amin của các chuỗi nặng và nhẹ của kháng-Her-2 dạng tự nhiên và đột biến được nêu trong Bảng 7. Các axit amin đột biến được đánh dấu bằng màu xám và các vị trí mục tiêu glycosyl hóa liên ứng được tạo ra bằng sự đột biến này được gạch chân.

Bảng 7. Các trình tự axit amin của các kháng thể kháng-Her-2

| SEQ ID NO | Tên                            | Trình tự Axit Amin                                                                                                                                                                                                                            |
|-----------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 12        | Chuỗi nhẹ<br>WT<br>kháng-Her-2 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAW<br>YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDF<br>TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIK<br>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE<br>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG<br>EC |
| 13.       | Chuỗi nặng<br>WT<br>kháng-     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH<br>WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT<br>ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG<br>FYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST                                                                                        |

|     |                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | Her-2                                     | SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HK<br>PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV<br>EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                    |
| 14. | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>Her-2<br>A114N | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH<br>WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT<br>ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG<br>FYAMDYWGQGTLVTVSS <u>NS</u> TKGPSVFPLAPSSKST<br>SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HK<br>PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV<br>EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 15  | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>HER2           | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH<br>WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT<br>ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG<br>FYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

|    |                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | NNAS                                              | SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK<br>PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYN <b>NNAS</b> RVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV<br>EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                    |
| 16 | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>HER2<br>A114N<br>/NNAS | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIH<br>WVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT<br>ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG<br>FYAMDYWGQGTLVTVSS <b>NST</b> KGPSVFPLAPSSKST<br>SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK<br>PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV<br>FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYN <b>NNAS</b> RVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV<br>EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

## 2D. Biểu hiện của đột biến hyperglycosyl hóa kháng thể A114N kháng-HER2

Các cấu trúc A114N kháng-Her2 và dạng tự nhiên đã được chuyển nhiễm với Lipofectamin-2000 (tỷ lệ của thuốc thử với AND là 2,5:1) và XtremeGene HP (tỷ lệ của thuốc thử với AND là 3:1) vào các tế bào HEK293-EBNA trong 12 bình ba. Đo octet của các phân ước từ môi trường có điều kiện ngày 3 (CM) cho thấy biểu hiện protein là nhất quán trên 6 bình

cho cả Lipofectamin-2000 và XtremeGene HP. Như được thể hiện trong Bảng 8, hiệu quả chuyển nhiễm toàn bộ cao hơn khoảng 30% với XtremeGene HP. Môi trường có điều kiện thu thập vào ngày thứ 3 được gộp lại với nhau đối với cả hai trạng thái chuyển nhiễm và được tinh chế bằng cột protein A. Đo octet cho thấy 1,8 ug/ml kháng thể trong môi trường mô phỏng có chứa huyết thanh so với 0 ug/ml trong môi trường mô phỏng không có huyết thanh.

Bảng 8. Biểu hiện đột biến hyperglycosyl hóa A114N anti-Her2

|                                   |                      | Lipofectamin-2000 | XtremeGene HP |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------|---------------|
| Protein tinh chế từ cột protein A | Nồng độ (mg/ml)      | 1,72              | 3,18          |
|                                   | Thể tích (ml)        | 3,5               | 3,5           |
|                                   | Tổng số protein (mg) | 6,02              | 11,13         |
| Protein trao đổi dung dịch đệm    | Nồng độ (mg/ml)      | 15,59             | 16,86         |
|                                   | Thể tích (ml)        | 0,2               | 0,36          |
|                                   | Tổng số protein (mg) | 3,1               | 6,07          |
|                                   | % Thu hồi            | 51,8              | 54,5          |

Môi trường có điều kiện từ ngày 6 được thu thập và tinh chế riêng biệt cho từng trạng thái chuyển nhiễm. Cả hai nước giải hấp được trao đổi dung dịch đệm riêng rẽ vào PBS, pH 7,2, và cô đặc ~ 15 lần bằng cách sử dụng các cột Amicon-4 (ngưỡng 50 kD). CM ngày 6 cho thấy mức độ biểu hiện cao hơn so với CM ngày 3. Như được thể hiện trong Bảng 8, tổng cộng 3 mg Herceptin A114N 15,59 mg/ml (từ chuyển nhiễm Lipofectamin) và 6 mg Herceptin A114N 16,86 mg/ml (từ chuyển nhiễm XtremeGene HP) được tạo ra từ môi trường có điều kiện ngày 6 cho các ứng dụng làm giảm bổ sung, chẳng hạn như liên hợp kháng thể-thuốc.

## 2E. Phân tích SDS-PAGE và HIC của đột biến A114N kháng-HER2

Trước khi liên hợp, Herceptin A114N tinh khiết được mô tả đặc điểm bằng SDS-PAGE và HIC (sắc ký tương tác kỵ nước). Như được thể hiện trong Hình 21, chất lượng của Herceptin A114N tinh khiết được xác định là phù hợp cho các ứng dụng làm giảm khác.

## 2F. Sự liên hợp với glycosyl hóa được thiết kế

Nó đã được chứng minh rằng: a) vị trí glycosyl hóa đã được đưa vào ở Vị trí 114 Kabat trên kháng-TEM1; b) đột biến A114N có hyperglycosyl hóa trên chuỗi nặng bằng cách làm giảm SDS-PAGE; và c) đột biến được hyperglycosyl hoá A114N có cấu trúc cacbohydrat phức tạp bằng LC/MS nguyên vẹn, bao gồm các axit sialic và galactose cuối, mà là lý tưởng cho sự liên hợp SAM và GAM. Để xác nhận rằng vị trí glycosyl hoá được thiết kế là phù hợp cho sự liên hợp, A114N kháng-TEM1 được liên hợp với 5kDa PEG thông qua hóa aminooxy. Như được thể hiện trong Hình 22, PEG được liên hợp thành công với A114N kháng-TEM1 thông qua liên kết aminooxy. Đột biến này cũng đã được điều chế thành công trên các chuỗi chính kháng-FAP và kháng-CD-52 2C3 (không hiển thị). Các số liệu này chứng minh rằng vị trí glycosyl hóa ở N114 là hữu ích cho sự liên hợp của các nhóm chức phản ứng lại kích thích.

Ví dụ 3: Tạo ra các đột biến Fc S298N/Y300S

Các biến thể Fc được thiết kế và tạo ra trong đó vị trí glycosyl hóa mới đã được đưa vào tại vị trí Ser 298 EU, bên cạnh vị trí Asn297 có trong tự nhiên. Glycosyl hóa ở Asn297 hoặc được duy trì hoặc bị cắt bỏ bằng sự đột biến. Các đột biến và các kết quả glycosyl hóa mong muốn được nêu trong Bảng 9.

Bảng 9: Các trạng thái glycosyl hoá của các biến thể kháng thể khác nhau

| #  | Đột biến                | Trạng thái glycosyl hóa mong muốn                                             | Ứng dụng                                                                                    |
|----|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 17 | N297Q                   | Không glycosyl hóa (agly)                                                     | Đối chứng agly                                                                              |
| 18 | T299A                   | Không glycosyl hóa (agly)                                                     | Đối chứng agly, chức năng phản ứng chưa biết                                                |
| 19 | N297Q/S298N/Y300S (NSY) | Không glycosyl hóa ở 297 nhưng vị trí glycosyl hoá được thiết kế ở 298        | Làm giảm chức năng phản ứng; Liên hợp qua tiếp xúc với các nhóm axit sialic hoặc galactose. |
| 20 | S298N/T299A/Y300S (STY) | Không glycosyl hóa ở vị trí 297 nhưng vị trí glycosyl hoá được thiết kế ở 298 | Làm giảm chức năng phản ứng; Liên hợp qua tiếp xúc với các nhóm axit sialic hoặc galactose. |
| 21 | S298N/Y300S (SY)        | Hai vị trí glycosyl hóa tiềm năng tại 297 & 298;                              | Làm giảm chức năng phản ứng;                                                                |



|    |               |                                             |                                                                |
|----|---------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
|    |               | Các sự thay đổi trong mô hình glycosyl hóa. | Liên hợp qua tiếp xúc với các nhóm axit sialic hoặc galactose. |
| 22 | Dạng tự nhiên | 297                                         | Đối chứng                                                      |

### 3A. Tạo ra các biến thể glycosyl hoá bị biến đổi của kháng thể H66 $\alpha\beta$ -TCR

Đột biến đã được tạo ra trên chuỗi nặng của kháng thể thụ thể  $\alpha\beta$  T-cell nhân bản #66 bởi Quikchange bằng cách sử dụng mẫu pENTR\_LIC\_IgG1. Miền VH của HEBE1  $\Delta$ ab IgG1 #66 được khuếch đại với các môi LIC trước khi được nhân bản vô tính thành pENTR\_LIC\_IgG1 đột biến hoặc dạng tự nhiên bởi LIC để tạo ra đột biến với độ dài đầy đủ hoặc các kháng thể dạng tự nhiên. Sự tạo dòng phụ đã được kiểm chứng với tiêu hóa kép DraIII/XhoI, tạo ra (insert) đột biến có kích thước khoảng 1250 bp trong các bản sao thành công. Sau đó Các đột biến đầy đủ chiều dài này đã được nhân bản vô tính thành vector biểu hiện, pCEP4(-E+I)Dest, bằng cách nhân bản Gateway. Các đột biến này được xác nhận bởi trình tự ADN. Các trình tự axit amin của các chuỗi nặng và nhẹ WT H66 kháng- $\alpha\beta$ TCR và các chuỗi nặng H66 đột biến được nêu trong Bảng 10. Các axit amin đột biến được đánh dấu bằng màu xám và các vị trí mục tiêu glycosyl hóa liên ứng được tạo ra bởi đột biến được gạch chân.

Bảng 10: Các trình tự axit amin của các kháng thể H66 kháng- $\alpha\beta$ TCR

| <u>SEQ ID NO</u> | <u>Tên</u>                                              | <u>Trình tự Axit amin</u>                                                                                                                             |
|------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 23               | Chuỗi nhẹ<br>kháng-<br>$\alpha\beta$ TCR bản<br>sao H66 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVS<br>Y<br>MHWYQQKPGQAPRRLIYDTSKLGSGV<br>PAR<br>FSGSGSGTSTLTISLEPEDFAVYYCQ<br>QWS<br>SNPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP<br>SDEQ |

|    |                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                                                          | LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA<br>LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKA<br>DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE<br>C*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 24 | Chuỗi nặng<br>kháng-<br>$\alpha\beta$ TCR bản<br>sao H66                 | EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFT<br>SYVMHWVRQAPGKGLEWVGYINPYNDVT<br>KYNEKFKGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCARGSYDYDGFVYWGQGTL<br>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV<br>LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br>KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL<br>LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD<br>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK<br>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD<br>KSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLS<br>LSPGK* |
| 25 | Chuỗi nặng<br>S298N/Y300<br>S kháng-<br>$\alpha\beta$ TCR bản<br>sao H66 | EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFT<br>SYVMHWVRQAPGKGLEWVGYINPYNDVT<br>KYNEKFKGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCARGSYDYDGFVYWGQGTL<br>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV<br>LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|    |                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                                                                                              | <p>KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL<br/> LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD<br/> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br/> QYNTSRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK<br/> VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br/> SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br/> NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD<br/> KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS<br/> LSPGK*</p>                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 26 | <p>Chuỗi nặng<br/> S298N/T299<br/> A/Y300S<br/> kháng-<br/> <math>\alpha\beta</math>TCR bản<br/> sao H66</p> | <p>EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFT<br/> SYVMHWVRQAPGKGLEWVGYNPYNDVT<br/> KYNEKFKGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLR<br/> AEDTAVYYCARGSYDYDGFVYWGQGT<br/> VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG<br/> CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV<br/> LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br/> KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL<br/> LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD<br/> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br/> QYNNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK<br/> VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br/> SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br/> NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD<br/> KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS<br/> LSPGK*</p> |
| 27 | Chuỗi nặng                                                                                                   | EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

|  |                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | N297Q/S298<br>N/Y300S<br>kháng-<br>$\alpha\beta$ TCR bản<br>sao H66 | SYVMHWVRQAPGKGLEWVGYNPYNDVT<br>KYNEKFKGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCARGSYDYDGFVYWGQGTL<br>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG<br>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV<br>LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br>KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL<br>LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD<br>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE<br>QYQNTSRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK<br>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD<br>KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS<br>LSPGK* |
|--|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Các cấu trúc đột biến, dạng tự nhiên, và hai cấu trúc đối chứng aglycosylat hoá (HEBE1 Agly IgG4 và HEBE1  $\Delta$ ab IgG1 trong pCEP4) được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK293-EBNA trong các bình ba để biểu hiện. Các protein được tinh chế từ 160 ml của các môi trường có điều kiện (CM) với 1 ml HiTrap các cột protein A (GE) bằng cách sử dụng bơm nhu động đa kênh. Năm microgram mỗi dịch chiết thu được được phân tích trên các gel làm giảm và không làm giảm SDS-PAGE có từ 4 đến 20% Tris-Glyxin (xem Hình 2). Các chuỗi nặng của các đột biến aglycosyl hóa (N297Q, T299A, và các đối chứng Agly), đã di chuyển ra xa (đầu mũi tên), phù hợp với sự biến mất của các polysacarit trong các kháng thể này. Các chuỗi nặng của các kháng thể glycosylat hoá được thiết kế (NSY, STY, SY,  $\Delta$ ab, và đối chứng wt, các mũi tên), tuy nhiên, di chuyển tương tự như đối chứng dạng tự nhiên. Kết quả này phù hợp với sự tồn tại của vị trí glycosyl hoá được thiết kế ở vị

trí 298 EU. Phân tích SEC-HPLC chỉ ra rằng tất cả các đột biến được biểu hiện như các đơn phân.

### 3B. Phân tích glycosyl hóa bằng LC-MS

Các biến thể Fc H66 IgG1 được thiết kế được làm giảm một phần với DTT 20mM ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, các mẫu này được phân tích bằng LC/MS mao dẫn trên hệ thống HPLC mao dẫn Agilent 1100 kết hợp với hệ thống lai QSTAR qq TOF (Applied Biosystems). Sự tái cấu trúc protein Bayesian với sự điều chỉnh cơ bản và mô hình máy tính trong Analyst QS 1.1 (Applied Biosystem) được sử dụng để phân tích dữ liệu. Ở đột biến kháng thể H66 S298N/T299A/Y300S, một vị trí glycosyl hóa được quan sát thấy ở axit amin 298 với các polysacarit dạng phức tạp có hai nhánh và ba nhánh được phát hiện là các loại chủ yếu cùng với G0F, G1F và G2F (xem Hình 34). Cấu hình glycosyl hoá bị thay đổi này là phù hợp khi dịch chuyển glycosyl hóa ở N298 thay vì vị trí glycosyl hoá dạng tự nhiên ở N297.

### 3C. Các đặc tính liên kết của các đột biến kháng thể $\alpha\beta$ TCR với Fc $\gamma$ RIIIa và Fc $\gamma$ RI ở người bằng cách sử dụng Biacore

Biacore đã được sử dụng để đánh giá liên kết với Fc $\gamma$ RIIIa (V158 & F158) và Fc $\gamma$ RI tái tổ hợp ở người. Tất cả bốn flowcells của chip CM5 được cố định với kháng thể kháng-HPC4 qua các phương thức ghép nối amin tiêu chuẩn được cung cấp bởi Biacore. Kháng thể kháng-HPC4 được pha loãng đến 50 $\mu$ g/mL trong natri axetat 10mM có pH bằng 5,0 cho phản ứng ghép nối và được tiêm trong 25 phút ở lưu lượng 5 $\mu$ L/phút. Khoảng 12.000 RU của kháng thể được cố định vào bề mặt chip. Fc $\gamma$ RIIIa-V158 và Fc $\gamma$ RIIIa-F158 tái tổ hợp ở người được pha loãng đến 0,6 $\mu$ g/mL trong dung dịch đệm liên kết (HBS-P với CaCl<sub>2</sub> 1mM) và được tiêm vào các flowcell 2 và 4, tương ứng, trong 3 phút ở lưu lượng 5 $\mu$ L/phút để bắt 300 - 400 RU thụ thể trên chip kháng-HPC4. Để phân biệt giữa các chất kết dính thấp, rhFc $\gamma$ RIIIa được bắt nhiều hơn ba lần trên bề mặt kháng-HPC4 so với thông thường được sử dụng

trong thử nghiệm này. Các flowcell 1 và 3 đã được dùng làm các đối chứng tham khảo. Mỗi kháng thể được pha loãng đến 200nM trong dung dịch đệm liên kết và được tiêm qua cả bốn flowcell trong 4 phút, tiếp theo là 5 phút phân ly trong dung dịch đệm. Các bề mặt được tái sinh với EDTA 10mM trong dung dịch đệm HBS-EP trong 3 phút ở lưu lượng 20 $\mu$ L/phút. Các kết quả của các thử nghiệm này được thể hiện trong Hình 3.

Biacore cũng được sử dụng để so sánh các liên kết Fc $\gamma$ RI. Kháng thể kháng-tetra-His được trao đổi dung dịch đệm vào natri axetat 10mM có độ pH là 4,0 bằng cách sử dụng cột khử muối Zeba Desalting và được pha loãng đến 25 $\mu$ g/mL trong dung dịch đệm axetat này để ghép nối amin. Hai flowcell của chip CM5 được cố định với  $\sim$  9000 RU của kháng thể kháng-Tetra-His sau 20 phút tiêm ở lưu lượng 5 $\mu$ L/phút. Như trong thử nghiệm trước, Fc $\gamma$ RI được bắt hơn mười lần với bề mặt kháng-tetra-His để so sánh các mẫu với liên kết yếu. Fc $\gamma$ RI tái tổ hợp ở người được pha loãng đến 10 $\mu$ g/mL trong dung dịch đệm liên kết HBS-EP và được tiêm vào flowcell 2 trong 1 phút ở lưu lượng 5 $\mu$ L/phút để bắt  $\sim$  1000 RU thụ thể với chip kháng-tetra-His. Nồng độ kháng thể đơn, 100nM, được tiêm trong 3 phút ở lưu lượng 30 $\mu$ L/phút trên bề mặt thụ thể bắt được và bề mặt đối chứng. Sau đó, sự phân ly được giám sát trong ba phút. Sau đó, bề mặt này được tái sinh với hai lần tiêm 30 giây glyxin 10mM có độ pH là 2,5 ở lưu lượng 20 $\mu$ L/phút. Các kết quả của các thử nghiệm này được thể hiện trong Hình 4.

Các kết quả này cho thấy sự sụt giảm đáng kể trong liên kết của các đột biến được glycoengineered với Fc $\gamma$ RIIIa hoặc Fc $\gamma$ RI. Đặc biệt, H66 S298N/T299A/Y300S đã gần như hoàn toàn bị phá bỏ liên kết với cả hai thụ thể. Đột biến này được lựa chọn cho phân tích chi tiết hơn.

### 3D. Mô tả đặc tính ổn định bằng cách sử dụng Circular Dichroism (CD)

Độ ổn định của đột biến kháng thể S298N/T299A/Y300S được giám sát bằng thử nghiệm nhiệt nóng chảy nhiệt Far-UV CD trong đó tín hiệu CD

tại 216nm và 222nm được giám sát khi tăng nhiệt độ dẫn đến sự trải ra của kháng thể (sự biến tính).

Nhiệt độ được điều khiển bởi một peltier nhiệt điện (Jasco model AWC100) và được thêm ở tốc độ 1°C/phút từ 25 đến 89°C. Các phổ CD được thu thập trên quang phổ kế Jasco 815 ở nồng độ protein khoảng 0,5 mg/mL trong dung dịch đệm PBS trong cuvet thạch anh (Hellma, Inc) với chiều dài quang đường là 10 mm. Tốc độ quét là 50 nm/phút và cao độ dữ liệu là 0,5 nm. Băng thông 2,5 nm được sử dụng với thiết lập độ nhảy trung bình. Tín hiệu CD và điện áp HT đã được thu thập từ 210 đến 260 nm với khoảng dữ liệu là 0,5 nm và ở khoảng nhiệt độ là 1°C và bốn lần quét lặp lại được thực hiện cho từng mẫu. Các kết quả cho thấy cả hai đột biến delta AB H66 và S298N/T299A/Y300S H66 thể hiện các trạng thái nhiệt tương tự và có nhiệt độ bắt đầu thoái hoá tương đương (khoảng 63°C) (Hình 35), cho thấy thêm rằng chúng có độ ổn định tương đương.

#### Ví dụ 4: Phân tích chức năng của các đột biến Fc được thiết kế

Các đột biến Fc được thiết kế được đánh giá thông qua thử nghiệm tăng sinh PBMC và thử nghiệm giải phóng cytokin. Trong thử nghiệm tăng sinh PBMC, PBMC ở người được nuôi cấy với sự gia tăng nồng độ của kháng thể điều trị trong 72 giờ, <sup>3</sup>H-thymidin đã được bổ sung và các tế bào được thu hoạch sau khoảng thời gian 18 giờ. Đối với thử nghiệm suy giảm tế bào T/ giải phóng cytokin, PBMC ở người được nuôi cấy với sự gia tăng nồng độ của kháng thể điều trị và được phân tích hàng ngày để đếm số lượng tế bào và khả năng tồn tại (Vi-Cell, Beckman Coulter) ở ngoài đến ngày 7. Các dịch chiết tế bào cũng được thu hoạch, bảo quản ở -20°C và phân tích trên panel cytokin 8-plex (Bio-Rad).

PBMC cho bình thường được rã đông và được xử lý dưới các điều kiện sau đây (tất cả trong môi trường chứa thể bù): Chưa được xử lý; BMA031, mIgG2b 10ug/ml; OKT3, mIgG2a 10ug/ml; H66, huIgG1

deltaAB 10ug/ml, 1ug/ml và 0,1ug/ml; H66, huIgG1 S298N/T299A/Y300S 10ug/ml, 1ug/ml và 0,1ug/ml.

Các cytokin được thu hoạch vào ngày thứ 2 (D2) và ngày thứ 4 (D4) cho Bioplex Analysis (IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, GM-CSF, IFNg, TNFa). Các tế bào được nhuộm màu tại D4 cho CD4, CD8, CD25 và biểu hiện abTCR.

Các kết quả, được thể hiện trong các Hình từ 5 đến 8, chứng minh rằng H66 S298N/T299A/Y300S hành động tương tự với H66 deltaAB trong tất cả các thử nghiệm trên cơ sở tế bào được thực hiện, cho thấy sự kích hoạt tế bào T tối thiểu bằng biểu hiện CD25, liên kết với abTCR (với động học hơi khác với deltaAB), và giải phóng cytokin tối thiểu ở cả thời điểm D2 và D4. Vì thế, đột biến S298N/T299A/Y300S loại bỏ chức năng phản ứng lại kích thích hiệu quả như đột biến deltaAB.

Ví dụ 5. Điều chế và xác định đặc tính của biến thể Fc được thiết kế trong chuỗi chính của kháng thể kháng-CD52

Ngoài kháng thể H66 kháng- $\alpha\beta$ TCR, đột biến S298N/Y300S cũng được thiết kế trong chuỗi chính của kháng thể kháng-CD52 (bản sao 2C3). Sau đó, đột biến này được kiểm tra để xác định xem liệu sự điều biến chức năng phản ứng lại kích thích đã được quan sát thấy trong kháng thể S298N/Y300S H66 kháng- $\alpha$ TCR có nhất quán trong chuỗi chính của kháng thể khác hay không.

#### 5A. Tạo ra các biến thể glycosyl hoá được biến đổi của kháng thể 2C3 kháng-CD52

Đầu tiên, AND của biến thể S298N/Y300S 2C3 được điều chế bằng cách thay đổi nhanh chóng đột biến bằng cách sử dụng pENTR\_LIC\_IgG1, và WT 2C3 VH được nhân bản thành vector đột biến bằng LIC. Các đột biến đầy đủ chiều dài được nhân bản thành vector biểu hiện pCEP4(-E+I)Dest bằng cách sử dụng công nghệ Gateway. Sau đó, các đột biến được xác nhận bằng



trình tự ADN và các trình tự được nêu trong Bảng 11. Sau đó, các đột biến này được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK293-EBNA trong định dạng đĩa 6 giếng và protein được tinh chế từ các môi trường có điều kiện. Kháng thể dạng tự nhiên 2C3 kháng-CD52 được tạo ra song song làm đối chứng. Mức độ biểu hiện được tìm thấy là 0,1µg/mL bằng cách sử dụng các phân tích SD-PAGE và Western blot (Hình 9A). Biểu hiện của các đột biến trong các môi trường có điều kiện gọn gàng cũng được đo bằng bắt protein A trên Biacore. Nồng độ được xác định bằng cách sử dụng phản ứng phân ly sau khi tiêm sáu phút vào protein A cố định. WT 2C3 tạo ra CHO được pha loãng lần lượt trong các môi trường từ 90 µg/mL xuống đến 1,5ng/mL được sử dụng làm đường cong chuẩn. Nồng độ được tính toán trong khoảng 0,2 µg/mL bằng đường cong hiệu chuẩn sử dụng phù hợp 4tham số. Các mức độ biểu hiện là tương đối thấp và thường phù hợp với dữ liệu Western blot (Hình 9B).

Bảng 11: Các trình tự của kháng thể kháng-CD52 bản sao 2C3

| <u>SEQ<br/>ID<br/>NO</u> | <u>Tên</u>                                   | <u>Trình tự Axit amin</u>                                                                                                                                                                                                                       |
|--------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 28                       | Chuỗi<br>nhẹ<br>WT<br>kháng-<br>CD-<br>522C3 | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLN<br>WLLQKPGQSPQRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFT<br>LKISRVEAEDVGVYYCVQGTHLHTFGQGTRLEIKRTVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYAPREAKVQWK<br>VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYE<br>KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* |
| 29                       | Chuỗi<br>nặng<br>WT                          | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMNW<br>VRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTIS<br>RDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQGT                                                                                                                           |

|    |                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | kháng-<br>CD-<br>522C3                                     | VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP<br>EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP<br>SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP<br>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV<br>VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV<br>EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*                                                                                                                           |
| 30 | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>CD-52<br>2C3<br>S298N/<br>Y300S | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYWMNW<br>VRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTIS<br>RDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPVDFWGQGTT<br>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP<br>EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP<br>SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP<br>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNNTSRV<br>VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV<br>EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR<br>WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* |

### 5B. Phân tích glycosyl hoá bằng cách sử dụng PNGaseF

Để đánh giá các vị trí glycosyl hoá đưa vào thêm bởi sự đột biến, đột biến S298N/Y300S được làm giàu được de-glycosyl hóa với PNGase F. Nó đã không chứng minh bất kỳ sự thay đổi biểu kiến nào về trọng lượng phân tử, điều này chỉ ra rằng không có mặt cacbohydrat bổ sung (Hình 10). Các sự điều chế quy mô nhỏ được thực hiện để thanh lọc các đột biến này để xác

định đặc tính hơn nữa và các kết quả tái khẳng định rằng không có cacbohydrat bổ sung xuất hiện trên đột biến S298N/Y300S (Hình 11).

5C. Các đặc tính liên kết của các biến thể của kháng 2C3 kháng-CD52 với FcγRIIIa ở người bằng cách sử dụng Biacore

Biacore cũng được sử dụng để mô tả đặc tính kháng nguyên-liên kết, FcγRIII, và các đặc tính liên kết của các kháng thể tinh khiết (xem các Hình 12, 13, và 14). Biến thể S298N/Y300S 2C3 liên kết với peptit CD52 chặt chẽ và sensorgram liên kết không thể phân biệt được với đối chứng dạng tự nhiên, chứng minh rằng đột biến này không ảnh hưởng đến liên kết kháng nguyên của nó (Hình 12A).

Để thử nghiệm đối với chức năng phản ứng lại kích thích của Fc, thụ thể FcγRIII (Val158) được sử dụng trong các nghiên cứu liên kết. Kháng thể của đột biến và đối chứng dạng tự nhiên được pha loãng đến 200nM và được tiêm vào FcγRIIIa bất HPC4-tag. Liên kết FcγRIII là gần như không thể phát hiện được đối với đột biến S298N/Y300S, điều này chỉ ra sự mất chức năng phản ứng lại kích thích của biến thể này (Hình 12B và Hình 14A). Để thử nghiệm thêm nữa đối với chức năng phản ứng lại kích thích của Fc thụ thể FcγRIII (Phe158) cũng được sử dụng trong các nghiên cứu liên kết. Các kháng thể của đột biến và đối chứng dạng tự nhiên được pha loãng đến 200nM và được tiêm vào FcγRIIIa bất HPC4-tag. Liên kết FcγRIII là gần như không thể phát hiện được đối với đột biến S298N/Y300S, điều này chỉ ra sự mất chức năng phản ứng lại kích thích với biến thể Phe158 (Hình 14B). Cuối cùng, Biacore được sử dụng để so sánh các đặc tính liên kết FcRn của các protein tinh khiết. FcRn-HPC4 ở chuột và ở người được thanh lọc SEC được cố định vào chip CM5 qua ghép nối amin. Mỗi kháng thể được pha loãng đến 200, 50, và 10 nM và được tiêm trên các thụ thể. Campath, WT 2C3 tạo ra CHO, và Campath được xử lý DEPC được bao gồm làm các đối chứng dương tính và âm tính. Các dữ liệu này cho thấy đột biến liên kết với cả hai thụ thể

FcRn ở người và chuột với ái lực tương tự như đối chứng kháng thể dạng tự nhiên và rằng có thể không có các sự thay đổi về thời gian bán hủy tuần hoàn của nó hoặc các đặc tính dược động học khác (xem Hình 12C, Hình 13A và B). Do đó, đột biến S298N/Y300S là thích hợp với các kháng thể nói chung, để làm giảm hoặc loại bỏ chức năng phản ứng lại kích thích của Fc không mong muốn, ví dụ thông qua sự tham gia của các thụ thể Fcγ ở người.

Ví dụ 6: Phát hiện phức hợp miễn dịch tuần hoàn trong đột biến S298N/Y300S.

Sự phát hiện phức hợp miễn dịch tuần hoàn cũng đã được nghiên cứu bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết C1q đối với đột biến S298N/Y300S và đối chứng WT. Các đĩa 96 giếng Costar liên kết cao được phủ qua đêm ở 4°C với 100μl của các 2C3 Ab được pha loãng 2 lần liên tiếp ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 0,001 μg/ml trong dung dịch đệm phủ (NaCHO<sub>3</sub> 0,1M có độ pH là 9,2). Phân tích ELISA cho thấy liên kết C1q bị giảm đối với đột biến S298N/Y300S so với WT (Hình 15A). Liên kết của kháng-Fab Ab với các 2C3 Ab được phủ xác nhận lớp phủ tương đương của các giếng (Hình 15B).

Ví dụ 7: Tách và phân tích đột biến S298N/Y300S bằng cách sử dụng tập trung đẳng điện

Gel tập trung Đẳng điện (IEF) có độ pH từ 3 đến 10 được chạy để mô tả đặc tính các đột biến S298N/Y300S. S298/Y300S đã được tìm thấy có nhiều điện tích âm hơn, và do đó, có thể có nhiều phân tử axit sialic hơn (Hình 18A). Cả đột biến S298N/Y300S và WT 2C3 được chứng minh bằng MS còn nguyên vẹn để có G0F và G1F là các dạng glycosyl hóa chủ yếu (Hình 18 B và D, tương ứng).

Ví dụ 8: Ái lực liên kết kháng nguyên của S298N/Y300S.

Biacore được sử dụng để so sánh ái lực liên kết kháng nguyên của WT kháng-CD52 2C3 Ab và đột biến S298N/Y300S mà đã được điều chế và tinh chế từ cả các biểu hiện quy mô nhỏ hơn (Hình 16) và lớn hơn (Hình 17). Thu được các chip CM5 cố định với CD52 peptit 741 và peptit 777 đối chứng. Các kháng thể được pha loãng 2 lần liên tiếp từ 60 đến 0,2nM trong HBS-EP và sau đó được tiêm trên bề mặt chip trong 3 phút tiếp theo là phân ly 5 phút trong dung dịch đệm ở lưu lượng 50 $\mu$ l/phút. Sau đó, bề mặt này được tái sinh với xung HCl 40mM. Các phân tích này đã được thực hiện 2 lần và chứng minh rằng các kháng thể đột biến S298N/Y300S và WT 2C3 thể hiện liên kết CD52 peptit tương đương.

Một nền tảng sàng lọc môi trường được thiết kế để kiểm tra các đặc tính liên kết chức năng trước khi tinh chế để sàng lọc các kháng thể được tạo ra trong các chuyển nhiễm quy mô nhỏ. Các thử nghiệm này được thực hiện bằng cách sử dụng Octet (Hình 19A) để xác định nồng độ và sử dụng các cảm biến sinh học Protein A và đường cong chuẩn GLD52. Các mẫu được pha loãng đến 7,5 và 2nM trong HBS-Ep để so sánh liên kết CD52 bằng cách sử dụng Biacore (Hình 19B). Các kết quả của thử nghiệm liên kết peptit cho thấy cả hai kháng thể đột biến S298N/Y300S và WT 2C3 có liên kết CD52 peptit tương đương. Hơn nữa, các phân tích này chứng minh rằng Octet và Biacore làm việc tốt để dự đoán liên kết kháng nguyên của các kháng thể từ các chuyển nhiễm quy mô nhỏ.

Ví dụ 9: Điều chế các đột biến glycosyl hoá S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S, và N297Q/S298N/Y300S biến đổi ở các chuỗi chính kháng thể bổ sung

Ngoài kháng thể kháng- $\alpha\beta$ -TCR và kháng thể 2C3 kháng-CD-52, các đột biến S298/Y300S, S298N/T299A/Y300S, và N297Q/S298N/Y300S được thiết kế trong các chuỗi chính kháng thể khác để xác nhận rằng vị trí glycosyl

hóa song song bổ sung có thể được đưa vào các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng không liên quan. Các đột biến kháng-CD-52 12G6 và kháng-Her2 bị glycosyl hóa khác được nêu trong Bảng 12 và 13.

Bảng 12: Các trình kháng thể kháng-CD52 bản sao 12G6

| SEQ ID NO | Tên                            | Trình tự Axit Amin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 31        | Chuỗi nhẹ WT kháng-CD-52 12G6  | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYL<br>NWVLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVDPDRFSGSGSGTD<br>FTLKISRVEAEDVGVYYCVQGSHFHTFGQGGTKLEIKR<br>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV<br>QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK<br>ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 32        | Chuỗi nặng WT kháng-CD-52 12G6 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNW<br>VRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTI<br>SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT<br>TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD<br>YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV<br>VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI<br>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL<br>YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS<br>LSPGK* |

|    |                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 33 | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>CD-52<br>12G6<br>S298N/<br>Y300S           | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNW<br>VRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTI<br>SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT<br>TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD<br>YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV<br>VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br><u>NNTS</u> SRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI<br>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL<br>YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS<br>LSPGK* |
| 34 | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>CD-52<br>12G6<br>S298N/T<br>299A/Y3<br>00S | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNW<br>VRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTI<br>SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT<br>TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD<br>YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV<br>VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br><u>NNAS</u> RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI<br>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL<br>YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS<br>LSPGK*  |

|    |                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 35 | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>CD-52<br>12G6<br>N297Q/<br>S298N/<br>Y300S | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNW<br>VRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTI<br>SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT<br>TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD<br>YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV<br>VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br>QNTSRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI<br>EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL<br>YSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLS<br>LSPGK* |

Bảng 13: Các trình tự kháng thể kháng-Her2

| SEQ ID<br>NO | Tên                                  | Trình tự axit amin                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 36           | Chuỗi<br>nhẹ<br>WT<br>kháng-<br>Her2 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWY<br>QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTL<br>TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTV<br>AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK<br>ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* |
| 37           | Chuỗi<br>nặng<br>WT                  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW<br>VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS<br>ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY                                                                                                                          |



|    |                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | kháng-<br>Her2                                               | AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG<br>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV<br>LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK<br>VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC<br>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*                                                                                                                               |
| 38 | Chuỗi<br>nặng<br>kháng-<br>Her2<br>S298N/<br>T299A<br>/Y300S | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW<br>VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS<br>ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY<br>AMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG<br>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV<br>LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK<br>VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYN <u>NAS</u> RVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC<br>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* |

Ví dụ 10. Tạo ra các kháng thể bị thay đổi có chứa các nhóm chức polysacarit phản ứng

Để tạo ra các kháng thể có chứa các nhóm chức polysacarit có khả năng phản ứng với các nhóm chức phản ứng lại kích thích dẫn xuất, trước tiên kháng thể kháng-HER được glycosyl hóa in vitro bằng cách sử dụng glycosyltransferaza và các chất cho dạng đường UDP thích hợp. Ví dụ, để đưa các gốc axit sialic, trước tiên các kháng thể cho được galactosyl hóa với  $\beta$ -galactosyltransferaza, tiếp theo là sialyl hóa với  $\alpha$ 2,6-sialyltransferaza theo các phương pháp của Kaneko et al. (Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., và Ravetch, J. V. (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. Science 313, 670-3). Phản ứng được thực hiện trong bước tổng hợp một nồi bằng cách sử dụng  $\beta$ -galactosyltransferaza (50mU/mg, Sigma) và  $\alpha$ 2,6-sialyltransferaza (5ug/mg, hệ thống R&D) với các chất nền nucleotit dạng đường cho, UDP-galactose (10mM) và CMP-axit sialic (10mM) trong dung dịch đệm MES 50mM (pH là 6,5) có chứa  $MnCl_2$  5mM. Hỗn hợp phản ứng có chứa 5mg/ml kháng thể kháng-HER2 được ủ trong 48 giờ ở 37°C. Sialyl hóa được xác nhận bằng cách sử dụng phân tích MS MALDI-TOF của các polysacarit bị permetylat hoá giải phóng từ kháng thể với PNGase F, phân tích hàm lượng axit sialic bằng cách sử dụng Dionex HPLC và thăm lectin với SNA, lectin đặc hiệu đối với axit  $\alpha$ 2,6-sialic.

Phân tích MALDI-TOF của các polysacarit giải phóng bởi xử lý PNGase F của kháng thể kháng-HER2 bị sialyl hoá chỉ ra rằng các polysacarit tự nhiên đã hoàn toàn được sửa lại với một cấu trúc có hai nhánh bị monosialyl hoá là chủ yếu, A1F (Hình 27A) cùng với một lượng nhỏ các dạng bị disialyl hoá. Xử lý kháng thể này với các lượng nhiều hơn của  $\alpha$ 2,6-sialyltransferaza tạo ra các quần thể glycoform A1F đồng nhất hơn, gợi ý rằng hoặc hoạt tính enzym hoặc sự định vị polysacarit có thể ngăn sialyl hóa hoàn toàn. Hàm lượng axit sialic được xác định là  $\sim 2$  mol trên mỗi mol của kháng thể, mà phù hợp với A1F polysacarit là các dạng glycoform chủ yếu (Hình 27B). Thăm lectin với lectin SAN, *Sambucus nigra agglutinin* đặc hiệu đối với axit sialic được liên

kết ở vị trí  $\alpha 2,6$ , xác nhận rằng axit sialic đã có mặt trong cấu hình liên kết  $\alpha 2,6$  (Hình 27C).

Tóm lại, mặc dù các polysacarit protein tự nhiên là có phần không đồng nhất, sửa lại qua galactosyl và các sialyltransferaza thu được kháng thể gần như đồng nhất với các polysacarit (A1F) có hai nhánh bị monosialyl hoá nhưng bị galactosyl hóa hoàn toàn. Việc đưa vào chỉ  $\sim 1$  axit sialic trên hai chất nhận galactose trên mỗi polysacarit phân nhánh có thể là do khả năng tiếp cận của một trong các galactose bị hạn chế từ các polysacarit mà thường bị che đi trong kháng thể hoặc các tương tác không cộng hoá trị của các polysacarit với bề mặt protein.

Ví dụ 11. Quá trình oxy hóa các kháng thể bị thay đổi có chứa các nhóm chức polysacarit phản ứng

Một khi sialyl hóa được xác minh, quá trình oxy hóa trung gian của kháng thể kháng-HER2 được sialylat hóa với các nồng độ khác nhau của periodat (từ 0,25 đến 2mM) được khảo sát. Trước tiên, kháng thể được sialyl hóa được trao đổi đệm vào Tris-HCl 25mM (có độ pH là 7,5) có chứa EDTA 5mM tiếp theo là trao đổi đệm với dung dịch đệm PBS. Sau đó, hỗn hợp kháng thể đã đệm được áp dụng vào cột Sepharose protein A được cân bằng trước với dung dịch đệm PBS. Sau khi cột được rửa với 15 thể tích cột của PBS, 15 thể tích cột của PBS chứa EDTA 5mM, và 30 thể tích cột của PBS, sau đó nó được rửa giải với dung dịch đệm xitrat phosphat 25mM (có độ pH là 2,9). Các nước giải hấp được trung hoà ngay lập tức với dung dịch đệm phosphat hai bazơ và kháng thể được cô đặc bằng cách sử dụng Amicon ultra từ Millipore. Sau khi thanh lọc, kháng thể kháng-HER2 được sialyl hóa sau đó được oxy hóa với natri periodat (Sigma) trong dung dịch đệm natri axetat 100mM (có độ pH là 5,6) trên đá băng trong bóng tối trong 30 phút, và phản ứng được dập tắt với 3% glycerin trên đá băng trong 15 phút. Sản phẩm được

khử muối và trao đổi đổi vào natri axetat 100mM (có độ pH là 5,6) bằng 5 vòng siêu lọc qua 50kDa Amicons. Hình 28A cho thấy phân tích hàm lượng axit sialic của kháng thể được sialyl hóa chuẩn độ với các lượng periodat khác nhau. Quá trình oxy hóa hoàn toàn của các gốc axit sialic đạt được ở nồng độ periodat trên 0,5mM. Thật vậy, nồng độ periodat thấp nhất là 0,5mM là đủ để oxy hóa hoàn toàn axit sialic được đưa vào. Do đó, nồng độ 1mM của periodat đã được lựa chọn cho quá trình oxy hóa của kháng thể được sialyl hóa cho liên hợp thuốc.

Quá trình oxy hóa có thể có những ảnh hưởng xấu đến tính toàn vẹn của kháng thể. Đối với, quá trình oxy hóa của các gốc methionin, bao gồm Met-252 và Met-428, nằm trong miền CH3 Fc, gần với vị trí liên kết FcRn được biết là ảnh hưởng đến liên kết FcRn mà là rất quan trọng cho việc kéo dài thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể (Wang, W., et al. (2011) Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 48, 860-6). Do đó, để kiểm tra các tác dụng phụ tiềm tàng của quá trình oxy hóa periodat trên các gốc methionin (ví dụ, Met-252) có tính quyết định đối với sự tương tác FcRn, trạng thái oxy hóa của kháng thể được sialyl hóa được xác định bằng phân tích LC/MS của sự tiêu hoá trypsin peptit. Phân tích này cho thấy ~ 30% quá trình oxy hóa của Met-252 và <10% quá trình oxy hóa của Met-428 sau khi xử lý trastuzumab được sialyl hóa với periodat 1mM. Để xác định ảnh hưởng của mức độ oxy hóa methionin lên liên kết FcRn, động học liên kết FcRn đối với mỗi kháng thể được đánh giá bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt (BIACORE). Phân tích này cho thấy trạng thái oxy hóa tương quan với sự giảm nhẹ trong liên kết FcRn (Ka giảm 12% và 26% đối với FcRn ở chuột và ở người, xem các Hình 28B và 28C tương ứng). Đáng chú ý, Ka giảm ~ 25% đối với FcRn ở người đã được báo cáo là không có ảnh hưởng lên thời gian bán hủy trong huyết thanh ở chuột biến đổi gen FcRn ở người, vì vị trí miền

FcRn nguyên vẹn duy nhất trên mỗi kháng thể là đủ để cung cấp chức năng và lợi thế PK (Wang et al., *Id*).

Tóm lại, các dữ liệu này cho thấy rằng việc đưa vào các gốc axit sialic nhạy periodat bằng cách xử lý sialyltransferaza cho phép sử dụng các nồng độ periodat thấp hơn nhiều, dẫn đến các tác dụng phụ là tối thiểu lên các tương tác kháng thể FcRn và tính toàn vẹn kháng thể như được đánh giá bằng sự tập hợp ( $\leq 1\%$ ). Vì vậy, việc sử dụng các kháng thể được sialyl hóa theo các phương pháp của sáng chế cung cấp khoảng các điều kiện oxy hóa rộng hơn để được sử dụng, cho phép tạo ra các liên hợp glyco hoạt động có thể tái sản xuất được mà không ảnh hưởng đến thời gian bán hủy trong huyết thanh.

Galactose trong kháng thể đột biến được hyperglycosyl hóa cũng có thể bị oxy hóa riêng biệt bằng cách sử dụng galactose oxidaza để tạo ra nhóm andehyt cho sự liên hợp. Để xác nhận phương pháp này, kháng thể A114N kháng-TEM1 được cô đặc xuống 13 đến 20 mg/ml và sau đó được xử lý với 20mU/mg sialidaza trong PBS trong 6 giờ ở 37°C. Sau đó, sản phẩm được desial hoá bị oxy hóa với galactose oxidaza ("GAO"), đầu tiên với 5 ug GAO/mg protein qua đêm ở 37°C tiếp theo bằng cách thêm 2 ug GAO/mg protein và ủ thêm trong 5 giờ. Natri axetat được thêm vào để điều chỉnh độ pH về 5,6 (theo tỷ lệ 0,1 phần thể tích, độ pH là 5,6), và DMSO được thêm vào để đạt được nồng độ phản ứng cuối cùng là 16%, được thêm vào trước khi liên hợp. Kháng thể đột biến A114N kháng-HER hyperglycosyl hóa (15mg/ml) được desialyl hóa tương tự với sialidaza (20mU/mg) và bị oxy hóa với 5ug GAO mỗi mg protein trong phản ứng duy nhất qua đêm ở 37°C.

Ví dụ 12. Tổng hợp các nhóm chức phản ứng lại kích thích hoạt động

Để tạo thuận lợi cho sự liên hợp với các glycoform kháng thể dẫn xuất andehyt theo sáng chế, các nhóm chức phản ứng lại kích thích thuốc ứng cử viên (ví dụ, Momometyl Auristatin E (MMAE) và Dolastatin 10 (Dol10))

được dẫn xuất với aminooxy-cystamit để chứa các nhóm chức (ví dụ, aminooxy-cys) phản ứng riêng với andehyt.

Tóm lại, để tạo ra aminooxy-cystamit như nguyên liệu ban đầu, S-Trityl-L-cysteinamit (362 mg, 1 mmol) được thêm vào 3 mL dung dịch DMF của este *N-hydroxysuccinimit* axit t-*BOC-aminooxyaxetic succinieste* (289 mg, 1 mmol). Phản ứng được hoàn tất sau 3h rõ ràng từ phân tích HPLC. Hỗn hợp phản ứng sau đó được pha loãng với 30 ml diclorometan và được rửa với dung dịch natri bicacbonat 0,1 M (2 x 20 ml), nước (2 x 20 ml), và nước muối (2 x 20 ml). Dung dịch được sấy khô qua natri sulfat khan, được lọc và cô đặc đến khô. Thêm 3 ml TFA tiếp theo là 150 ml triethylsilan vào phần còn lại khô này. Dung dịch thu được được làm kết tủa từ t-butyl metyl ete và quá trình này được lặp lại ba lần. Sau khi lọc, phần kết tủa được sấy khô dưới áp suất thấp thu được 205 mg chất rắn màu trắng (hiệu suất 67%). Hợp chất này được sử dụng cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế thêm.

Để tạo ra MMAE dẫn xuất aminooxy (Aminooxy-Cys-MC-VC-PABC-MMAE), 30,1 mg aminooxy-cystamit (0,098 mmol, 2 đương lượng) được kết hợp với 64,6 mg MC-VC-PABC-MMAE (0,049 mmol), và 100 ml triethylamin trong 3 ml DMF. Hỗn hợp phản ứng thu được được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, qua thời gian đó phản ứng được hoàn tất theo phân tích HPLC. Hợp chất được tinh chế bằng HPLC điều chế thu được 45 mg (62%) sản phẩm mong muốn là chất rắn màu trắng. Phân tích HPLC đảo pha thấy rằng độ tinh khiết của hợp chất là > 96%. Tính toán ESI đối với  $C_{73}H_{116}N_{14}O_{18}S (MH)^+$  1509,8501; tìm thấy, m/z 1509,8469.

Để tạo ra các Dol10 dẫn xuất aminooxy (Aminooxy-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10), 7,4 mg (0,024 mmol, 3 đương lượng) aminooxy-cystamit, 12 mg (0,008 mmol) MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 và 30  $\mu$ l triethylamin được kết hợp trong 3 ml DMF. Phản ứng đã được hoàn tất trong 15 phút theo phân tích HPLC. Lọc HPLC điều chế thu được 6,2 mg (46%) sản phẩm mong muốn là chất rắn màu trắng. Phân tích HPLC đảo pha cho

thấy độ tinh khiết của hợp chất là  $> 96\%$ . Tính toán ESI đối với  $C_{80}H_{124}N_{16}O_{19}S_2 (MH)^+$  1678,0664; tìm thấy,  $m/z$  1678,0613.

Ví dụ 13. Liên hợp qua trung gian axit sialic- (SAM) của các nhóm chức phản ứng lại kích thích hoạt tính

Sau khử muối, các mối liên kết thuốc của Ví dụ 11 được kết hợp với các kháng thể được oxy hóa, được sialyl hóa của Ví dụ 10 trong 75% DMSO ở nồng độ 25mM để đạt được tỷ lệ mol của mối liên kết thuốc với kháng thể là 24:1 và nồng độ kháng thể cuối cùng ở 5 mg/ml. Hỗn hợp được ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Các mối liên kết thuốc chưa được hợp nhất và bất kỳ các thuốc tự do được làm sạch bằng cách sử dụng BioBeads. Sản phẩm được trao đổi đệm vào dung dịch đệm Histidin-Tween bằng cách sử dụng PD-10 columns và được lọc vô trùng. Các mức nội độc tố đã được xác định và thu được ít hơn 0,1EU/mg ADC trong nghiên cứu in vivo.

Hình 29A-C cho thấy sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) của các kháng thể được sialyl hóa khác nhau (kháng thể kháng-FAP B11 và G11 và kháng-HER2 của Ví dụ 11) đã liên hợp glycol với AO-MMAE. Kháng thể HER2 được sialyl hóa cũng đã được liên hợp với các mối liên kết thuốc, AO-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (Hình 29D). Phân tích này cho thấy có chủ yếu là một hoặc hai liên hợp thuốc trên một kháng thể với tỷ lệ thuốc với kháng thể (DAR) nằm trong khoảng từ 1,3 đến 1,9. Thời gian giữ của liên hợp glyco Dol10 tăng lên (Hình 29D) so với liên hợp glyco MMAE (Hình 29c) có thể là do tính kỵ nước của Dol10 lớn hơn.

Phân tích LC-MS cũng đã được tiến hành với kháng thể kháng-HER liên hợp với hai mối liên kết thuốc khác nhau (AO-MMAE hoặc AO-PEG8-Dol10) ở quy mô 30mg. Phân tích này cho thấy các giá trị DAR tương tự là 1,7 và 1,5 sau liên hợp, mà là tương đương với phân tích HIC. Sắc ký loại trừ kích thước (SEC) cho thấy các mức rất thấp (1%) của các kết tập trong các liên hợp này.

Ví dụ 14. Liên hợp qua trung gian galactose (GAM) của các nhóm chức phản ứng lại kích thích hoạt tính

Andehyt galactose được tạo ra với galactose oxidaza trên kháng thể đột biến hyperglycosyl hóa A114N kháng-TEM1 như được mô tả trong Ví dụ 11 được liên hợp với 24 lượng mol dư của mỗi liên kết thuốc aminooxy-MC-VC-PABC-MMAE trên kháng thể bằng cách ủ qua đêm ở 25 ° C, thu được liên hợp ADC với DAR là 1,72.

Với kháng thể kháng-HER được xử lý galactose oxidaza đã điều chế như được mô tả trong Ví dụ 11, một phần mười khối lượng phản ứng của natri axetat 1M, độ pH là 5,6, đã được bổ sung để điều chỉnh độ pH xuống 5,6 và DMSO đã được thêm vào để làm cho nồng độ cuối cùng là 14% trước khi thêm 24 đương lượng mỗi liên kết thuốc aminooxy-MC-VC-PABC-MMAE. Các phản ứng được ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Thuốc và mỗi liên kết thuốc tự do được làm sạch với Biobeads và sản phẩm được trao đổi đệm bằng SEC (hiệu suất 65%). Liên hợp sản phẩm được phân tích bằng HIC. Như được thể hiện trong Hình 30, AO-MMAE đã được liên hợp với ~ 60% các phân tử.

Ví dụ 15. Các thử nghiệm tăng sinh tế bào ADC *in vitro*

Hoạt tính của các phân tử liên hợp kháng-HER và kháng-FAP *in vitro* theo sáng chế cũng được so sánh với các liên hợp thiol tương ứng có chứa nhóm chức thuốc tương tự được liên kết thông qua các mối liên kết thiol với các cystein vùng bản lề của kháng thể cho tương tự. Các liên hợp thiol chứa khoảng gấp đôi số lượng các thuốc trên một kháng thể (DAR) so với các liên hợp glyco. Liên hợp trên cơ sở thiol được thực hiện như được mô tả bởi Stefano et al (Methods in Molecular Biology 2013, trên báo chí). Các dòng tế bào HER2+ SK-BR-3 và Her2- MDA-MB-231 sau đó được sử dụng để đánh giá hiệu quả tương đối của mỗi ADC. Các kết quả của phân tích này được trình bày trong Bảng 15 dưới đây



Bảng 15. So sánh EC<sub>50</sub> của các liên hợp glyco và các liên hợp thiol

|                                                              | DAR   | EC <sub>50</sub> (ng/ml) |
|--------------------------------------------------------------|-------|--------------------------|
| Kháng-HER-MC-VC-PABC-MMAE<br>(Thiol MMAE)                    | 3,8*  | 2,3                      |
| Kháng-HER-AO-Cys-MC-VC-PABC-MMAE<br>(Glyco MMAE)             | 1,7*  | 4,7                      |
| Kháng-HER-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10<br>(Thiol Dol10)             | 3,9*  | 0,45                     |
| Kháng-HER-AO-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (Glyco Dol10)         | 1,5*  | 0,97                     |
| Kháng FAP B11-MC-VC-PABC-MMAE<br>(Thiol MMAE), CHO + FAP     | 3,3** | 382,4                    |
| Kháng FAP B11-AO-Cys-MC-VC-PABC-MMAE (Glyco MMAE), CHO + FAP | 1,5** | 682,4                    |

Lưu ý: \* DAR được xác định bằng LC-MS; \*\* DAR xác định bằng HIC

Hình 31 cho thấy sự so sánh hiệu lực của liên hợp glycol kháng-HER và liên hợp thiol đối chứng của nó. Khả năng sống được của tế bào được xác định sau 72 giờ tiếp xúc của các liên hợp này với các tế bào biểu hiện kháng nguyên HER2 (SK-BR-3) (Hình 31A và C) hoặc các tế bào không biểu hiện (MDA-MB-231) (Hình 31B và D). Các ADC chứa hoặc MMAE hoặc PEG8-Dol10 liên kết với các polysacarit ("glyco") hoặc bằng hóa học thông thường với các cystein vùng bản lề ("thiol"). Như được thể hiện trong Hình 30A và C,

EC<sub>50</sub> thấp hơn 2 lần đã được quan sát thấy đối với các liên hợp thiol so với các liên hợp glyco, phù hợp với DAR cao hơn 2 lần của cái trước so với cái sau. Không có độc tính được quan sát với dòng tế bào Her2- với kháng thể bất kỳ lên đến 100ug/ml.

Các xu hướng tương tự cũng được quan sát thấy trong sự tăng sinh tế bào đối với ADC được điều chế với các kháng thể chống lại kháng nguyên khối u (FAP) mà được biểu hiện cao bởi các nguyên bào sợi mô đệm hoạt tính trong các bệnh ung thư biểu mô bao gồm ung thư đại tràng, tuyến tụy và ung thư vú (Teicher, B. A. (2009) Antibody-drug conjugate targets. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 982-1004). Các liên hợp này được điều chế một lần nữa bằng cách liên hợp hoặc mỗi liên kết thuốc aminooxy MMAE hoặc mỗi liên kết thuốc maleimido MMAE với các polysacarit hoặc nhóm thiol. Các thử nghiệm tăng sinh tế bào của các liên hợp này cho thấy EC<sub>50</sub> của liên hợp thiol có hiệu lực cao hơn ~ 100 lần trên các tế bào CHO được chuyển nhiễm với FAP ở người so với các tế bào tương tự không có biểu hiện FAP như được mô tả trong Hình 32, mà cho thấy sự so sánh hiệu lực của liên hợp glyco kháng FAP B11 và liên hợp thiol in vitro. Khả năng sống được của tế bào được xác định sau tiếp xúc của các liên hợp với các tế bào CHO chuyển nhiễm với hoặc không với kháng nguyên FAP. Các ADC chứa MMAE liên kết với các polysacarit ("glyco") hoặc bằng hóa học thông thường với các cystein vùng bản lề ("thiol"). Lưu ý rằng EC<sub>50</sub> thấp hơn ~ 2 lần đối với thiol so với các liên hợp glyco là phù hợp với các lượng tương đối của thuốc phân phối cho mỗi kháng thể giả sử rằng các hiệu quả tương tự đối với liên kết mục tiêu và sự tiếp thu trong các tế bào CHO biểu hiện kháng nguyên. Song song với đó, liên hợp glyco của kháng FAP (B11) ADC với DAR là 1,5 như được mô tả trước đó được thử nghiệm và cho thấy EC<sub>50</sub> cao hơn ~ 2 lần so với liên hợp thiol so sánh (DAR là 3,3).

Như được thể hiện trong Hình 36, các xu hướng tương tự cũng được quan sát thấy trong thử nghiệm tăng sinh tế bào đối với ADC được điều chế

với kháng thể kháng-HER mang đột biến hyperglycosyl hóa A114N và AO-MMAE như được mô tả trong Ví dụ 14, khi thử nghiệm trên các tế bào biểu hiện SK-BR-3 hoặc các tế bào MDA-MB-231. Liên hợp glyco A114N rõ ràng cho thấy độc tính tế bào được tăng cường chống lại dòng tế bào biểu hiện HER2 hơn dòng tế bào không biểu hiện. Độc tính tương đối so với liên hợp glyco SialT được điều chế với kháng thể tương tự là phù hợp với tải lượng thuốc thấp hơn của dược phẩm này.

Thử nghiệm tăng sinh tế bào cũng được thực hiện đối với ADC được điều chế với kháng thể kháng-TEM1 mang đột biến hyperglycosyl hóa A114N và AO-MMAE được điều chế như mô tả trong Ví dụ 14. Độc tính cao hơn được quan sát thấy với các dòng tế bào biểu hiện TEM1 SJSA-1 và A673 so với dòng MDA-MB-231 không biểu hiện. Mức độc tính so với liên hợp thiol thông thường với kháng thể tương tự là phù hợp với tải lượng thuốc (DAR) của dược phẩm này.

|                                     | SJSA-1  | A673-RPMI | A673-DMEM-RPMI | MDA-MB-231 |
|-------------------------------------|---------|-----------|----------------|------------|
|                                     | IC50    | IC50      | IC50           | IC50       |
| kháng TEM1 A114N-AO-MC-VC-PABC-MMAE | 3 µg/ml | 3,2 µg/ml | 2,2 µg/ml      | 40 µg/ml   |
| kháng TEM1-MC-VC-PABC-MMAE          | 4 µg/ml | 1 µg/ml   | 0,9 µg/ml      | 20 µg/ml   |

Tóm lại, sự liên hợp cụ thể của các thuốc thông qua các polysacarit với các môi liên kết có thể tách ra được tạo ra các ADC với các độc tính và hiệu quả in vitro là tương đương với các liên hợp trên cơ sở thiol thông thường, như được chứng minh bằng cách sử dụng các kháng thể khác nhau và các môi liên kết thuốc khác nhau. Hơn nữa, thấp hơn periodat 2mM, mức độ liên hợp thuốc có tương quan với sự giảm axit sialic. Tăng nồng độ periodat cao hơn 2mM tạo ra lợi ích nhỏ, như mong đợi từ việc chuyển đổi hoàn toàn của axit sialic thành dạng được oxy hóa. Tuy nhiên, trong mọi điều kiện, số lượng các thuốc trên một kháng thể là thấp hơn một chút so với hàm lượng axit sialic, chỉ ra rằng một số axit sialic được oxy hóa tương tự có thể không sẵn sàng để ghép nối, hoặc bị che đi hoặc nếu không thì do trở ngại về không gian phát sinh từ sự chồng chéo của môi liên kết thuốc.

Ví dụ 16. Xác định đặc tính của các liên hợp thuốc kháng thể in vivo

Hiệu lực của các liên hợp glyco kháng-HER cũng được đánh giá trong mẫu ghép ngoại lai tế bào khối u HER2+ và so sánh với các bộ so sánh là liên hợp thiol có DAR cao hơn ~ 2 lần. Những con chuột Beige/SCID được cấy các tế bào khối u SK-OV-3 HER2+ mà được phép thiết lập các khối u ~ 150 mm<sup>3</sup> trước khi bắt đầu điều trị. Các ADC ở các liều 3 hoặc 10mg/kg được tiêm qua tĩnh mạch đuôi vào các ngày 38, 45, 52 và 59. Có ~ 10 con chuột mỗi nhóm. Thể tích khối u của những con chuột trong nhóm khác nhau được đo và sự sống sót của chúng được ghi lại. Đường cong tỷ lệ sống sót được vẽ dựa trên phương pháp Kaplan-Meier.

Hình 33 cho thấy sự so sánh hiệu lực của các liên hợp glyco kháng-HER và các liên hợp thiol in vivo trong mẫu ghép ngoại lai tế bào khối u HER2+. Những con chuột Beige/SCID được cấy các tế bào khối u SK-OV-3 HER2+ được định liều với MMAE (Hình 33 A và B) và PEG8-Dol10 (Hình 33 C và D) chứa các liên hợp glyco hoặc các bộ so sánh liên hợp thiol với DAR cao hơn ~ 2. Động học sự phát triển của khối u của các liên hợp MMAE được thể hiện trong Hình 33A. Trong trường hợp này, liên hợp glyco cho thấy hiệu lực cao hơn đáng kể so với chỉ có kháng thể trần (màu đen) nhưng thấp hơn so với bộ so sánh liên hợp thiol có DAR cao hơn ~ 2 lần (màu xanh lá cây). Liên hợp glyco MMAE cho thấy sự thoái hoá khối u đáng kể và sự trì hoãn trong sự phát triển của khối u ~ 20 ngày (Hình 33A) và tăng gấp ~ 2 lần thời gian sống sót từ liều đầu tiên (Hình 33B). Liên hợp thiol MMAE cho thấy sự ức chế khối u gần như hoàn toàn ở liều tương tự của ADC (10 mg/kg).

Hiệu lực của liên hợp glyco PEG8-Dol10 ("Glyco Dol10") và bộ so sánh liên hợp với DAR cao hơn ~ 2 lần ("Thiol Dol10") cũng được xác định trong mẫu ghép ngoại lai tế bào khối u HER2+. Cả hai liên hợp này cho thấy hiệu lực thấp hơn so với các liên hợp MMAE như đã mô tả trước đây. Tuy nhiên, liên hợp glyco aminooxy-PEG8-Dol10 ("Glyco Dol10") ở mức 10

mg/kg cho thấy sự trì hoãn trong sự phát triển của khối u 15 ngày (Hình 33C) và thời gian sống sót tăng lên ~ 20 ngày (gấp 1,7 lần) sau khi tiêm liều đầu tiên (Hình 33D). Liên hợp thiol có hiệu lực hơn ở liều tương tự, cho thấy tỷ lệ sống sót tăng gấp 2 lần. Ở liều thấp hơn (3 mg/kg), liên hợp thiol cho thấy hiệu lực thấp hơn so với liên hợp glyco ở mức 10 mg/kg. Liều này tương ứng với 80 umol thuốc PEG8-Dol10 mỗi kg liều, so với 110 umol thuốc PEG8-Dol10 mỗi kg liều đối với liên hợp glyco.

Các số liệu này chứng minh rằng sự liên hợp ở vị trí cụ thể của các thuốc lên trên axit sialic của các polysacarit kháng thể thu được các phân tử có hiệu lực tương đương với các ADC được tạo ra theo đường hóa học trên cơ sở thiol. Hiệu lực in vivo thấp hơn một chút có thể xuất phát từ số lượng các loại thuốc ít hơn mà được mang bởi mỗi kháng thể vào các tế bào khối u do sự tiếp thu của mỗi kháng nguyên được liên kết kháng thể. Mặc dù các tác giả sáng chế không so sánh các liên hợp glyco này với các liên hợp thiol có DAR tương tự, hiệu lực quan sát thấy ở các liều khác nhau của hai ADC đại diện cho mức tương đương của thuốc được tiêm cho thấy các liên hợp glyco có hiệu lực thực chất tương đương như các liên hợp thiol của chúng, cho thấy không có ảnh hưởng có hại của sự liên hợp tại vị trí này. Hơn nữa, liều 10mg/kg của liên hợp glyco Dol10 được đưa vào chỉ hơn có 28% thuốc mà mang lại sự gia tăng gấp 2 lần tỉ lệ sống sót hơn liên hợp thiol (ở mức 3mg/kg), cho thấy các liên hợp này thậm chí có thể mang lại các hiệu lực vượt trội ở DAR tương tự. Với sự hạn chế rõ ràng ban đầu trong việc kết hợp axit sialic ở các polysacarit tự nhiên, tải lượng thuốc cao hơn có thể được thực hiện bằng một số chiến lược khác nhau bao gồm cả việc sử dụng các môi liên kết thuốc phân nhánh hoặc đưa vào các vị trí glycosyl hóa bổ sung và sử dụng phương pháp tương tự.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập gồm miền Fc của IgG1 ở người, trong đó miền Fc của IgG1 ở người bao gồm gốc asparagin được glycosyl hóa ở vị trí axit amin 298, theo cách đánh số của EU; và gốc serin hoặc threonin ở vị trí axit amin 300, theo cách đánh số của EU.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó miền Fc của IgG1 ở người bao gồm thêm gốc alanin ở vị trí axit amin 299, theo cách đánh số của EU; hoặc miền Fc của IgG1 ở người bao gồm thêm gốc glutamin ở vị trí axit amin 297, theo cách đánh số của EU.

3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó một hoặc nhiều điều kiện sau được đáp ứng:

a) chuỗi bên của gốc asparagin ở vị trí axit amin 298, theo cách đánh số của EU, được liên kết với glycan qua liên kết  $\beta$ -glycosylamit;

b) chuỗi bên của gốc asparagin ở vị trí axit amin 298, theo cách đánh số của EU, được liên kết với glycan qua liên kết  $\beta$ -glycosylamit, và:

i) glycan là glycan có hai nhánh;

ii) glycan là glycoform tự nhiên ở động vật có vú;

iii) glycan bao gồm nhóm andehyt phản ứng;

iv) glycan bao gồm gốc sacarit bị oxy hóa bao gồm nhóm andehyt phản ứng; hoặc

v) glycan được liên kết với nhóm chức phản ứng lại kích thích.

4. Kháng thể theo điểm 3, trong đó một hoặc nhiều điều kiện sau được đáp ứng:

a) gốc sacarit bị oxy hóa là axit sialic hoặc galactosa ở vị trí cuối;

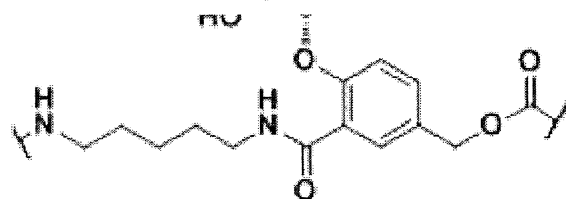
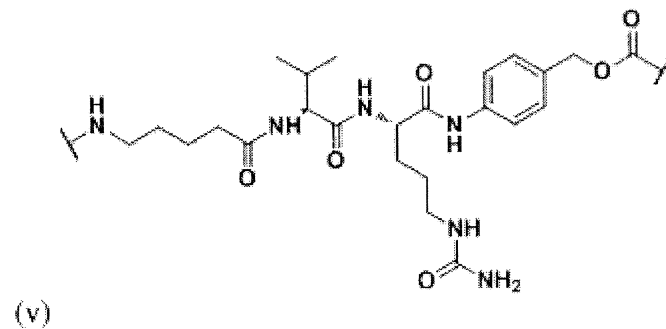
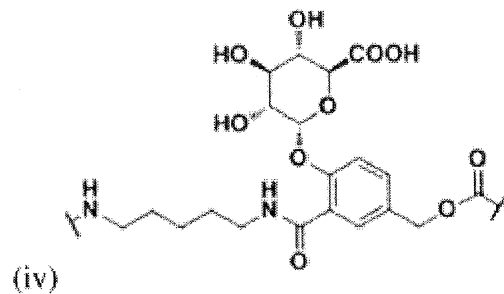
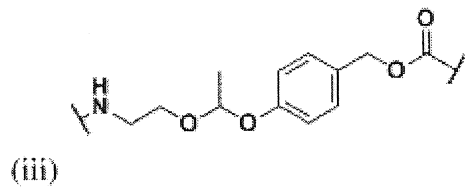
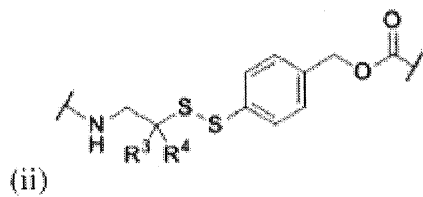
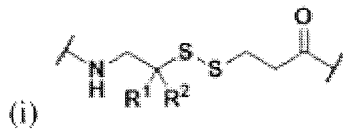
b) nhóm chức phản ứng lại kích thích là độc tố tế bào;

c) nhóm chức phản ứng lại kích thích là tác nhân chẩn đoán;

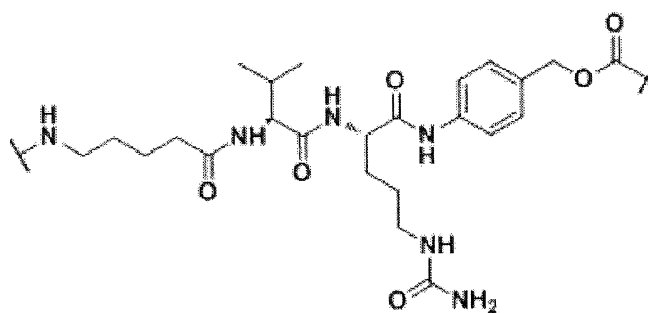
d) nhóm chức phản ứng lại kích thích là tác nhân điều trị, trong đó tác nhân điều trị này được lựa chọn tùy ý từ nhóm gồm có nhóm chức thuốc, nhóm chức tiền thuốc, và hợp chất đánh dấu phóng xạ;

e) nhóm chức phản ứng lại kích thích bao gồm mỗi liên kết nhạy pH, mỗi liên kết disulfua, mỗi liên kết nhạy enzym hoặc nhóm chức liên kết khác có thể tách ra được mà giải phóng nhóm chức phản ứng lại kích thích từ kháng thể khi bị tách ra; và

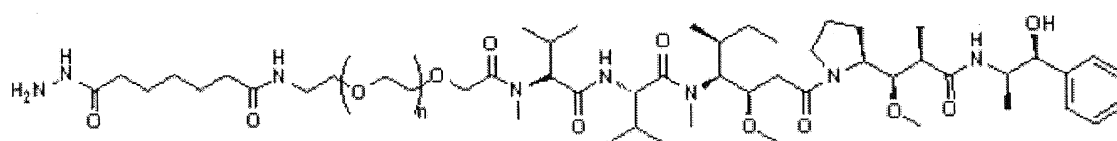
f) nhóm chức phản ứng lại kích thích bao gồm nhóm chức liên kết được chọn từ nhóm các nhóm chức liên kết được mô tả dưới đây:



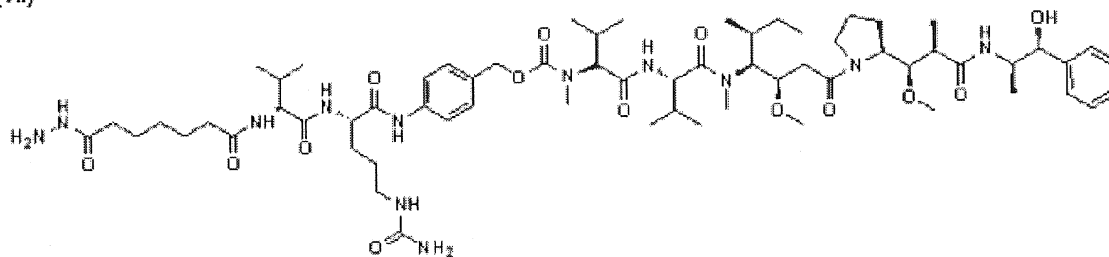
(v)



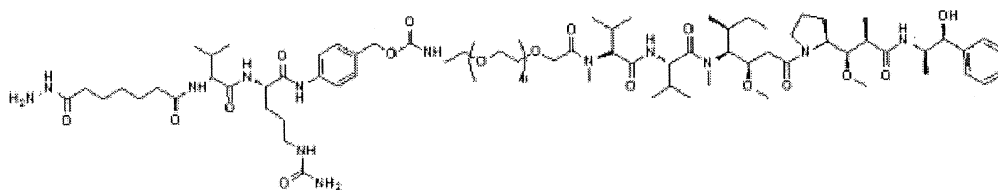
(vi)



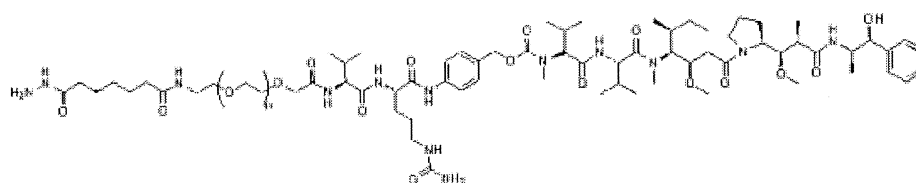
(vii)



(viii)



và (ix)

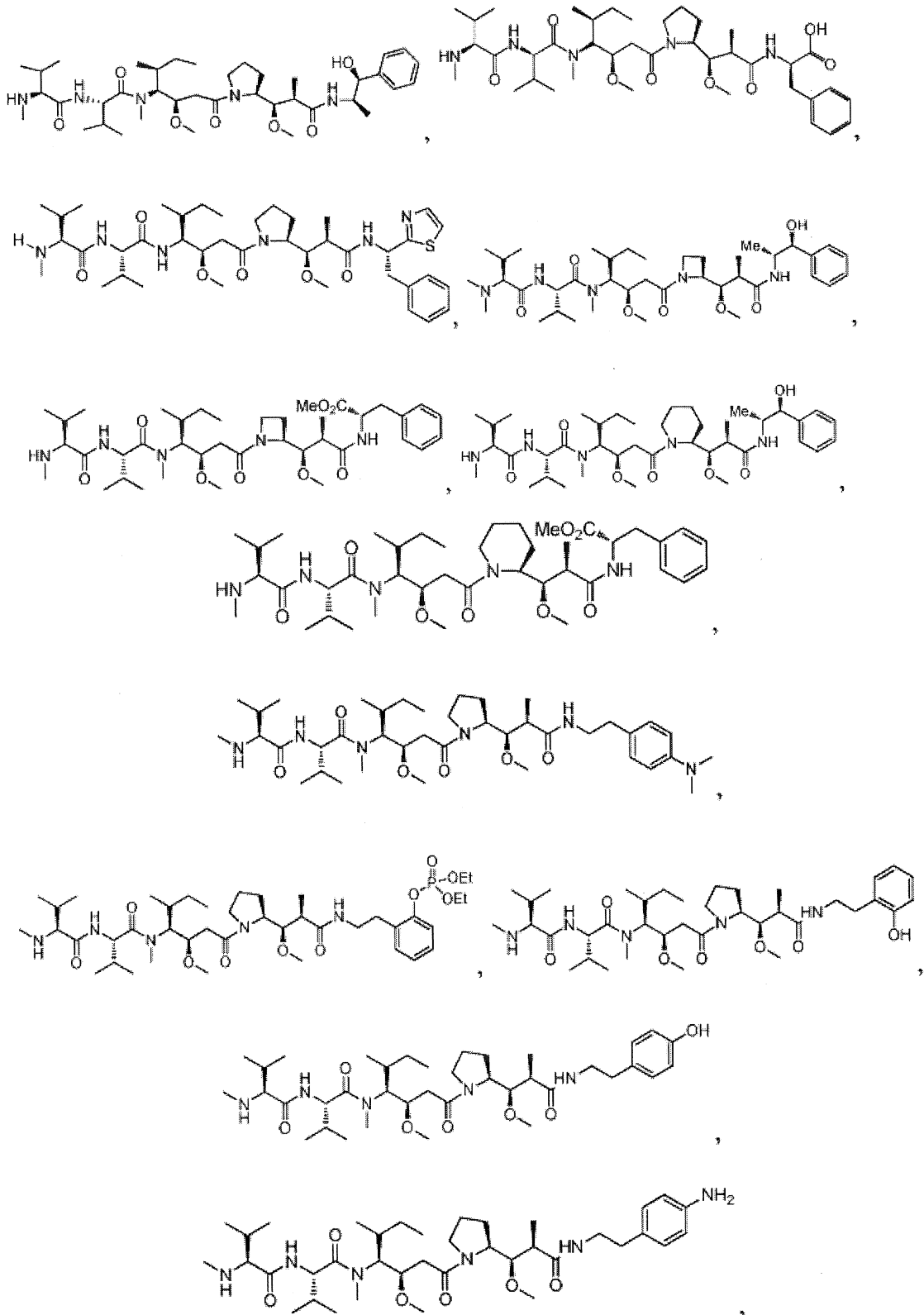


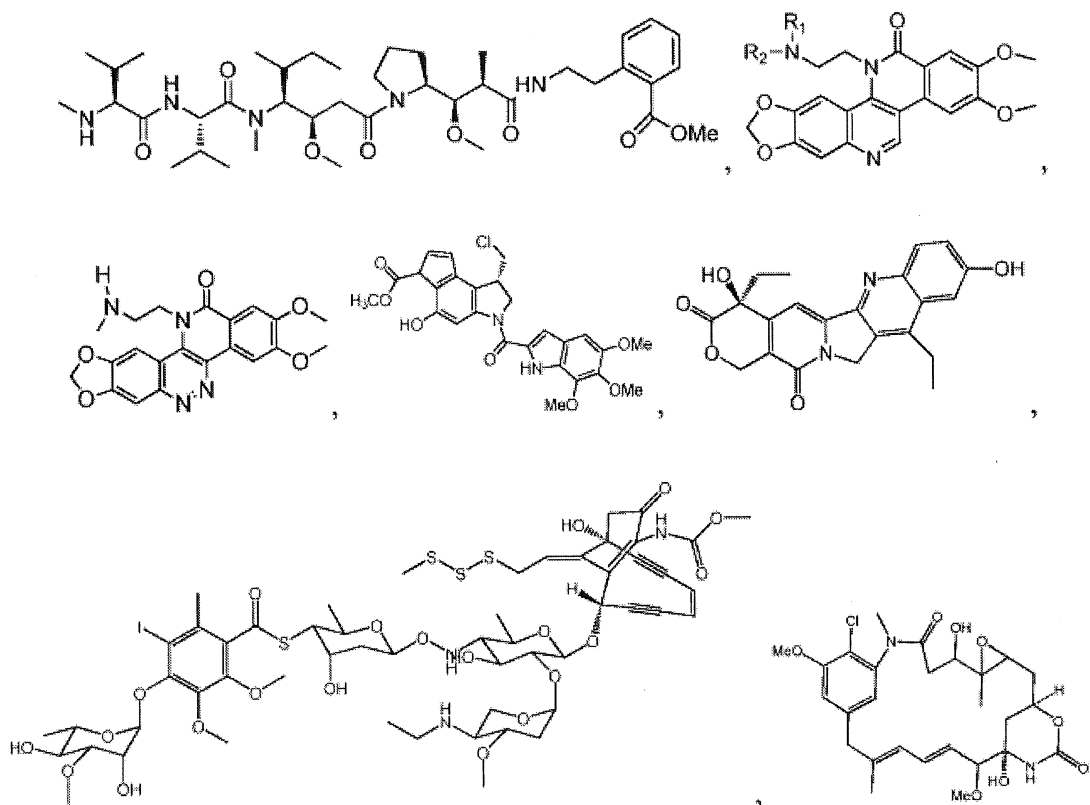
trong đó R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, và R<sup>5</sup> là H, alkyl, hoặc aryl.



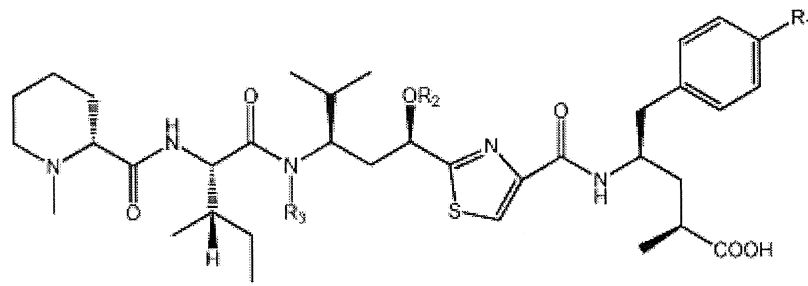
5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 4, trong đó một hoặc nhiều điều kiện sau được đáp ứng:

a) độc tố tế bào được chọn từ nhóm các độc tố tế bào được mô tả bên dưới:





và



trong đó  $R^1$  = alkyl, aryl, alkoxy, aryloxy,  $R^2$ ,  $R^3$  = alkyl, aryl

b) nhóm chức phản ứng lại kích thích được liên kết qua liên kết oxim hoặc hydrazon với gốc sacarit của glycan; và

c) nhóm chức phản ứng lại kích thích được liên kết qua liên kết oxim hoặc hydrazon với gốc sacarit của glycan, trong đó gốc sacarit là gốc axit sialic hoặc galactosa ở vị trí cuối của glycan.

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, kháng thể này bao gồm miền Fc của IgG1 ở người bao gồm gốc asparagin ở vị trí 297, theo cách đánh số của EU; gốc asparagin được glycosyl hóa ở vị trí 298, theo cách

đánh số của EU; gốc alanin ở vị trí axit amin 299, theo cách đánh số của EU; và gốc serin ở vị trí axit amin 300, theo cách đánh số của EU.

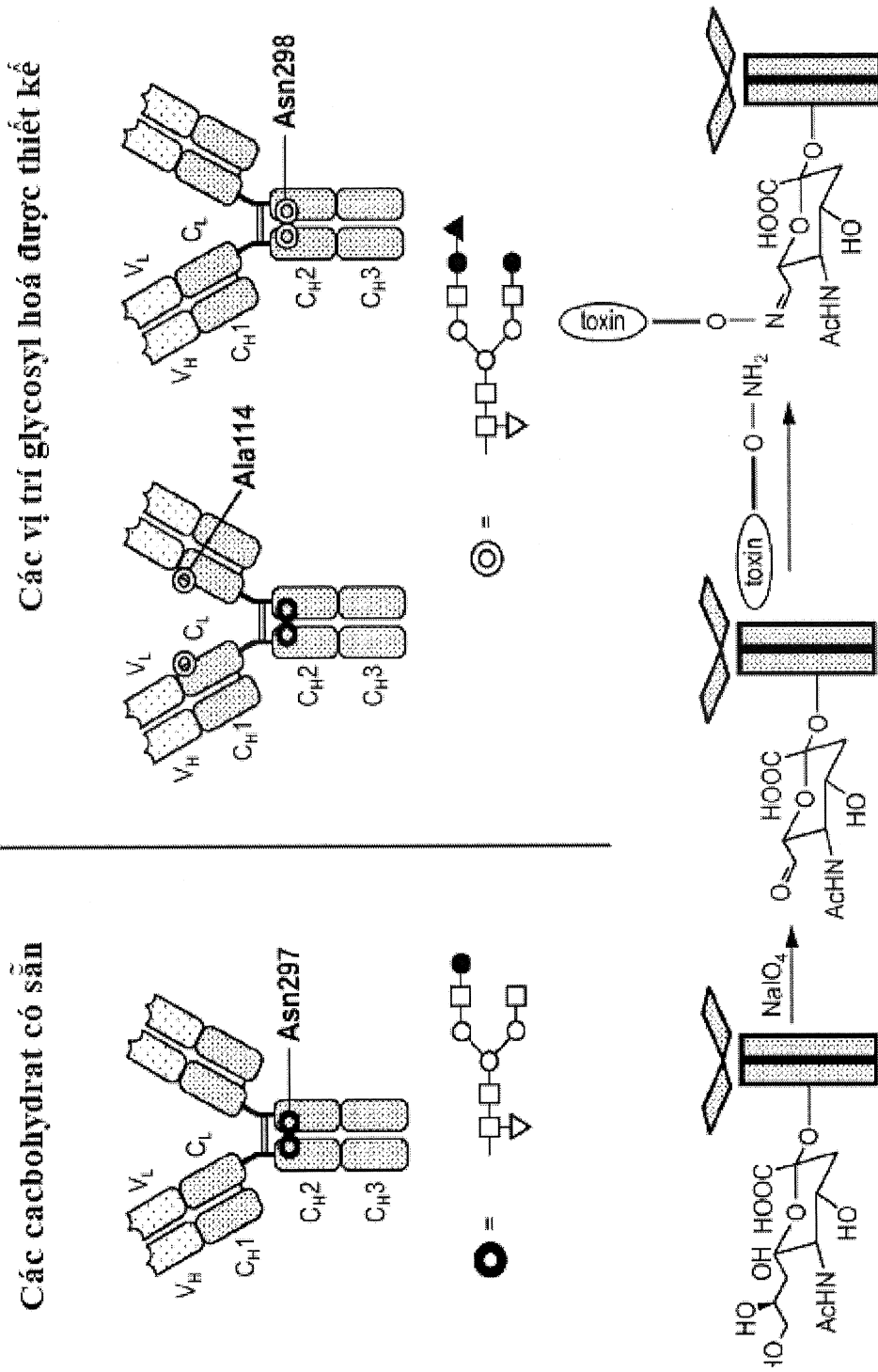
7. Chế phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên và chất mang hoặc tá dược được dùng.

8. Polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.

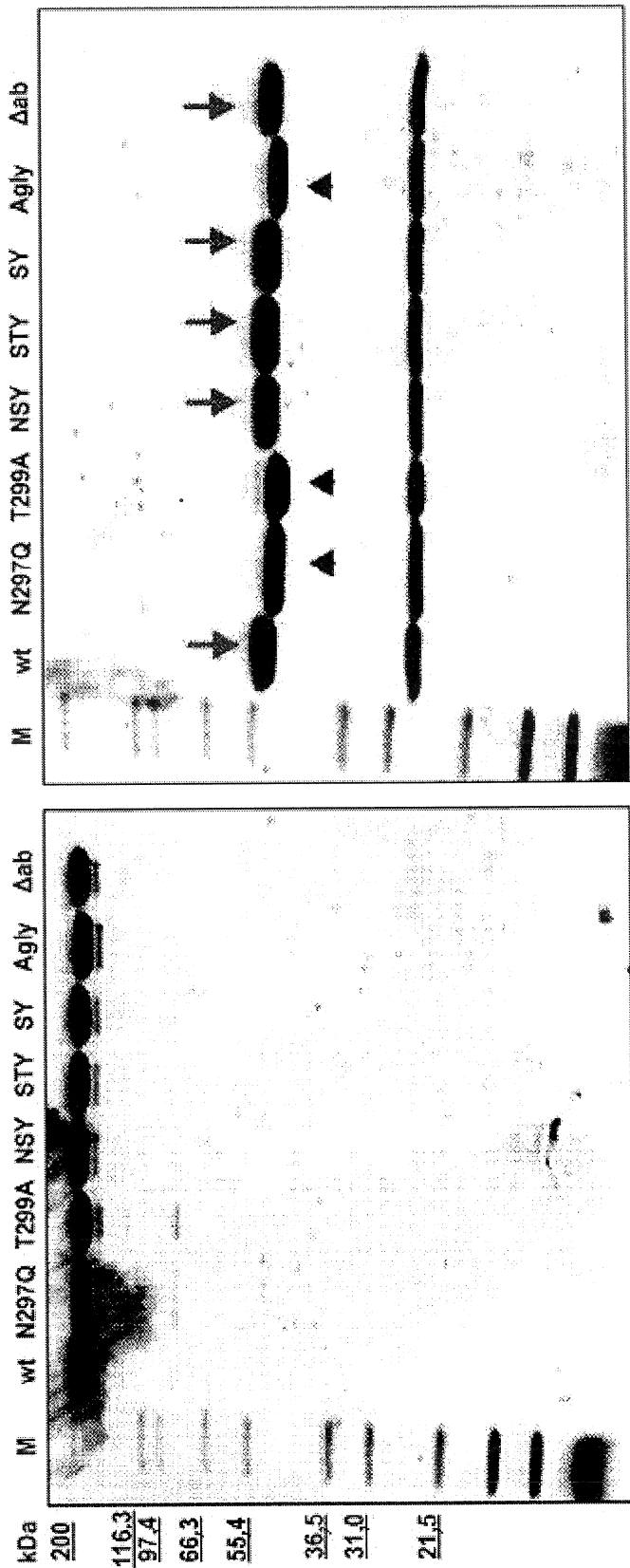
9. Vector chứa polynucleotit theo điểm 8.

10. Tế bào chủ chứa polynucleotit theo điểm 8 hoặc vector theo điểm 9.

11. Phương pháp tạo kháng thể bao gồm biểu hiện polynucleotit theo điểm 8 hoặc vector theo điểm 9 trong tế bào.



Hình. 1



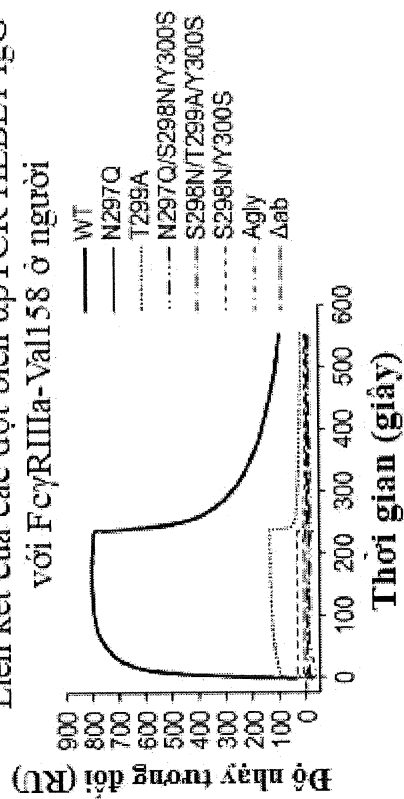
Không bị suy giảm

Bị suy giảm

Hình. 2

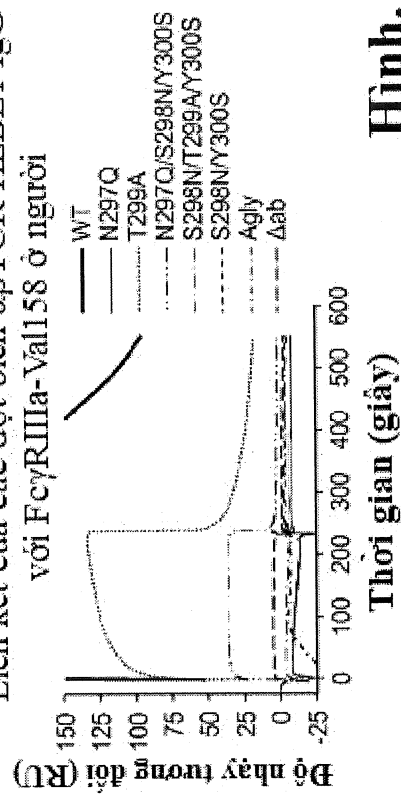
### Quy mô đầy đủ: CD16a-Val158

Liên kết của các đột biến  $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG với Fc $\gamma$ RIIIa-Val158 ở người



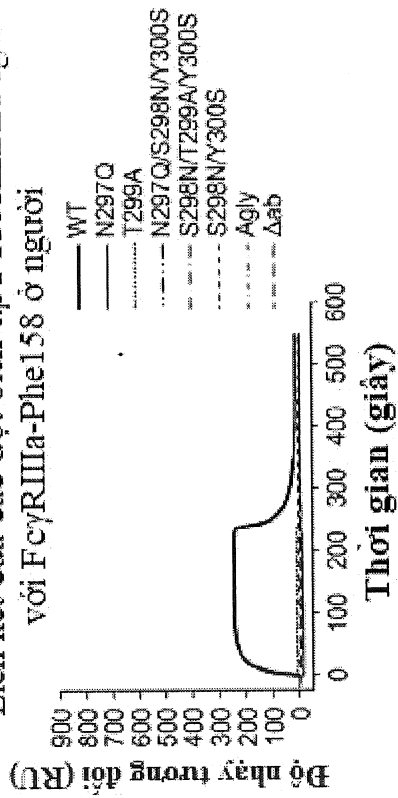
Phóng to:

Liên kết của các đột biến  $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG với Fc $\gamma$ RIIIa-Val158 ở người



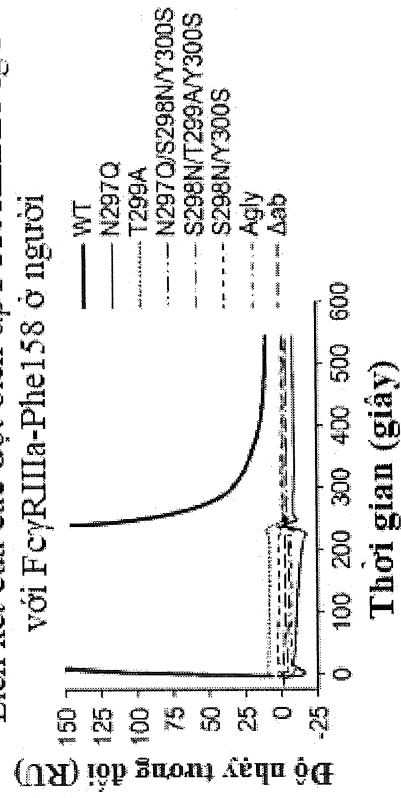
### Quy mô đầy đủ: CD16a-Phe158

Liên kết của các đột biến  $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG với Fc $\gamma$ RIIIa-Phe158 ở người



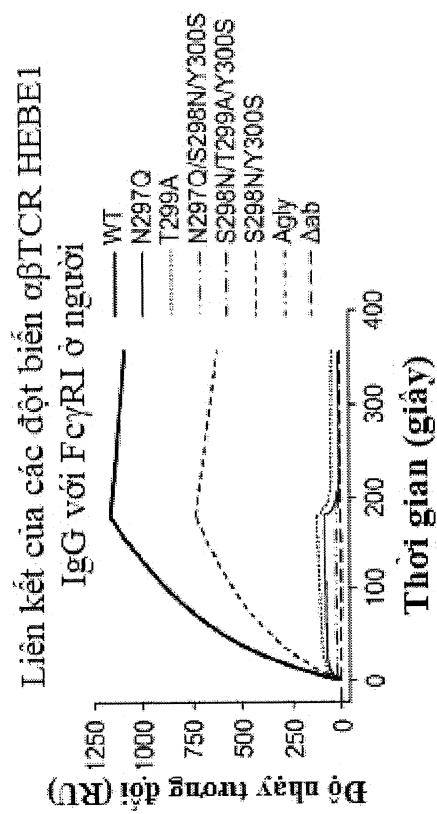
Phóng to:

Liên kết của các đột biến  $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG với Fc $\gamma$ RIIIa-Phe158 ở người

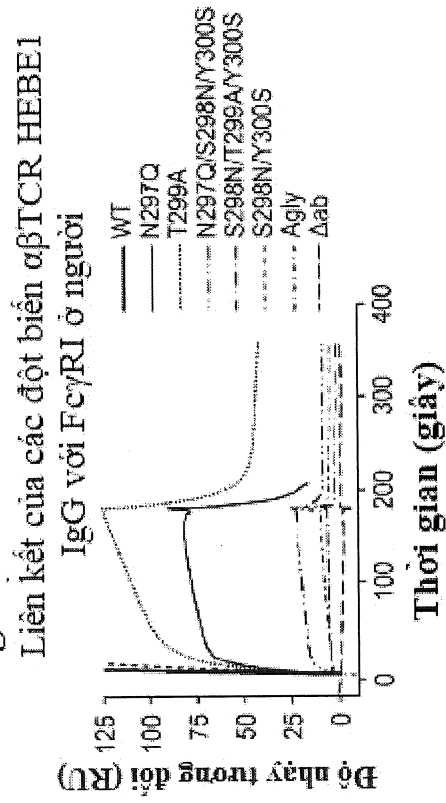


Hình. 3

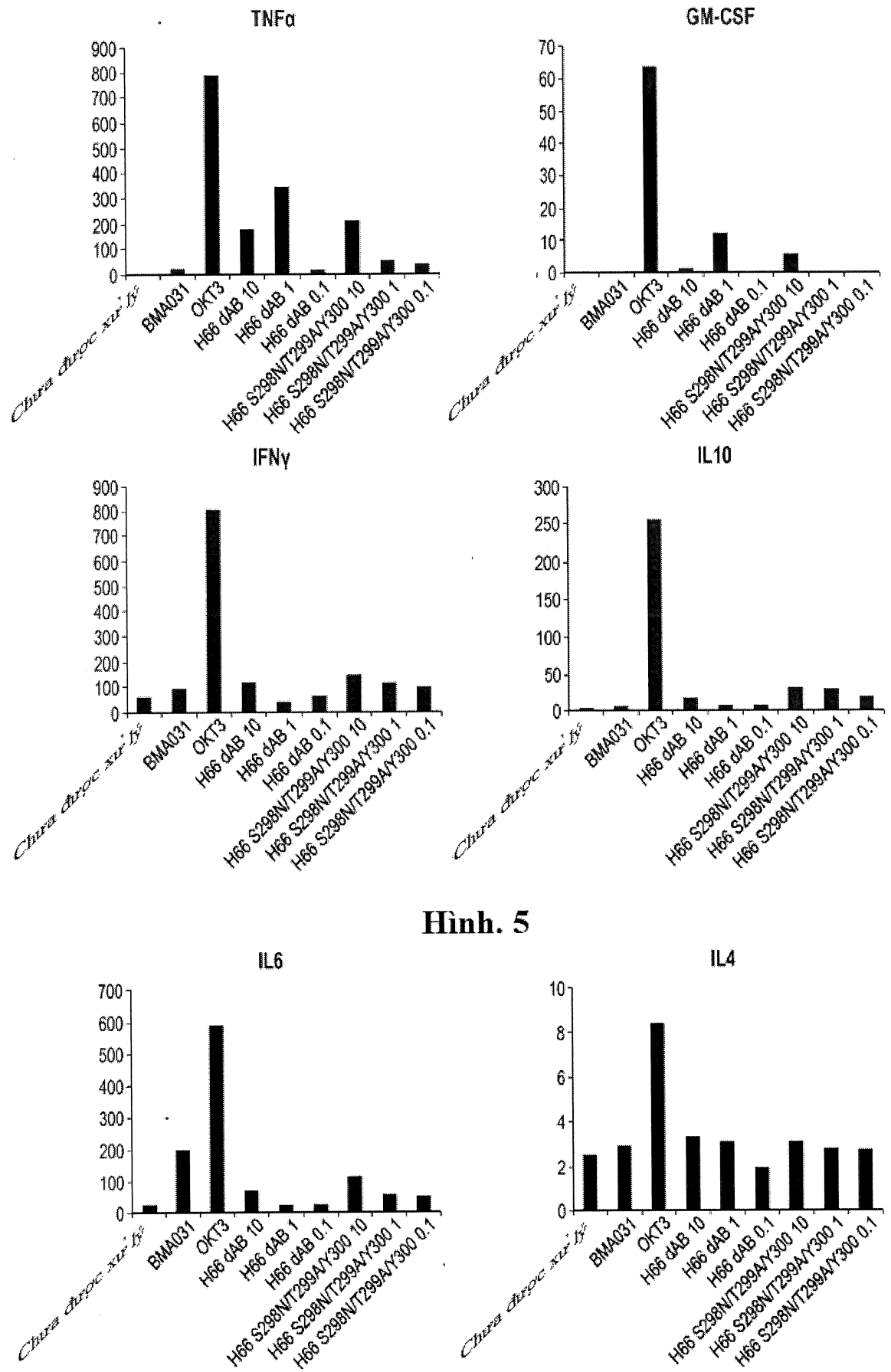
### Quy mô đầy đủ :



### Phóng to :

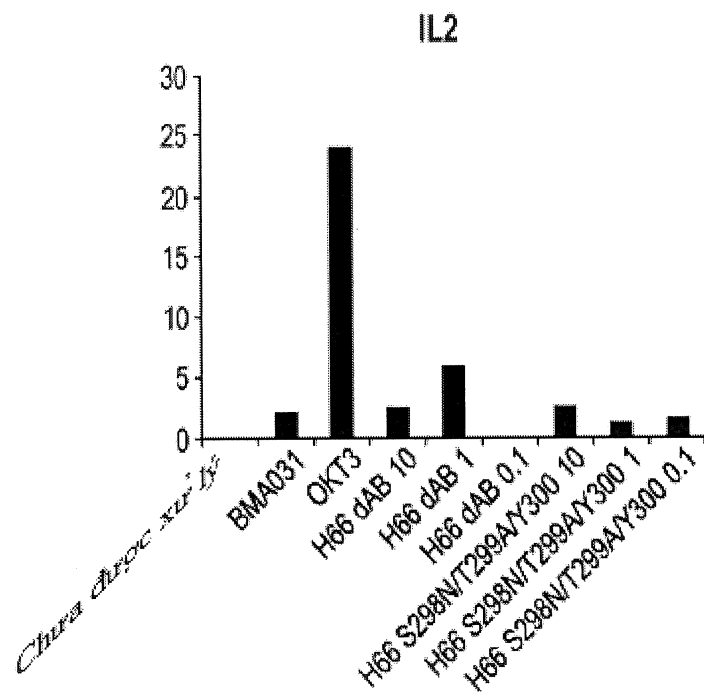
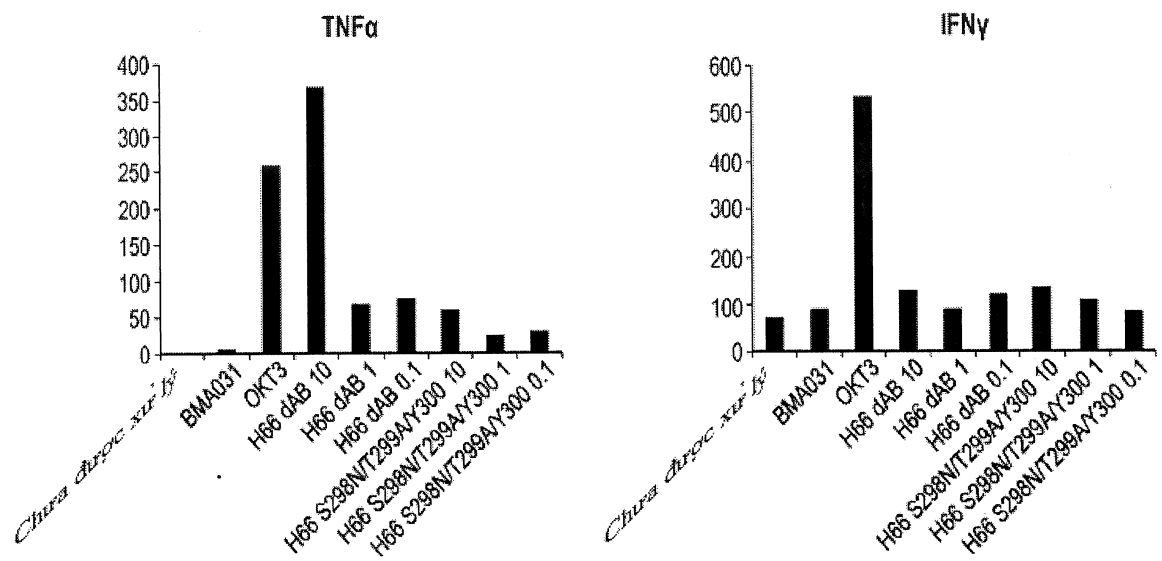


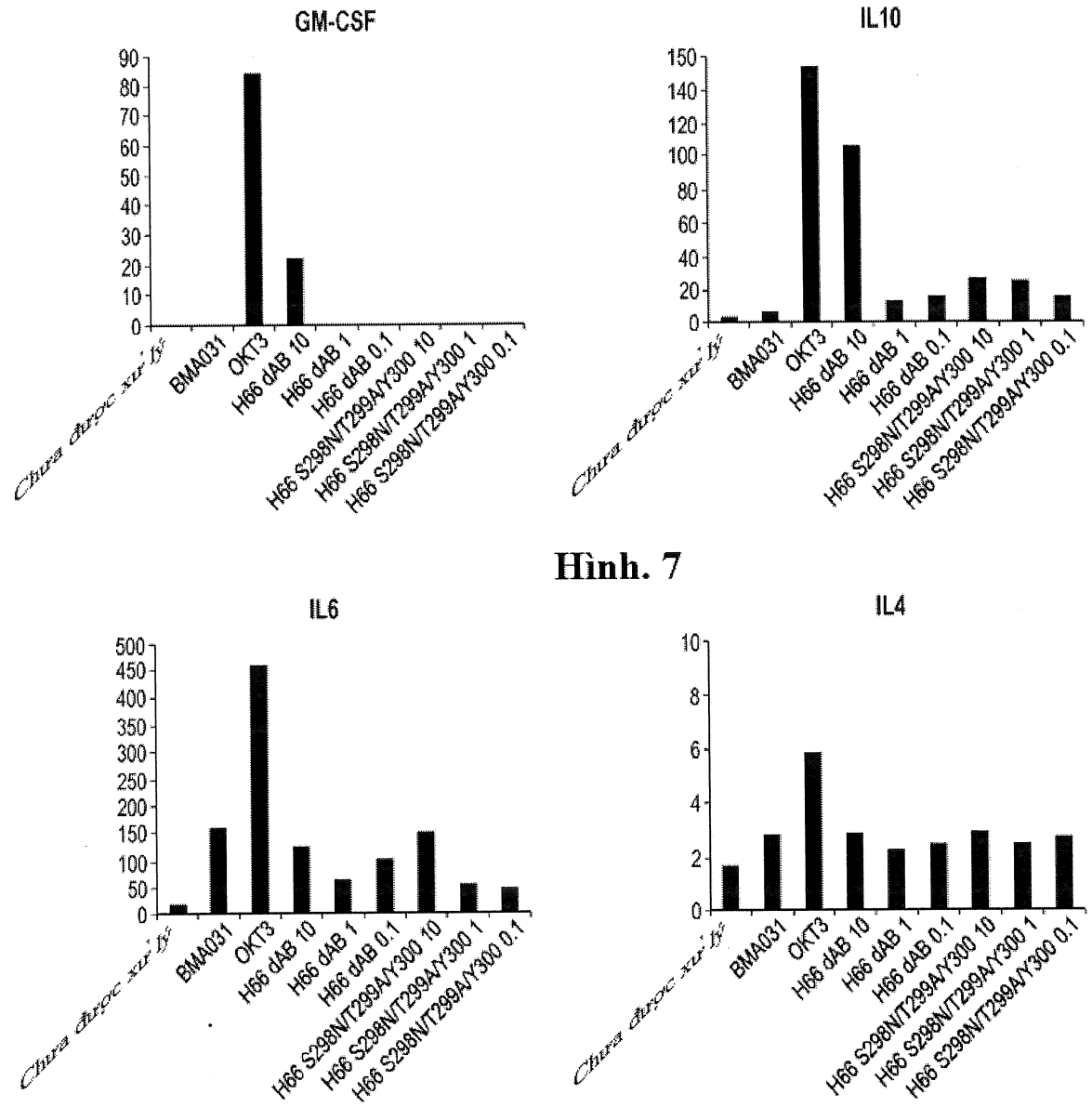
**Hình. 4**



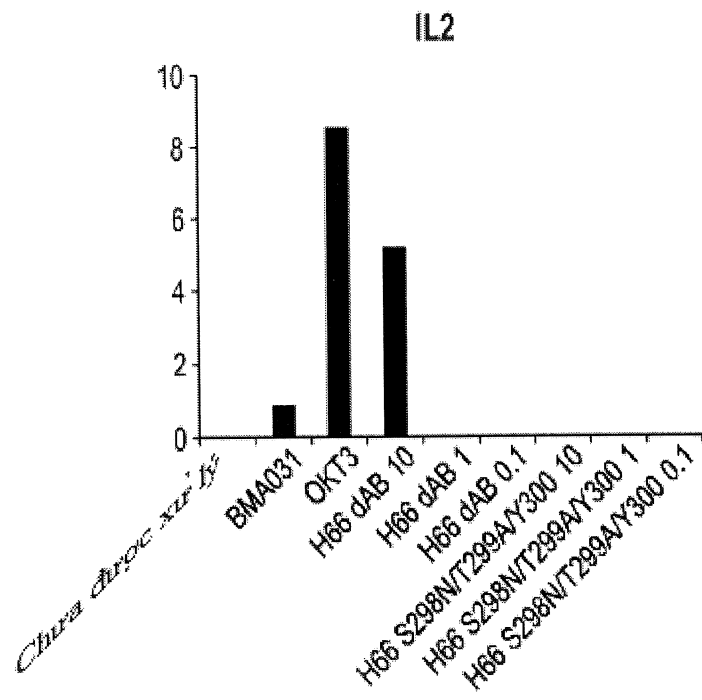
Hình. 5



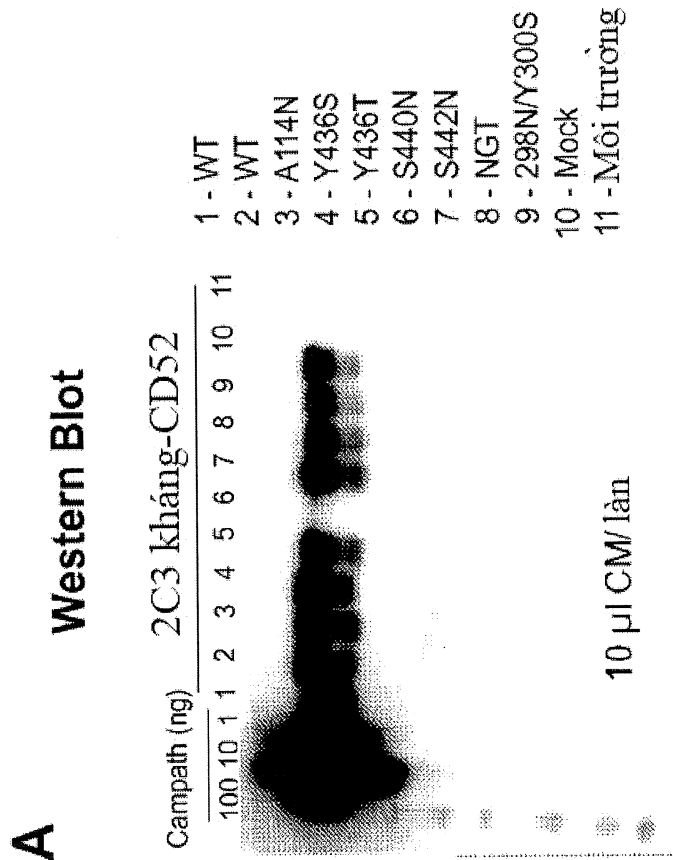
**Hình. 6**



Hình. 7



**Hình. 8**

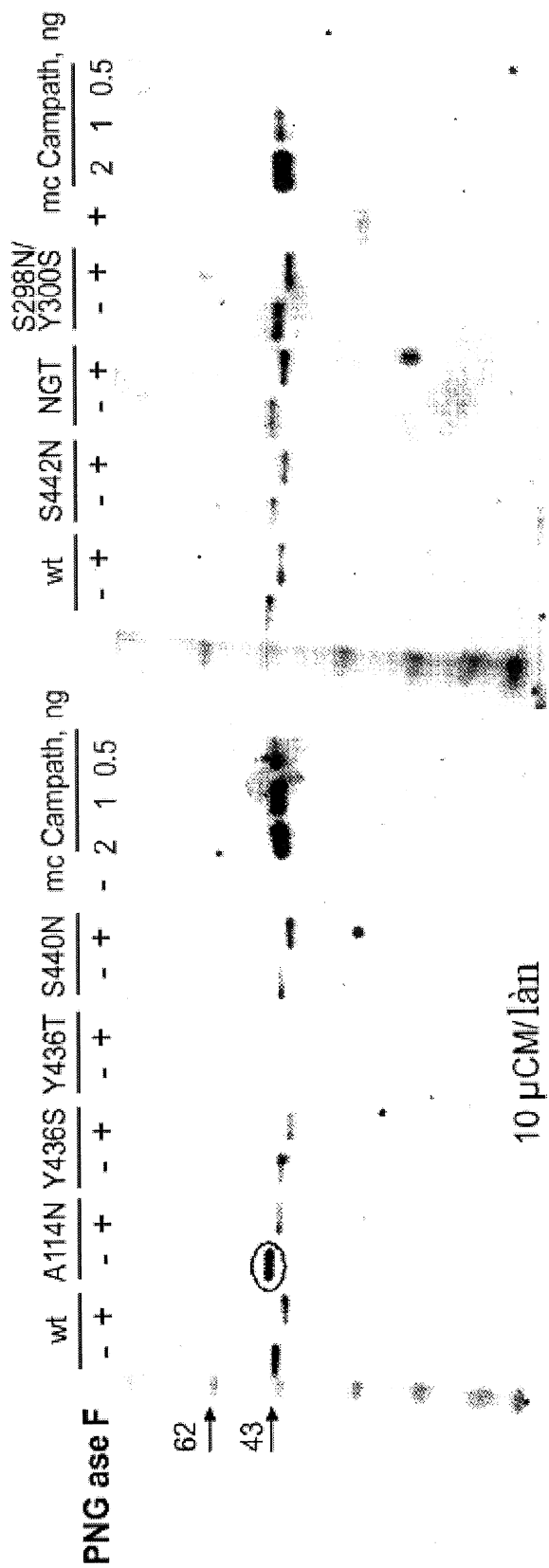


**B**

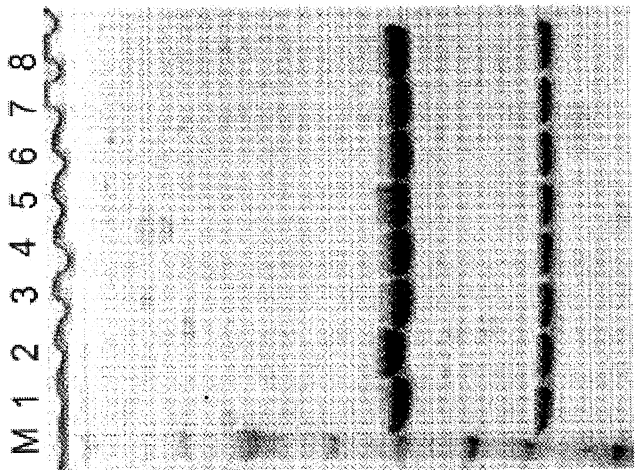
**Biacore**

| Không xác định       | Nồng độ (µg/mL) | Độ nhạy tương đối (RU) | Nồng độ tính toán (M) | Nồng độ tính toán (µg/mL) |
|----------------------|-----------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 2C3 trong môi trường | 3,00            | 855,75                 | 2,45E-08              | 3,669                     |
| 2C3 trong môi trường | 3,00            | 860,96                 | 2,47E-08              | 3,710                     |
| 2C3 trong môi trường | 3,00            | 866,89                 | 2,51E-08              | 3,758                     |
| A114N                |                 | 146,5                  | 1,60E-09              | 0,240                     |
| Mock                 |                 | 87,84                  | 8,62E-10              | 0,129                     |
| NGT                  |                 | 124,52                 | 1,30E-09              | 0,196                     |
| S298N/Y300S          |                 | 112,14                 | 1,15E-09              | 0,172                     |
| S440N                |                 | 146,36                 | 1,60E-09              | 0,240                     |
| S442N                |                 | 121,21                 | 1,26E-09              | 0,189                     |
| WT (Katya)           |                 | 148,41                 | 1,63E-09              | 0,244                     |
| WT (Tim)             |                 | 148,08                 | 1,62E-09              | 0,244                     |
| Y436S                |                 | 158,72                 | 1,78E-09              | 0,267                     |
| Y436T                |                 | 84,27                  | 8,23E-10              | 0,123                     |
| Môi trường được ủ    |                 | 87,38                  | 8,57E-10              | 0,129                     |

Hình. 9

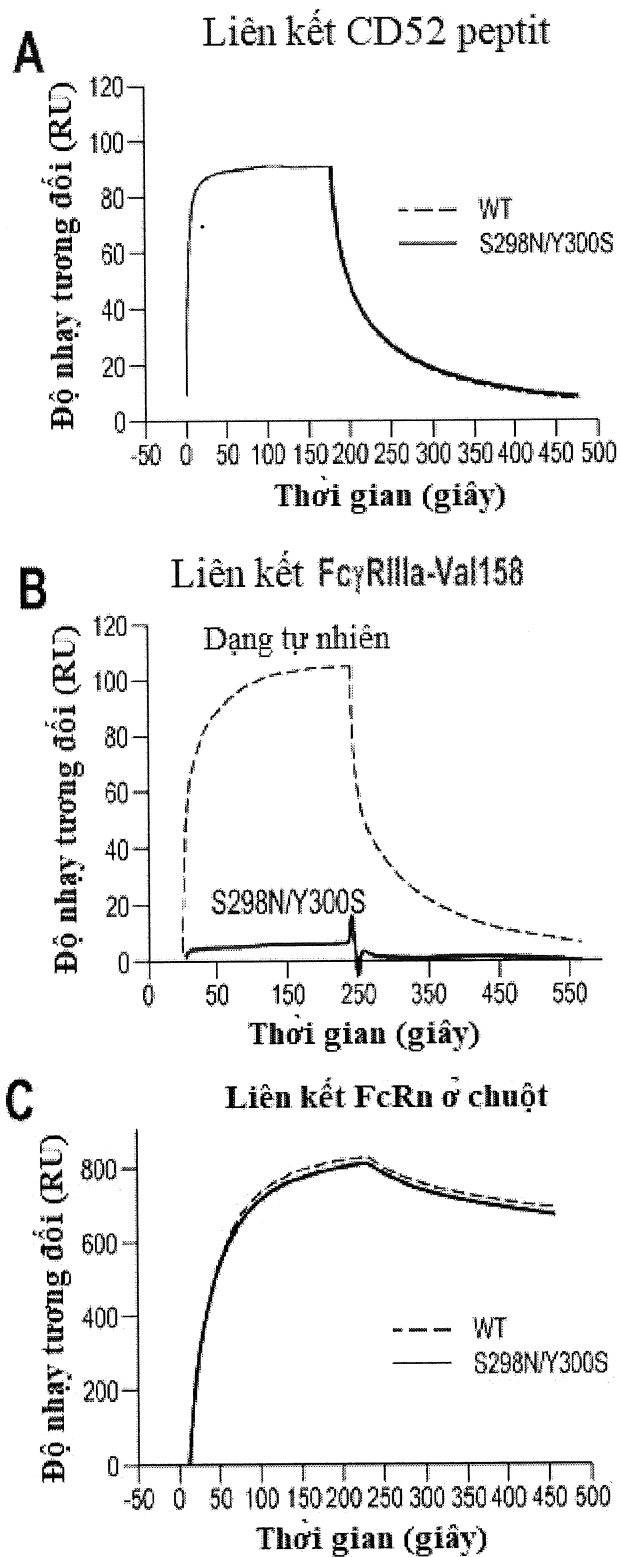


Hình. 10

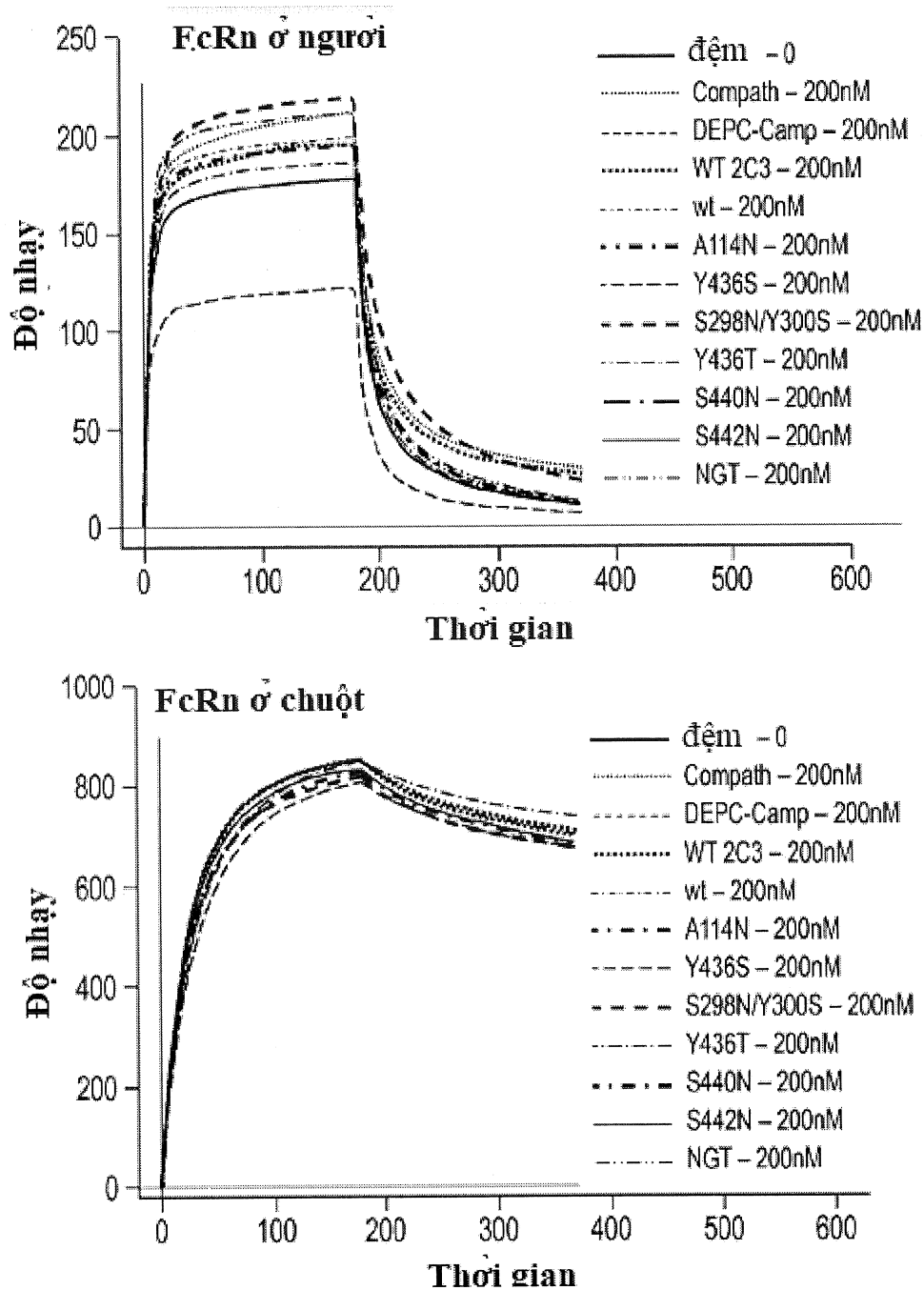


| Làn | Đột biến    | mg/ml |
|-----|-------------|-------|
| 1   | wt          | 2.66  |
| 2   | A114N       | 2.99  |
| 3   | Y436S       | 1.61  |
| 4   | S298N/Y300S | 0.99  |
| 5   | Y436T       | 0.41  |
| 6   | S440N       | 1.21  |
| 7   | S442N       | 1.62  |
| 8   | NGT         | 2.21  |

Hình. 11

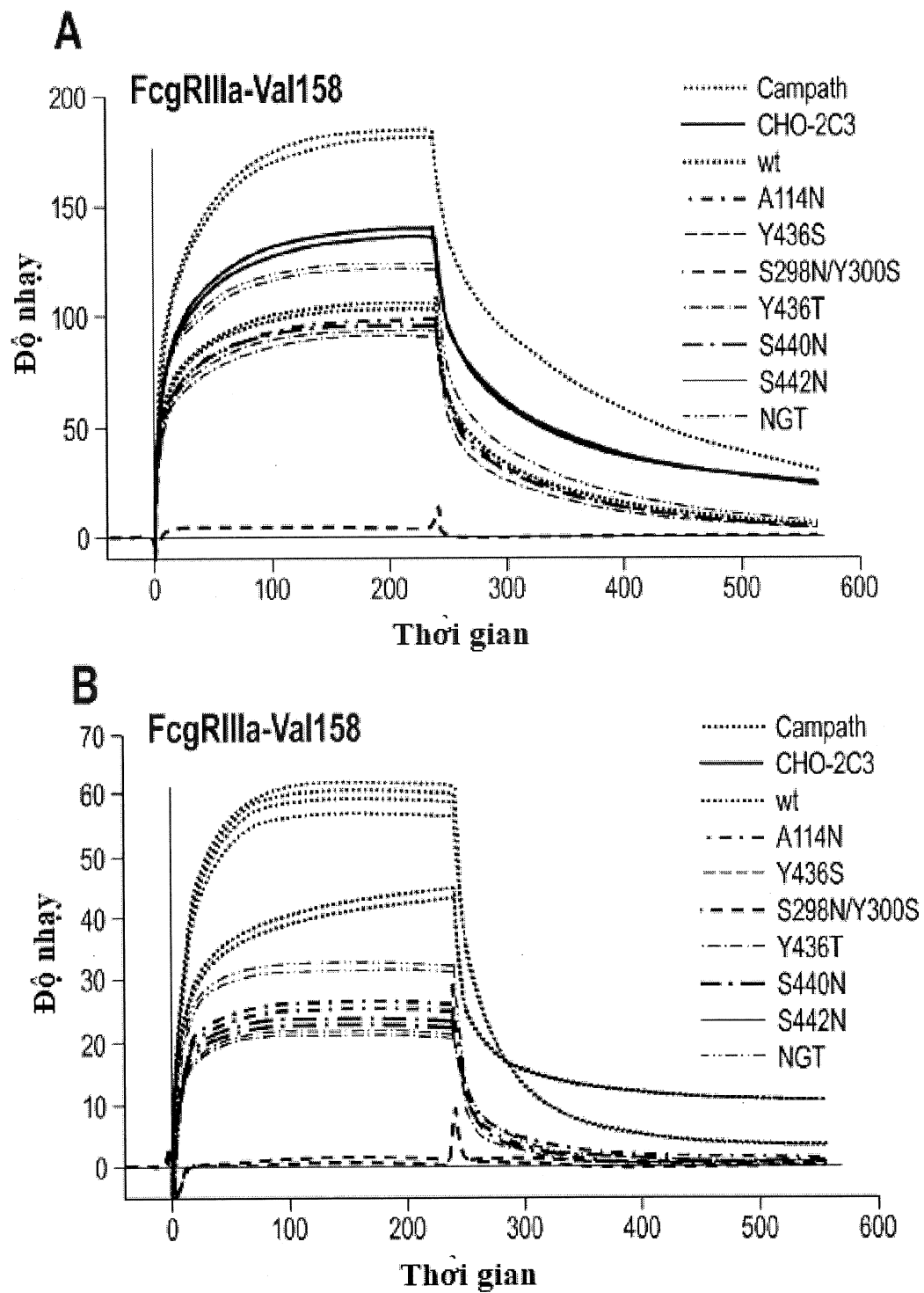


**Hình. 12**

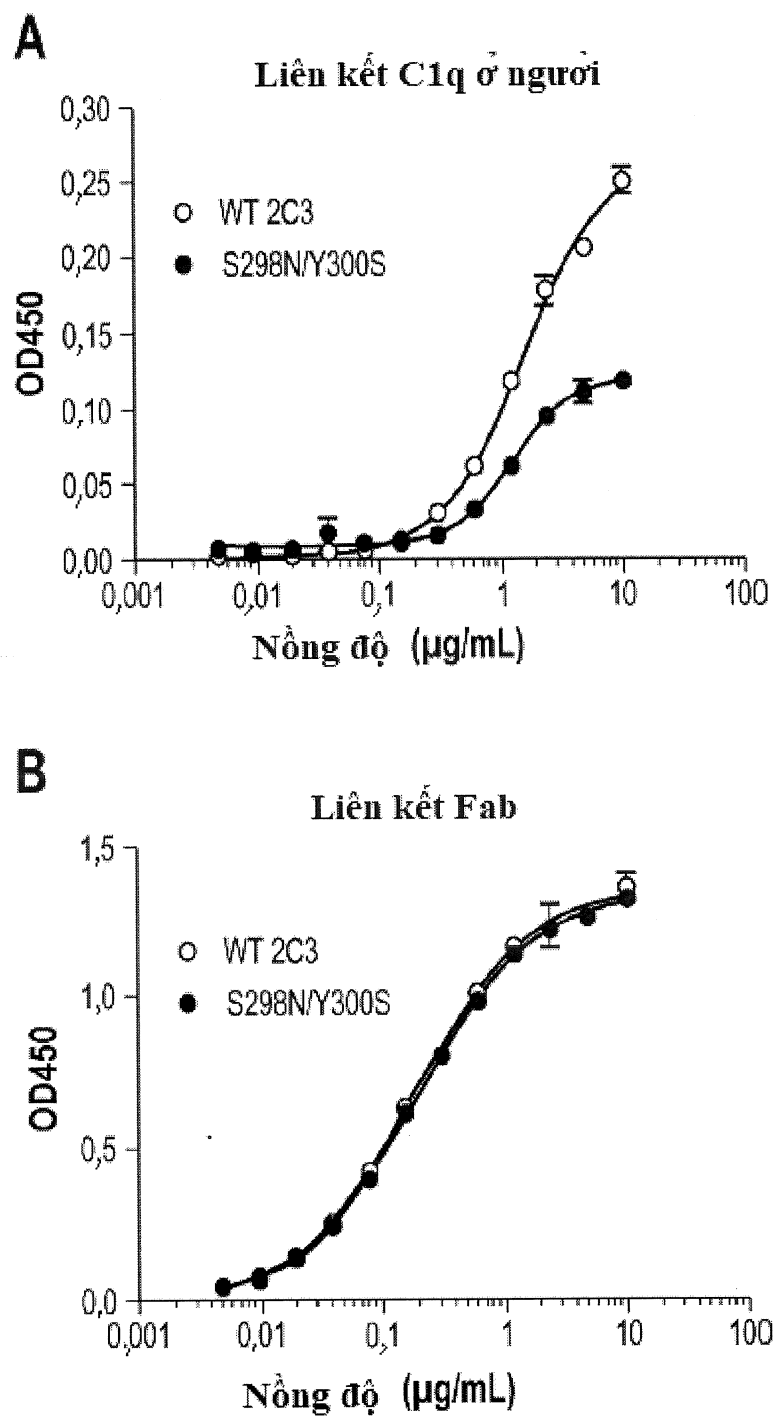


Hình. 13





Hình. 14

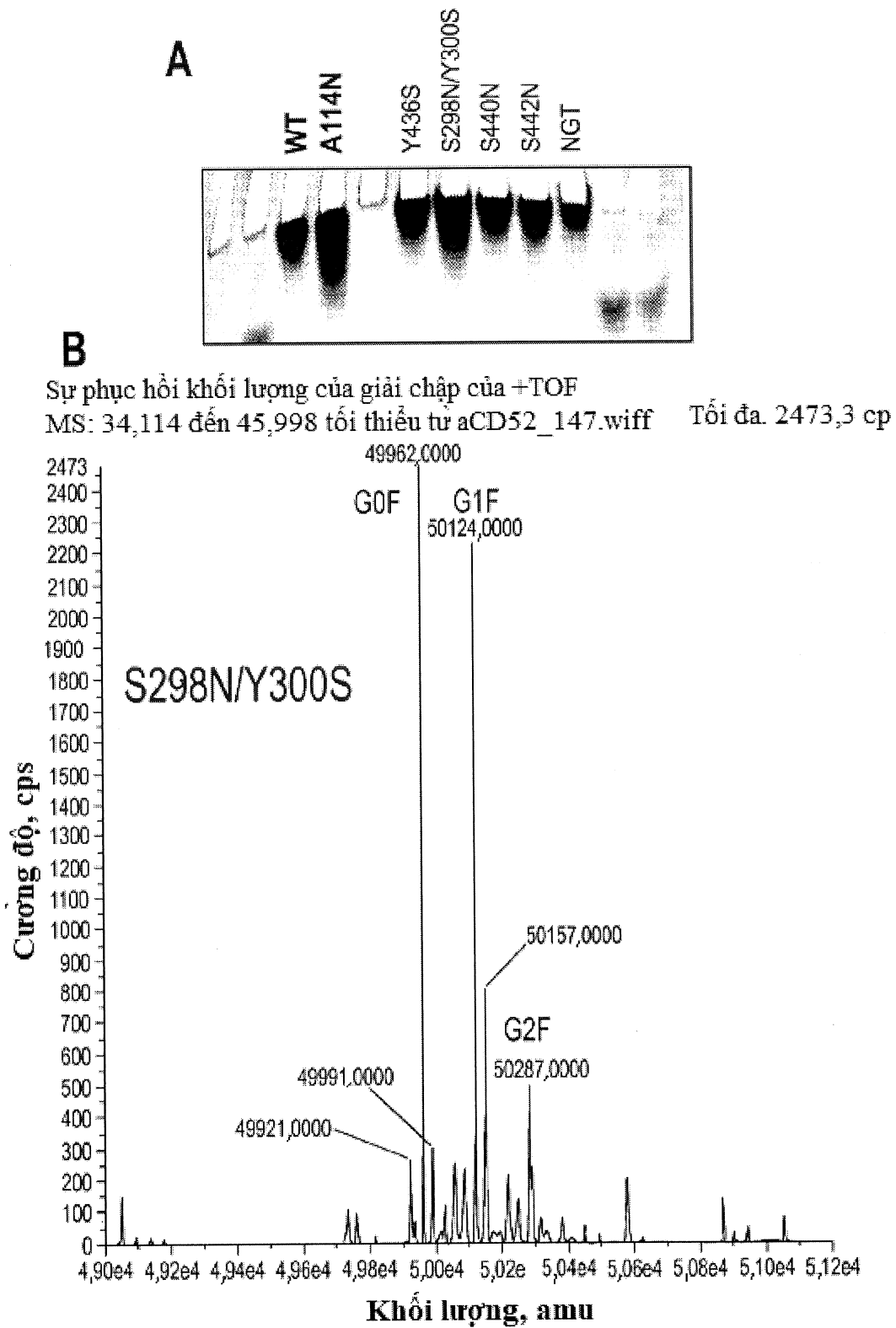
**Hình. 15**

| Mẫu         | $k_a(\times 10^6/\text{Ms})$ | $k_d(\times 10^{-2}/\text{s})$ | $R_{\text{max}}(\text{RU})$ | $K_D(\text{nM})$ |
|-------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------|
| GLD52       | 7,0                          | 1,7                            | 67,0                        | 2,44             |
| WT2C3       | 6,0                          | 1,1                            | 64,2                        | 1,75             |
| A114N       | 4,7                          | 1,1                            | 59,5                        | 2,45             |
| Y436S       | 5,9                          | 1,0                            | 66,9                        | 1,73             |
| S298N?Y300S | 5,7                          | 1,0                            | 63,3                        | 1,80             |
| Y436T       | 4,8                          | 0,9                            | 65,7                        | 1,95             |
| S440N       | 5,8                          | 1,1                            | 66,8                        | 1,84             |
| S442N       | 5,7                          | 1,1                            | 66,2                        | 1,85             |
| NGT         | 7,9                          | 1,1                            | 70,2                        | 1,35             |

**Hình. 16**

| Mẫu    | K bật ( $\times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) | K tắt ( $\times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ ) | KD (nM) |
|--------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|---------|
| WT 2C3 | 5,2                                                 | 1,1                                      | 2,1     |
| A114N  | 5,3                                                 | 1,3                                      | 2,4     |

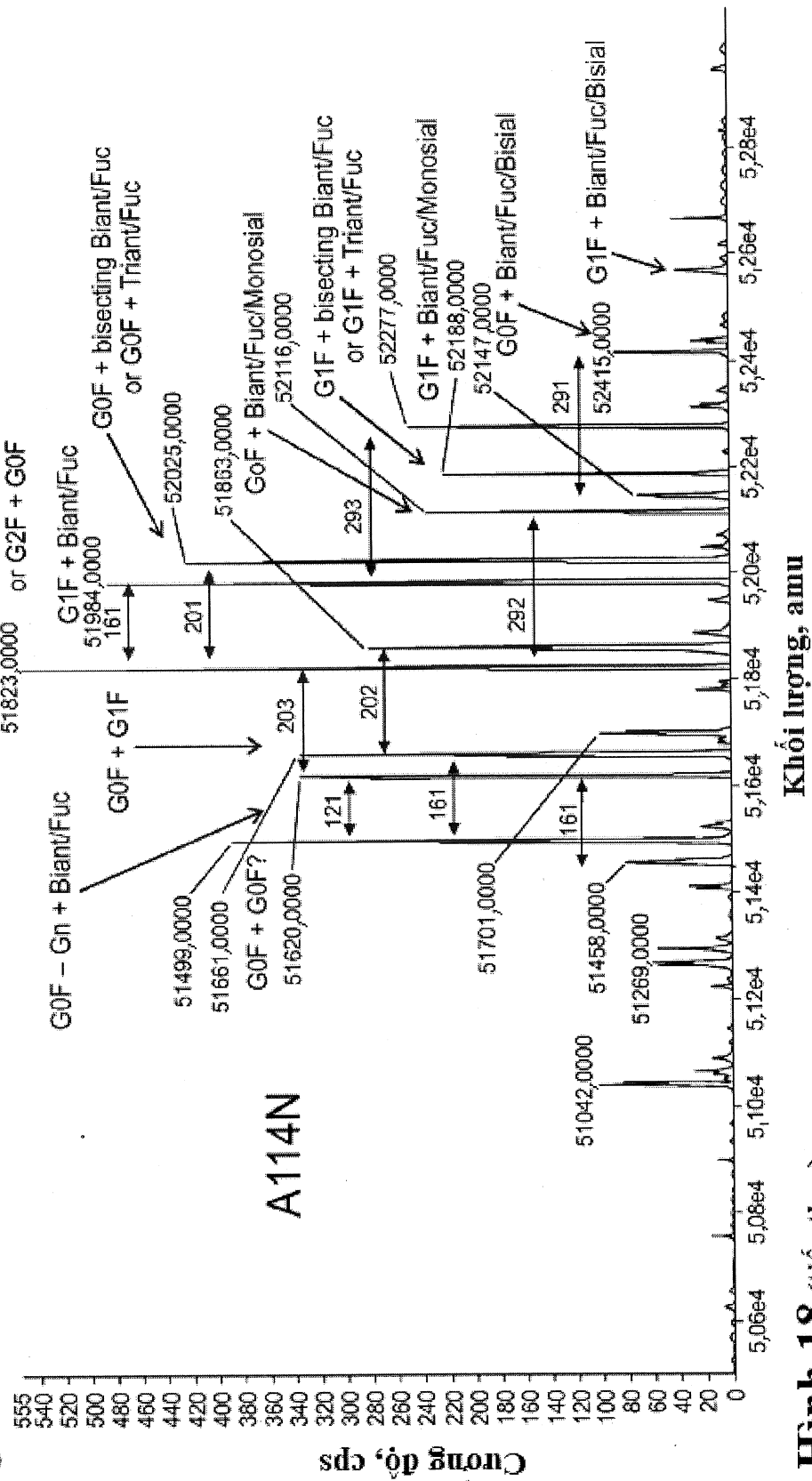
**Hình. 17**

**Hình. 18**

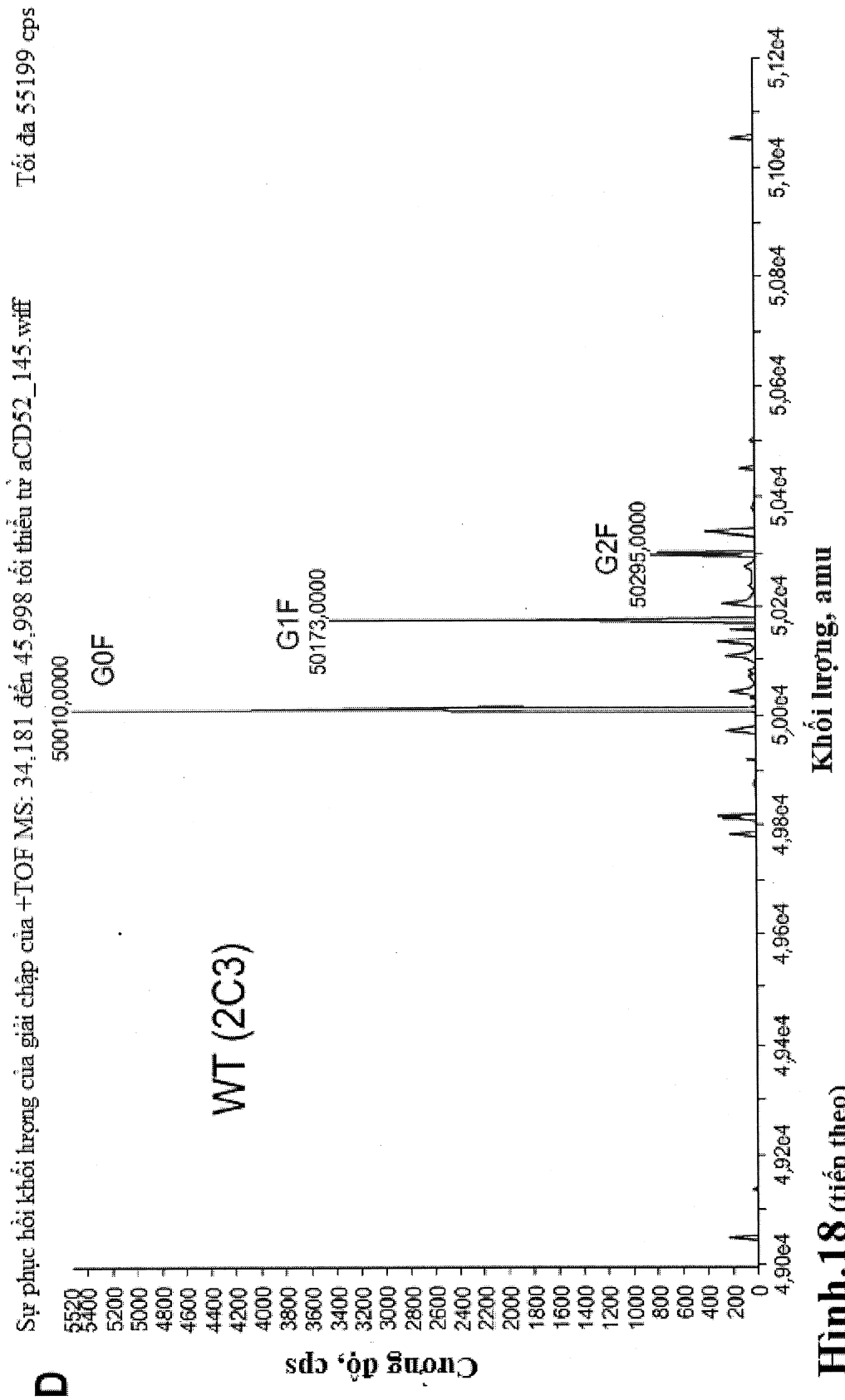
Tối đa: 554,5 cps

Sự phức hồi khối lượng của giải chấp của +TOF MS: 44,749 đến 45,249 tối thiểu từ aCD52\_148.wiff

C



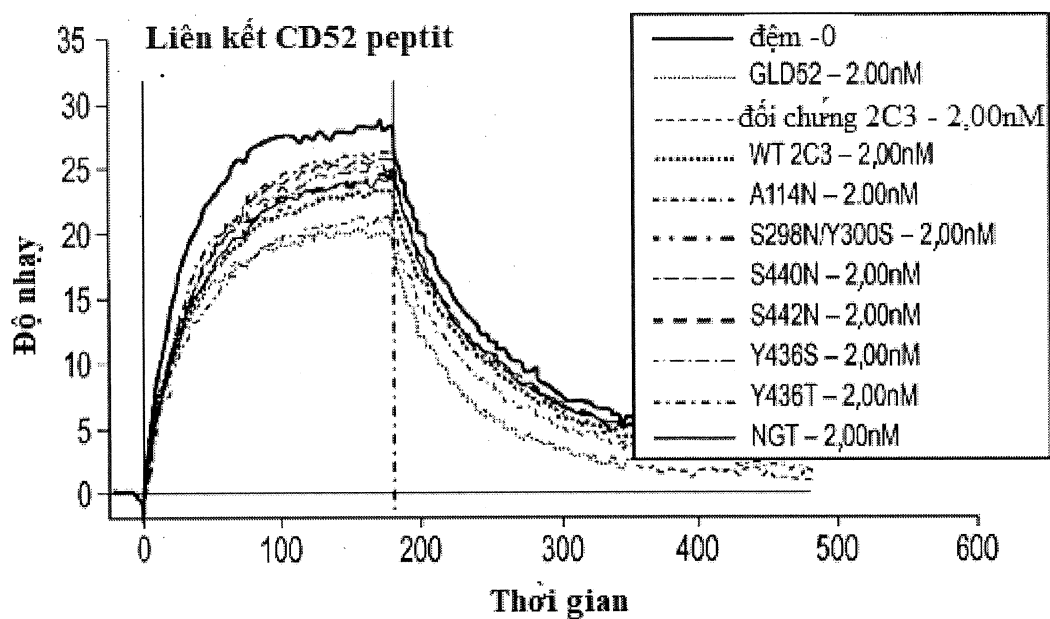
Hình.18 (tiếp theo)

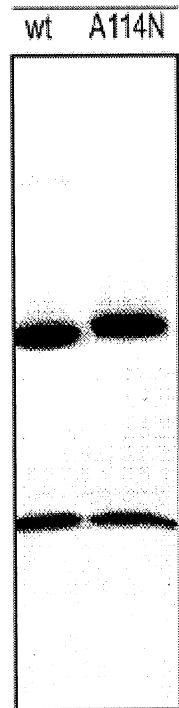


**Hình.18** (tiếp theo)

**A**

| Mẫu             | lô số      | Nồng độ Octet<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-----------------|------------|---------------------------------------|
| Môi trường Mock | 11/23/2009 | quá thấp                              |
| wt 2C3          | 11/23/2009 | 2,54                                  |
| A114N           | 11/23/2009 | 2,83                                  |
| S298N/Y300S     | 11/23/2009 | 1,36                                  |
| S440N           | 11/23/2009 | 1,32                                  |
| S442N           | 11/23/2009 | 1,21                                  |
| Y436S           | 11/23/2009 | 1,92                                  |
| Y436T           | 11/23/2009 | 0,34                                  |
| NGT             | 11/23/2009 | 1,90                                  |

**B****Hình. 19**

**Kháng-TEM1**

⇒ Chuỗi nặng được hyperglycosyl hoá  
⇒ Chuỗi nặng  
Chuỗi nhẹ

→ Chuỗi nhẹ

**Hình. 20**

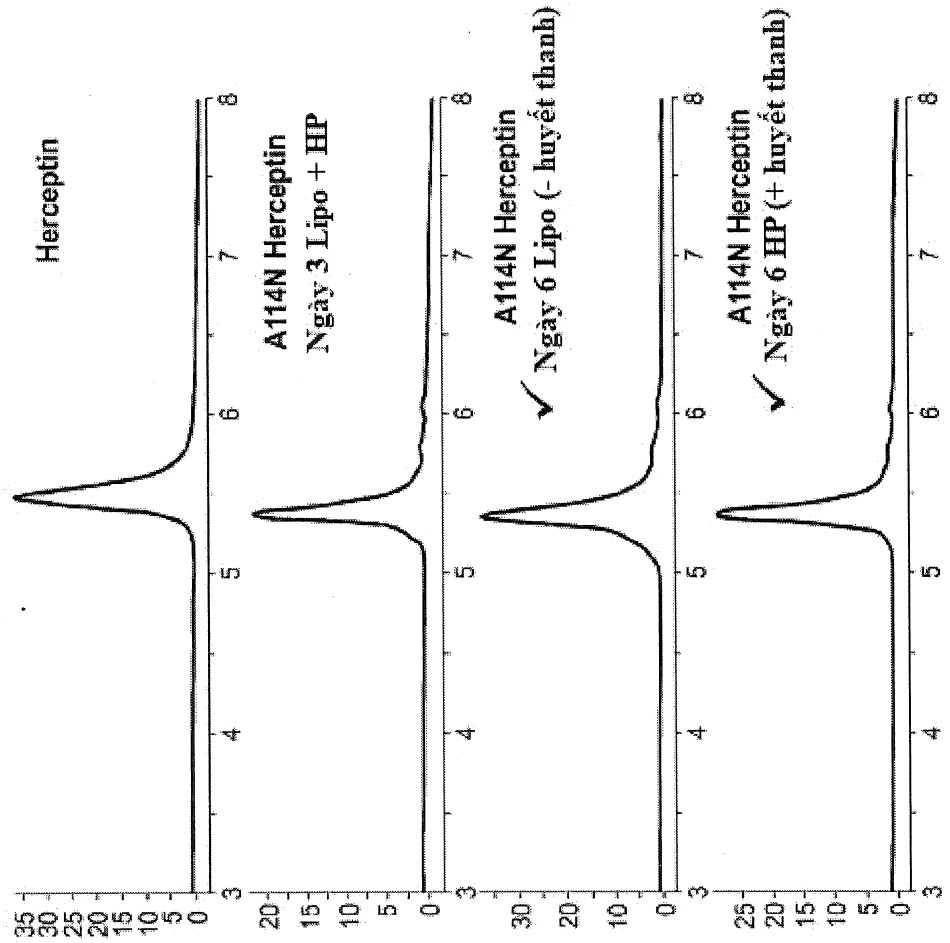


**SDS-PAGE Tris-glyxin 10%**

| Không bị giám          |                        |              | Bị giám                |                        |              |
|------------------------|------------------------|--------------|------------------------|------------------------|--------------|
| Ngày 6 (- huyết thanh) | Ngày 6 (+ huyết thanh) | Ngày 3 (hộp) | Ngày 6 (- huyết thanh) | Ngày 6 (+ huyết thanh) | Ngày 3 (hộp) |



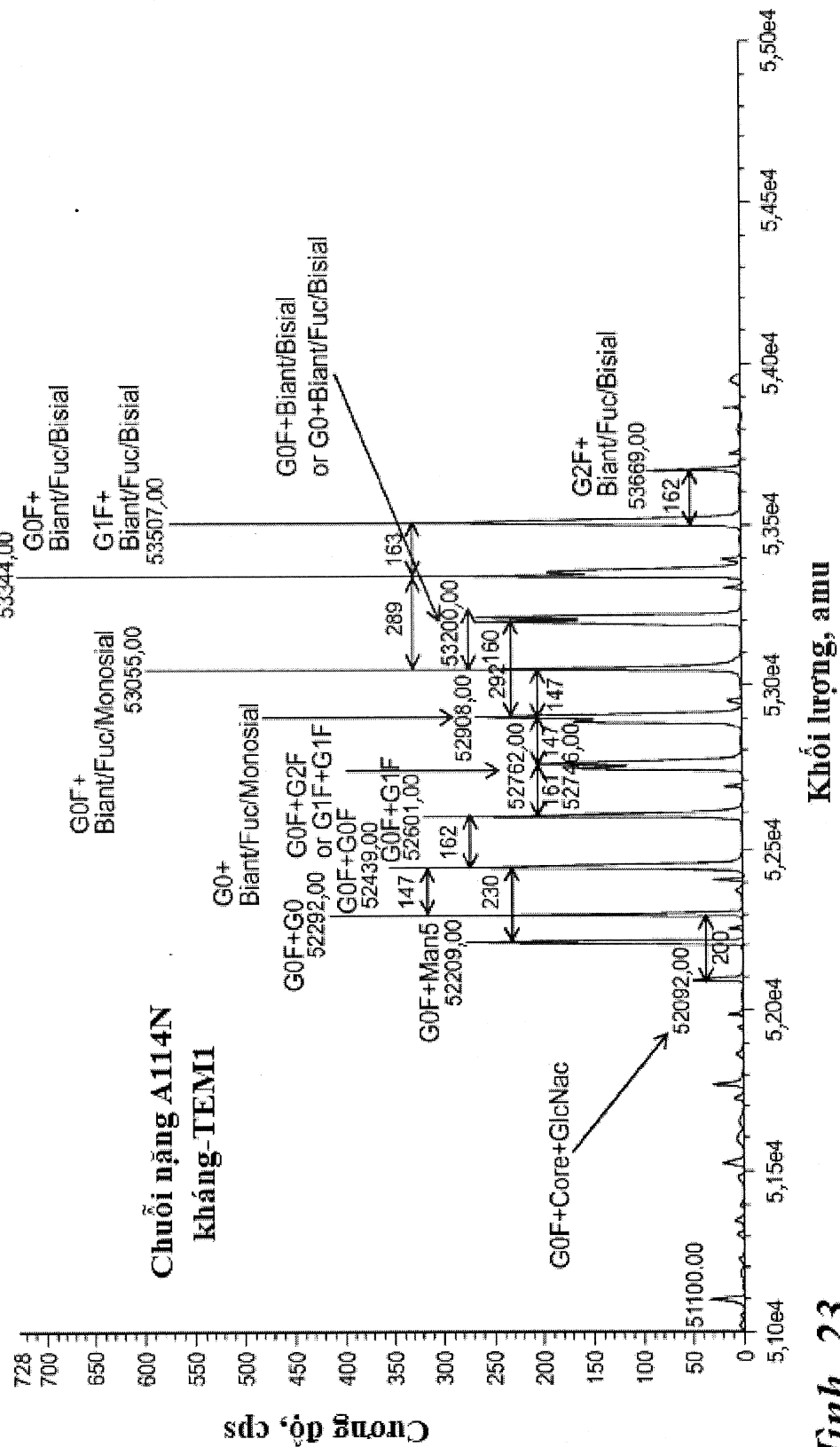
**Phân tích HIC của A114N Herceptin Tinh khiết**

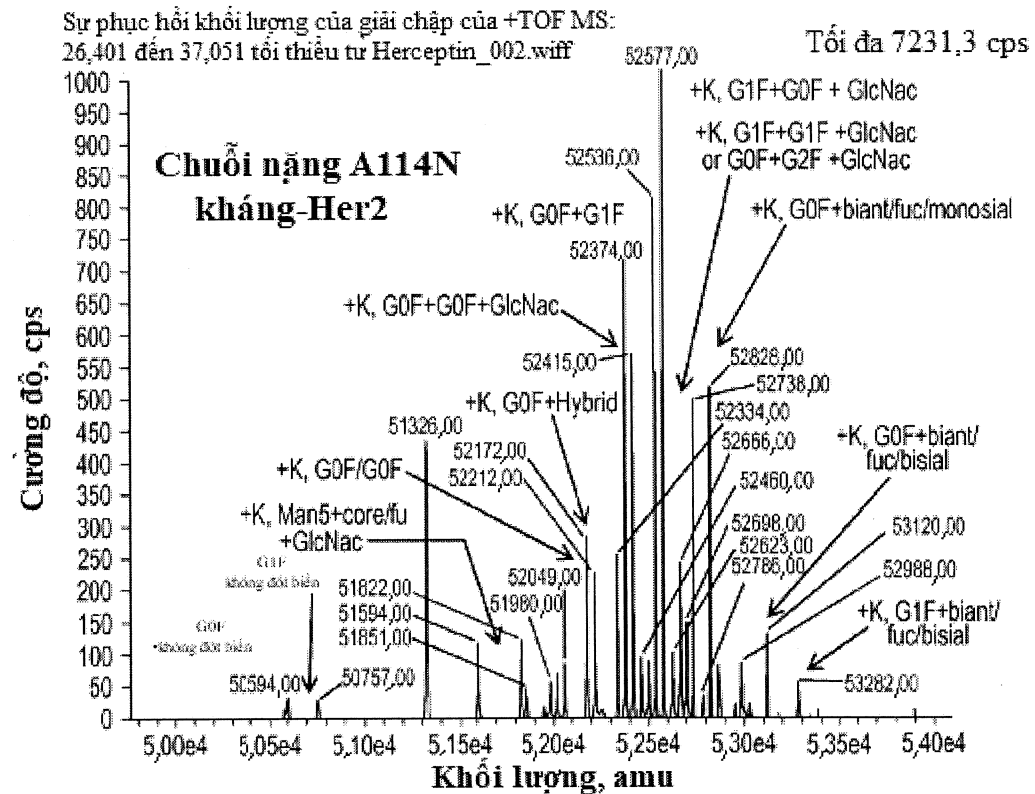
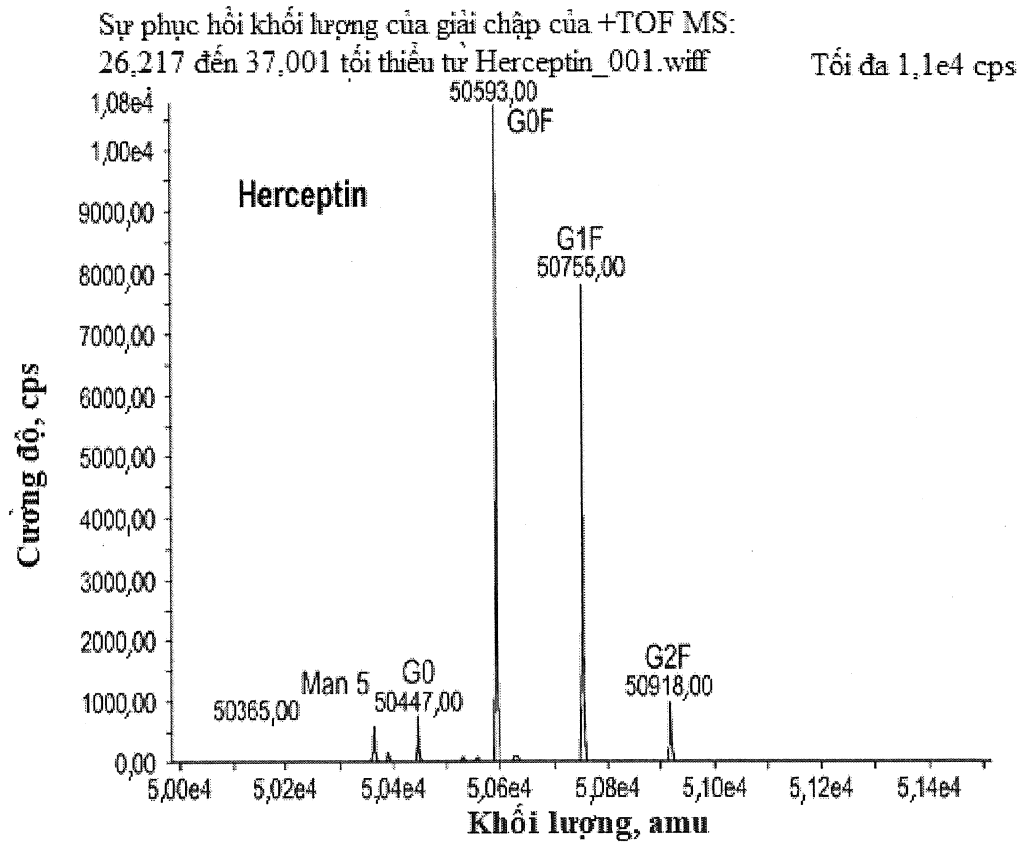


**Hình. 21**



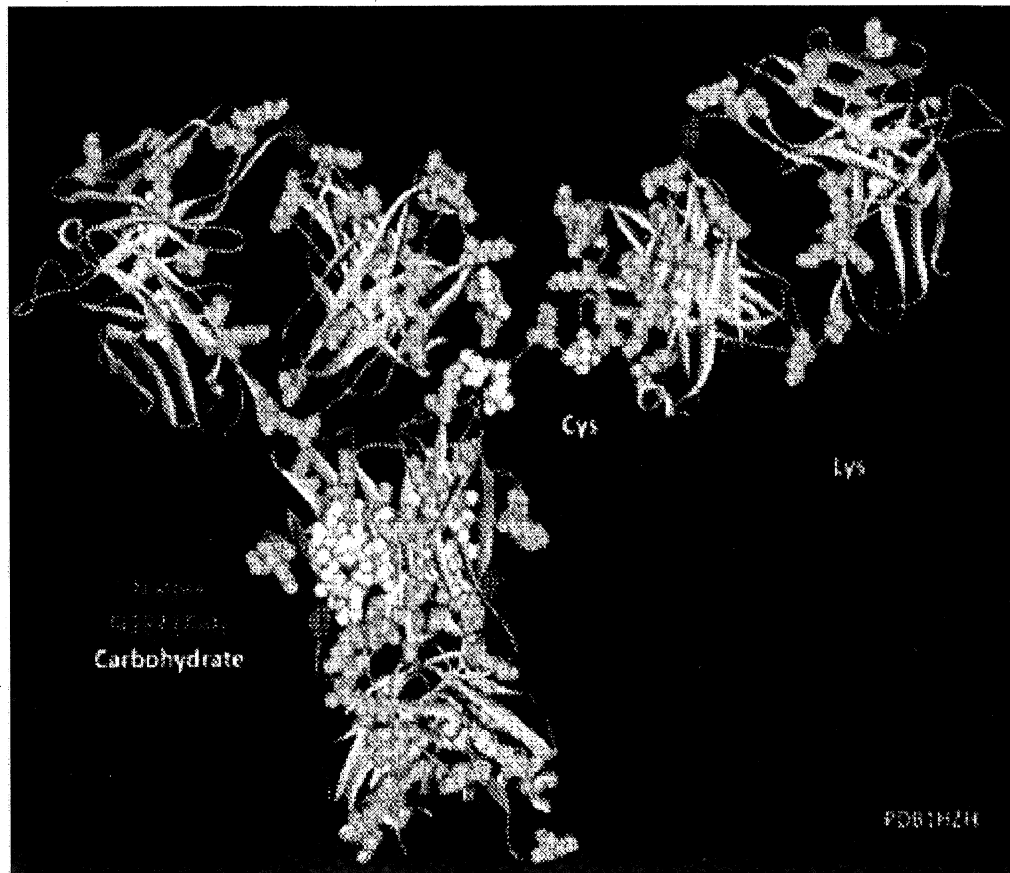
Sự phục hồi khối lượng của giải chấp của +TOF MS: 25,984 đến 39,985 tối thiểu từ TEM\_0065.wiff Tới đa 1,8e4 cps

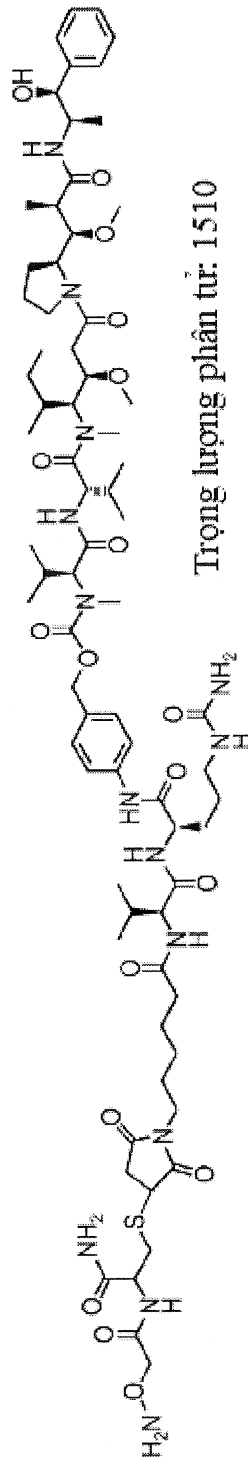
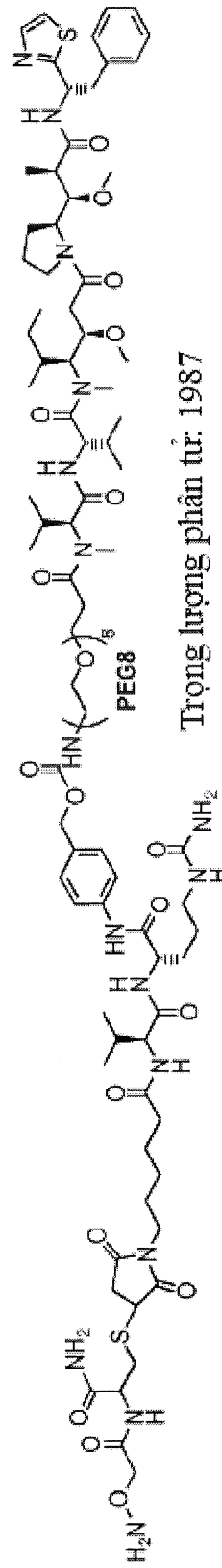


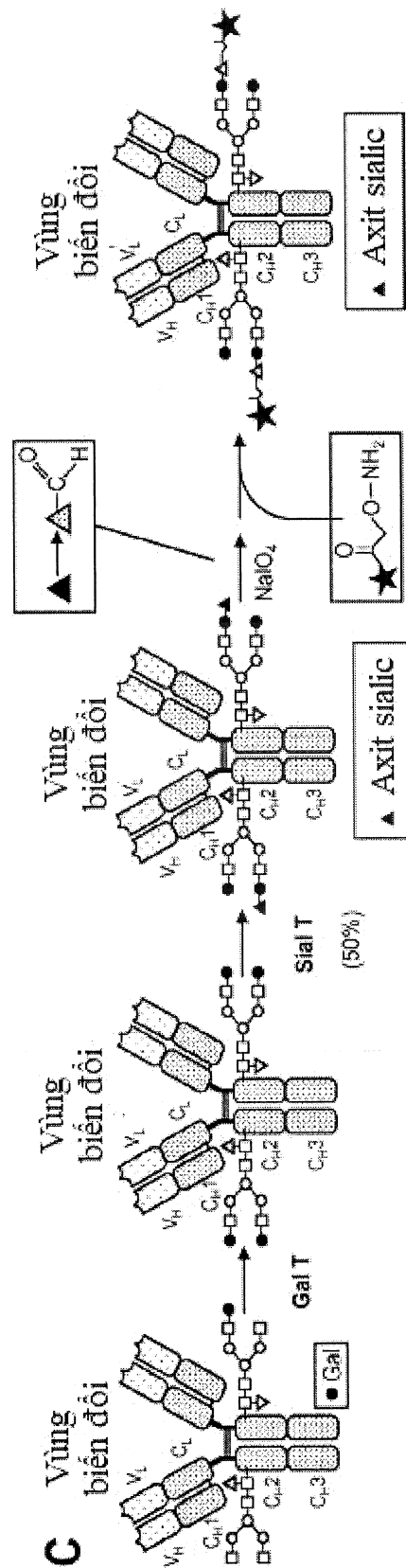


Hình. 24

A

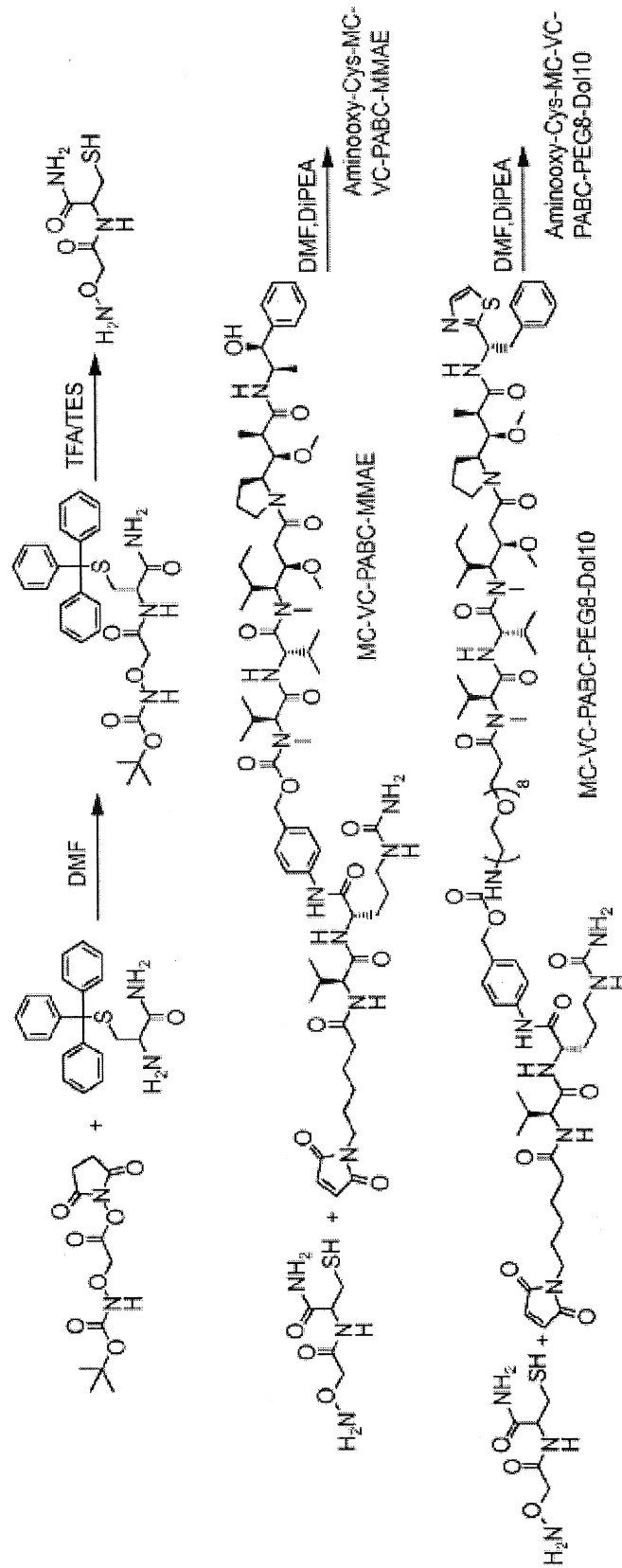
*Hình. 25*

**B****Aminoxy-Cys\_MC-VC-PABC-MMAE****Aminoxy-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10****Hình. 25** (tiếp theo)



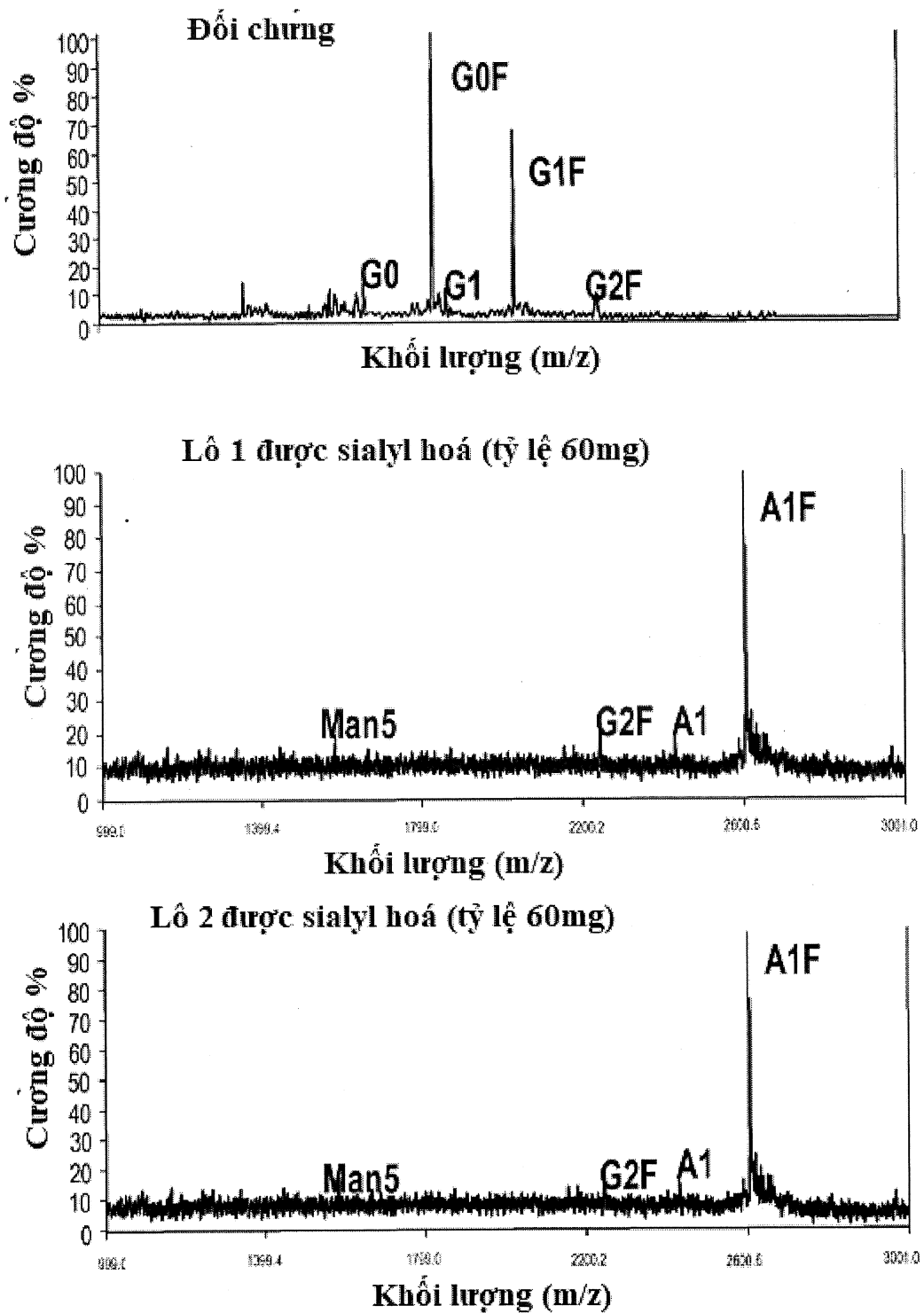
**Hình. 25** (tiếp theo)

Tổng hợp aminoxy-Cys-MC-VC-PABC-MMAE và aminoxy-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10



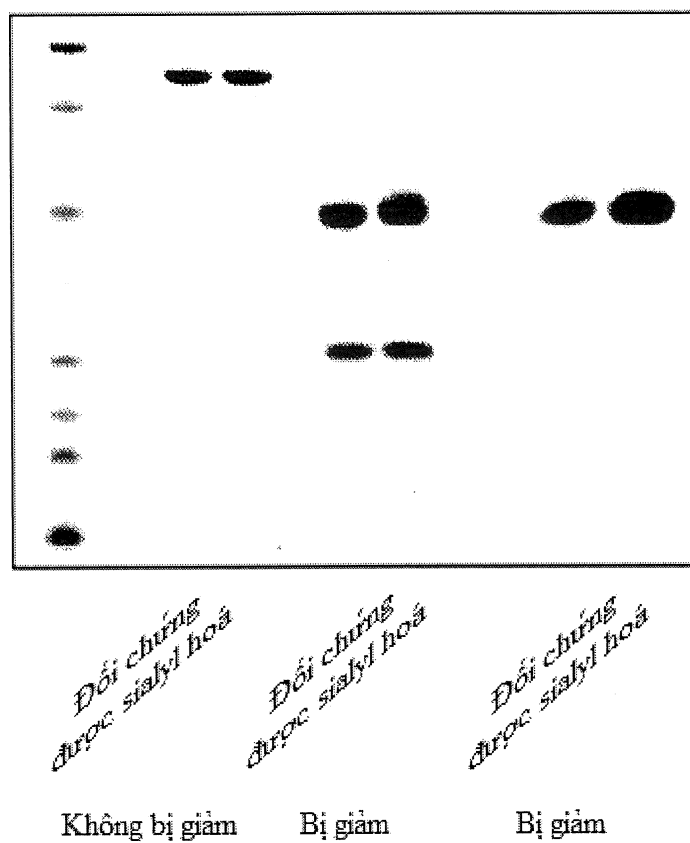
Hình. 26

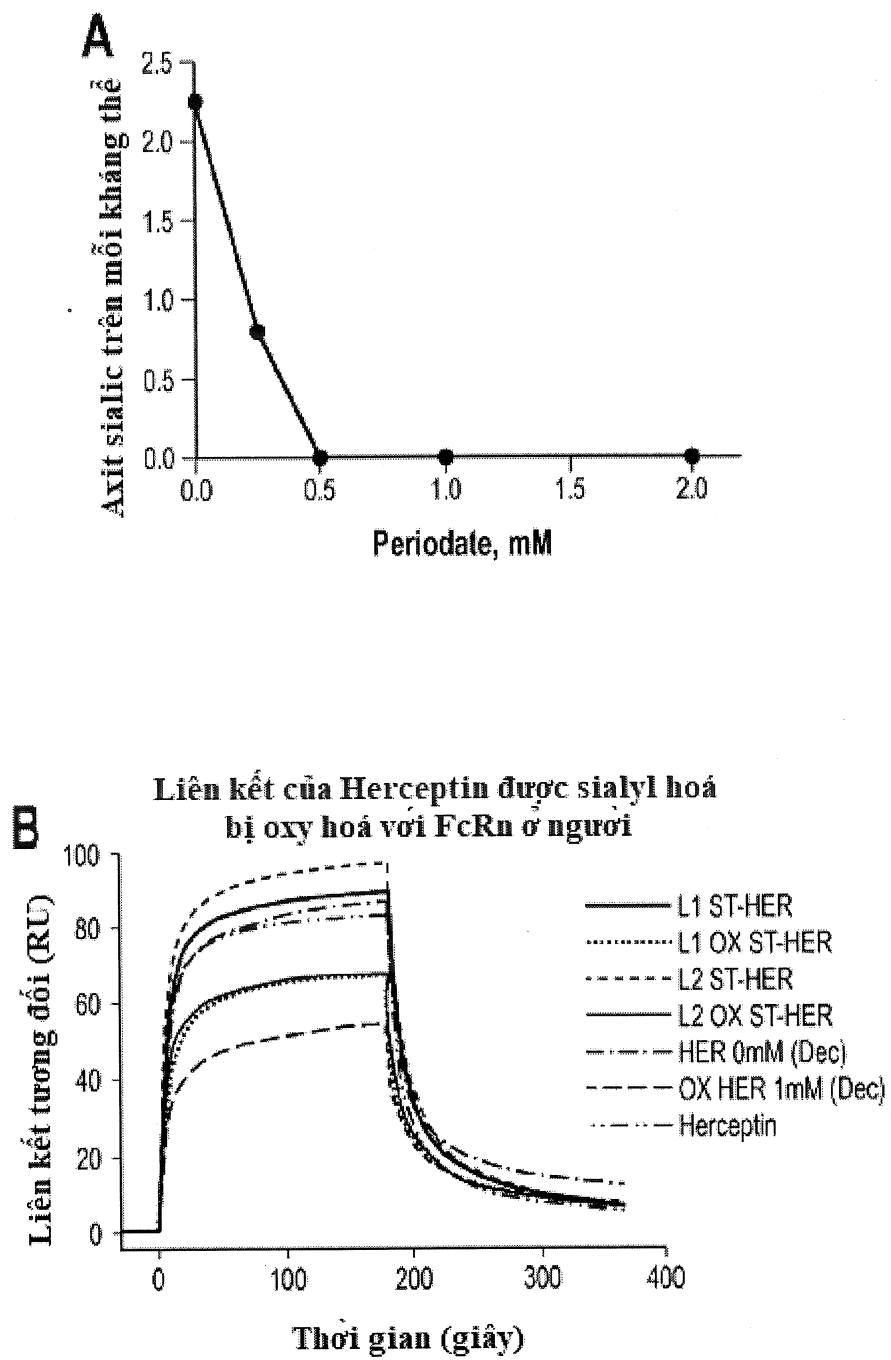


**A****Hình. 27**

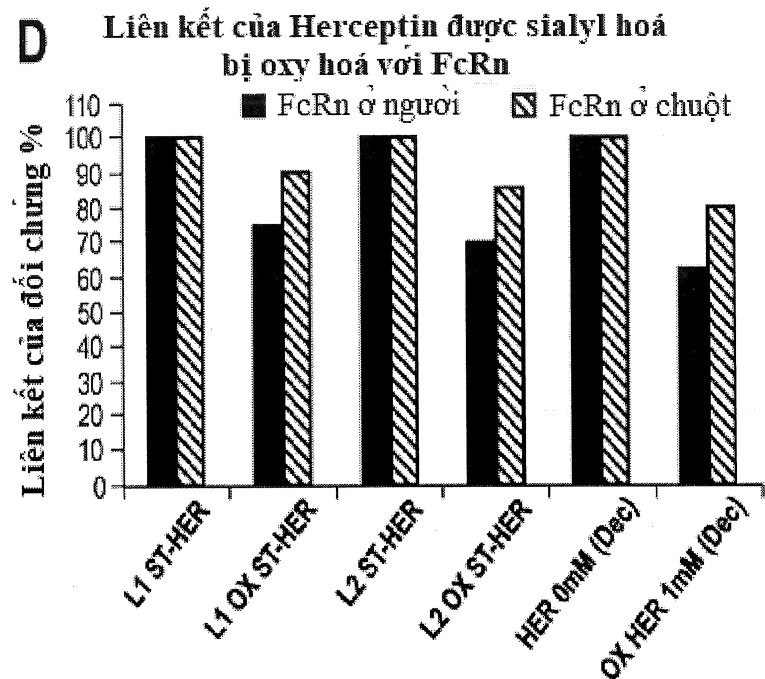
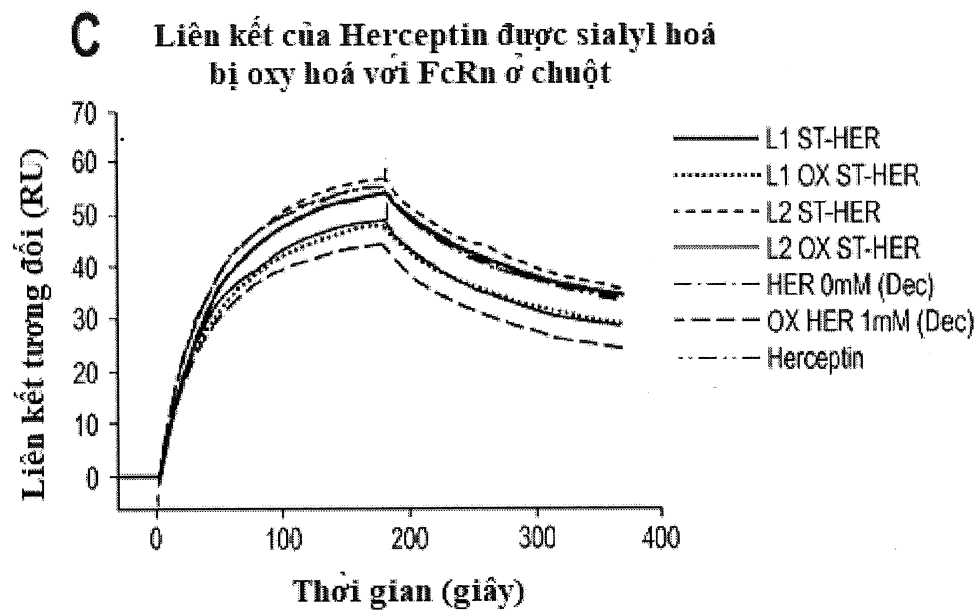
**B**

|                      | Axit sialic, mol/mol |
|----------------------|----------------------|
| Đối chứng            | 0                    |
| Lô 1 được sialyl hoá | $2,2 \pm 0$          |
| Lô 2 được sialyl hoá | $2,3 \pm 0,1$        |

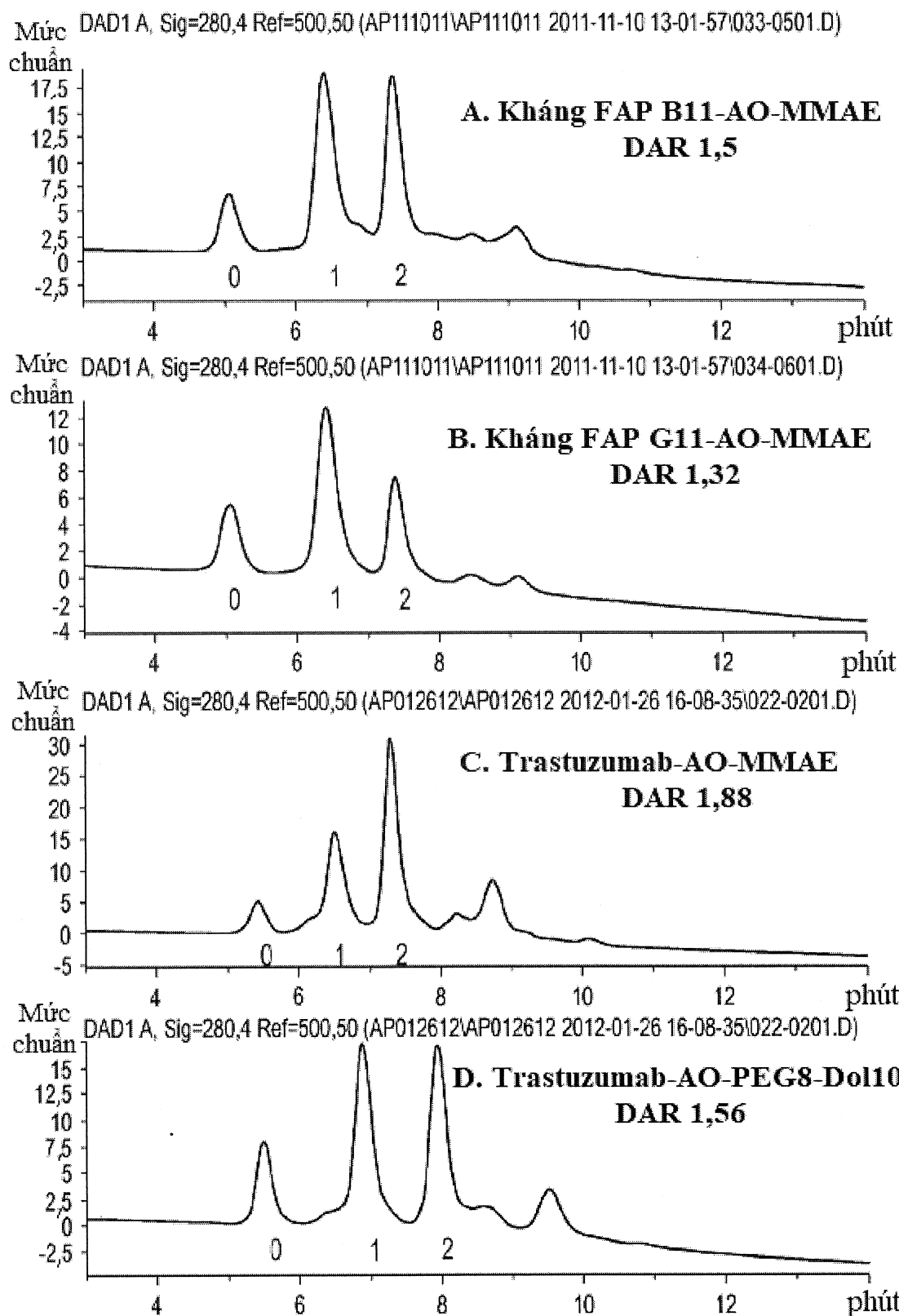
**C****Hình. 27** (tiếp theo)



**Hình. 28**

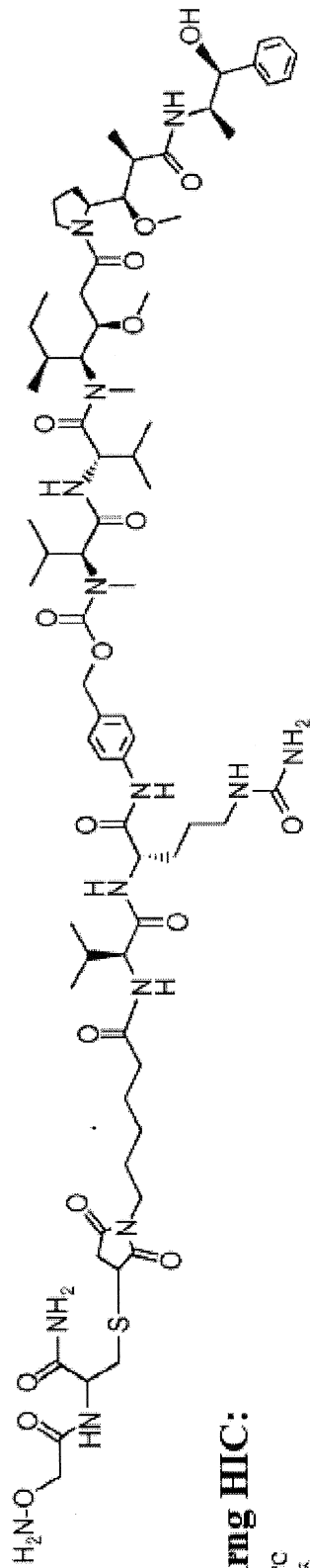


**Hình. 28** (tiếp theo)

**Hình. 29**

**Aminoxy**

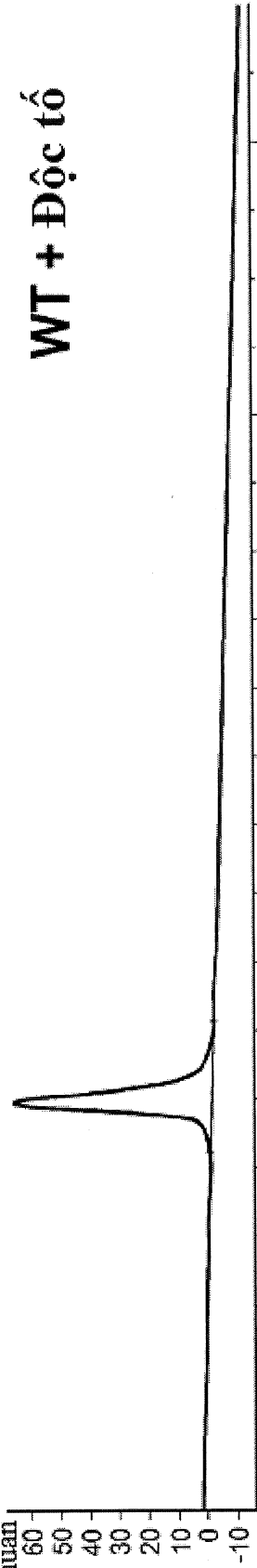
**MC-VC-PABC-MMAE**



**Đặc trưng HIC:**

Mức  
chuẩn

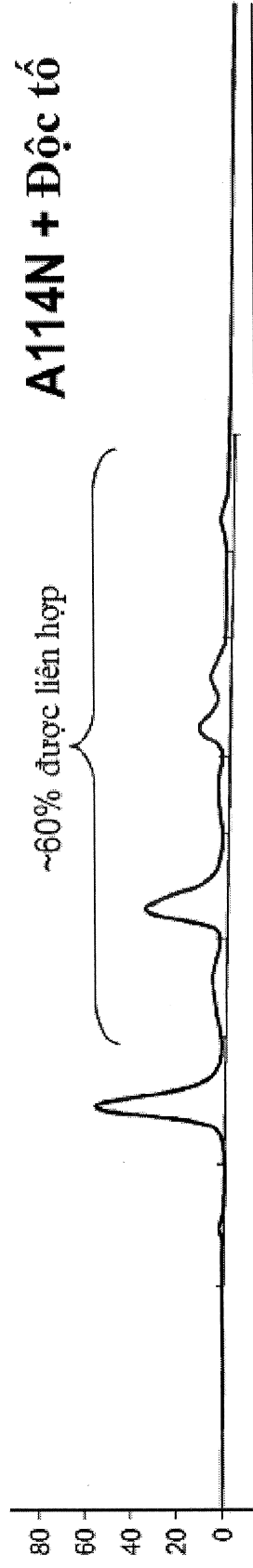
60  
50  
40  
30  
20  
10  
0  
-10



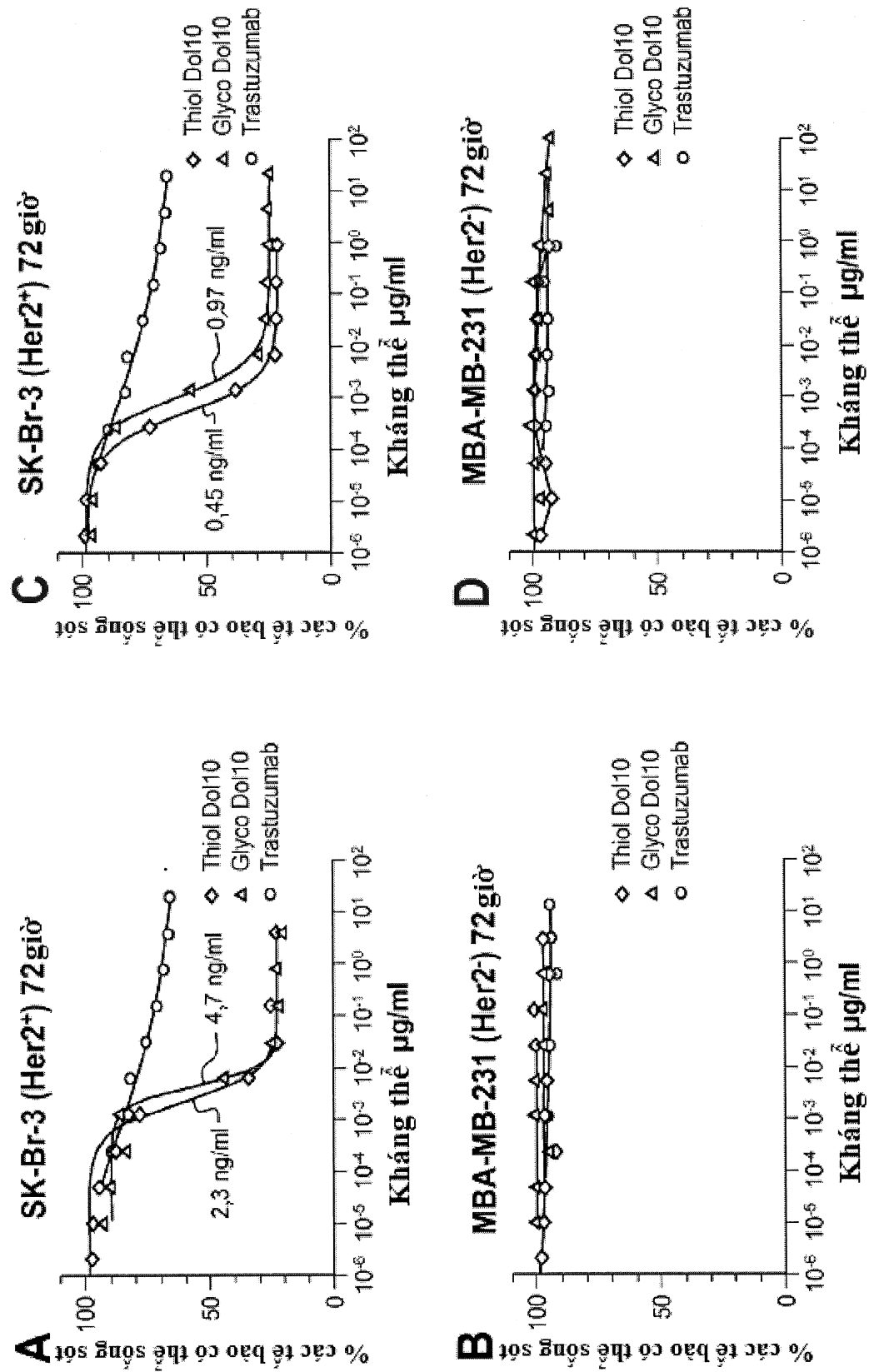
**WT + Độc tố**

80  
60  
40  
20  
0

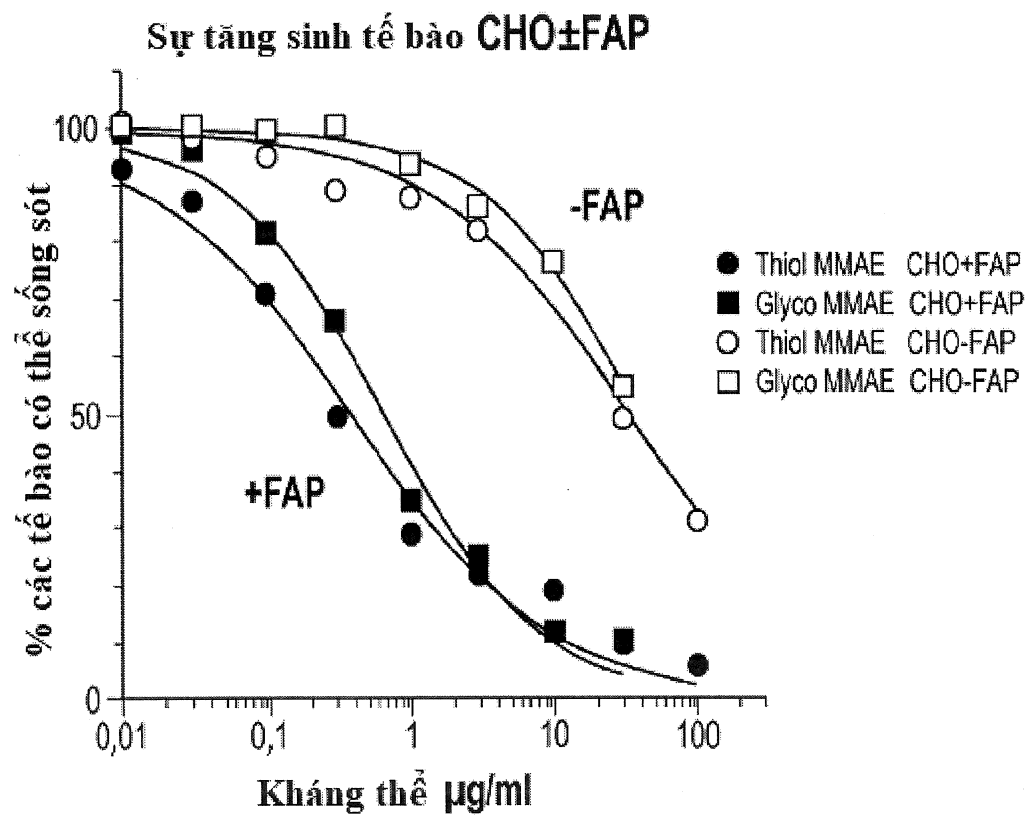
~60% được liên hợp



**Hình. 30**

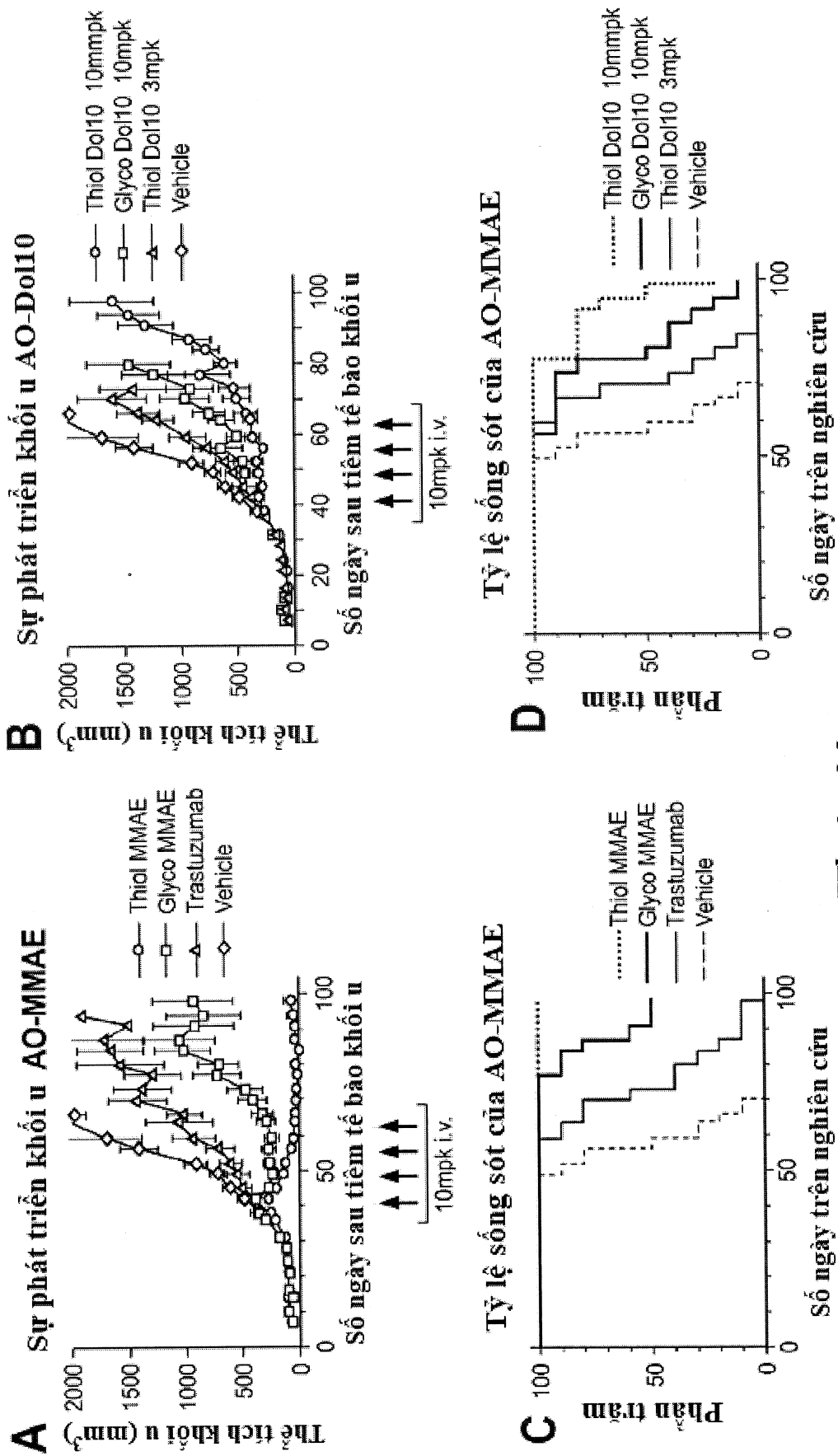


Hình. 31



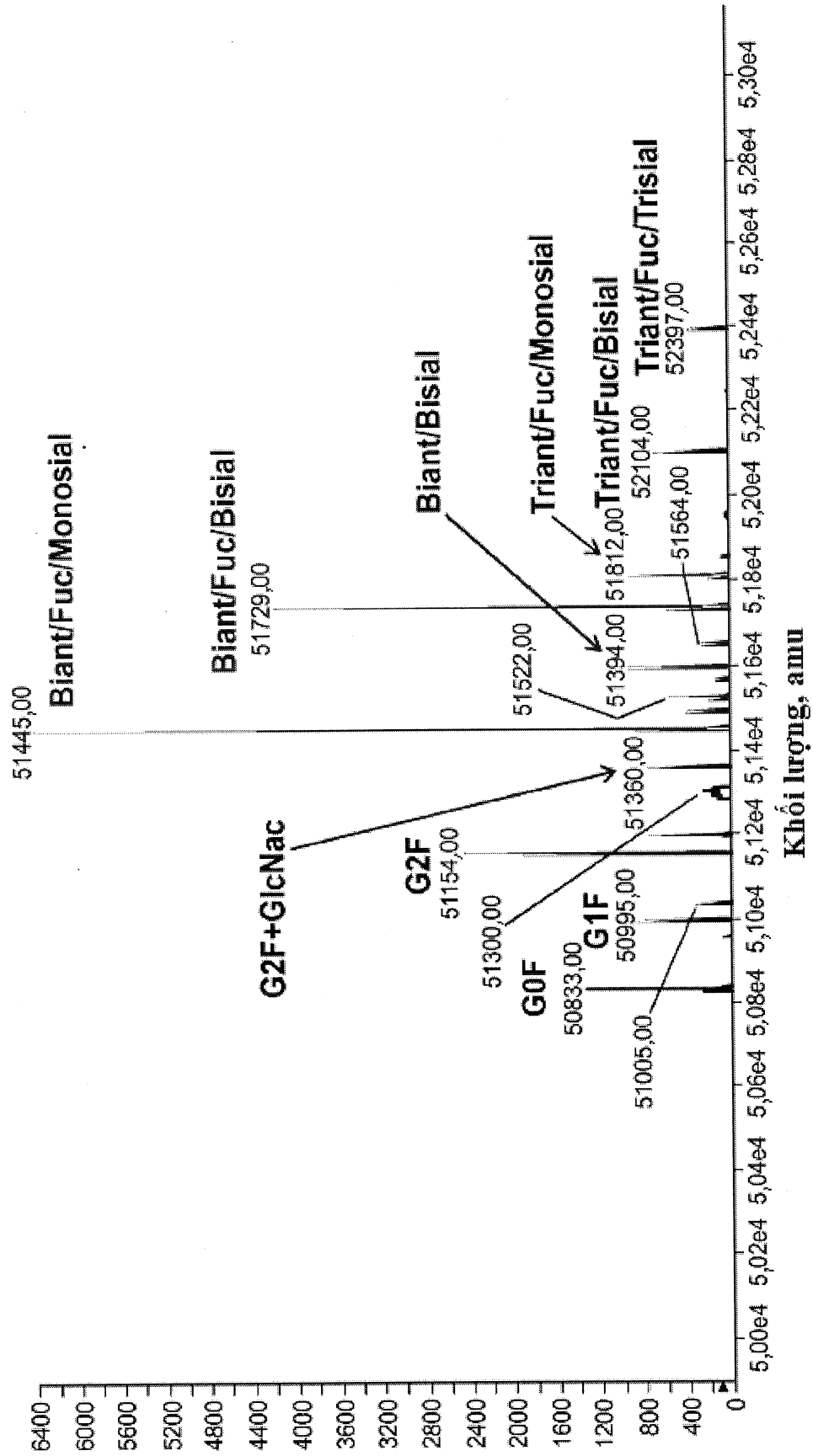
**Hình. 32**



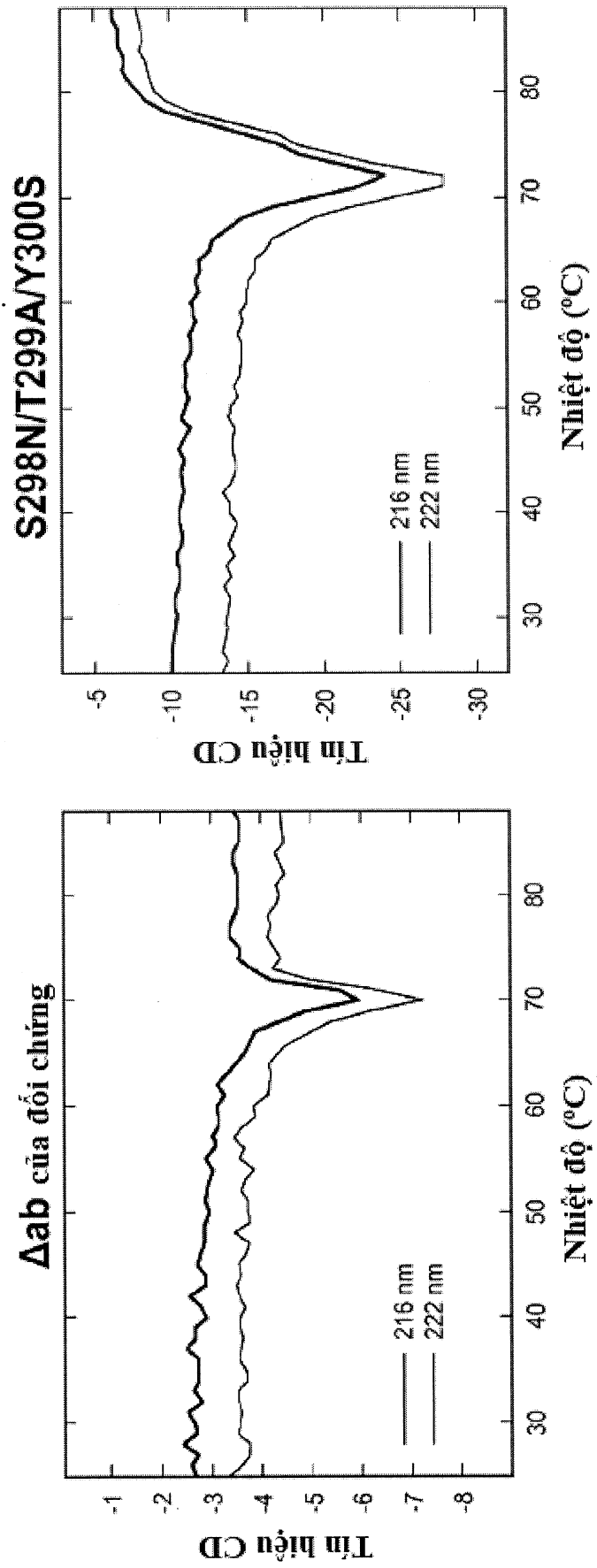


Hình. 33

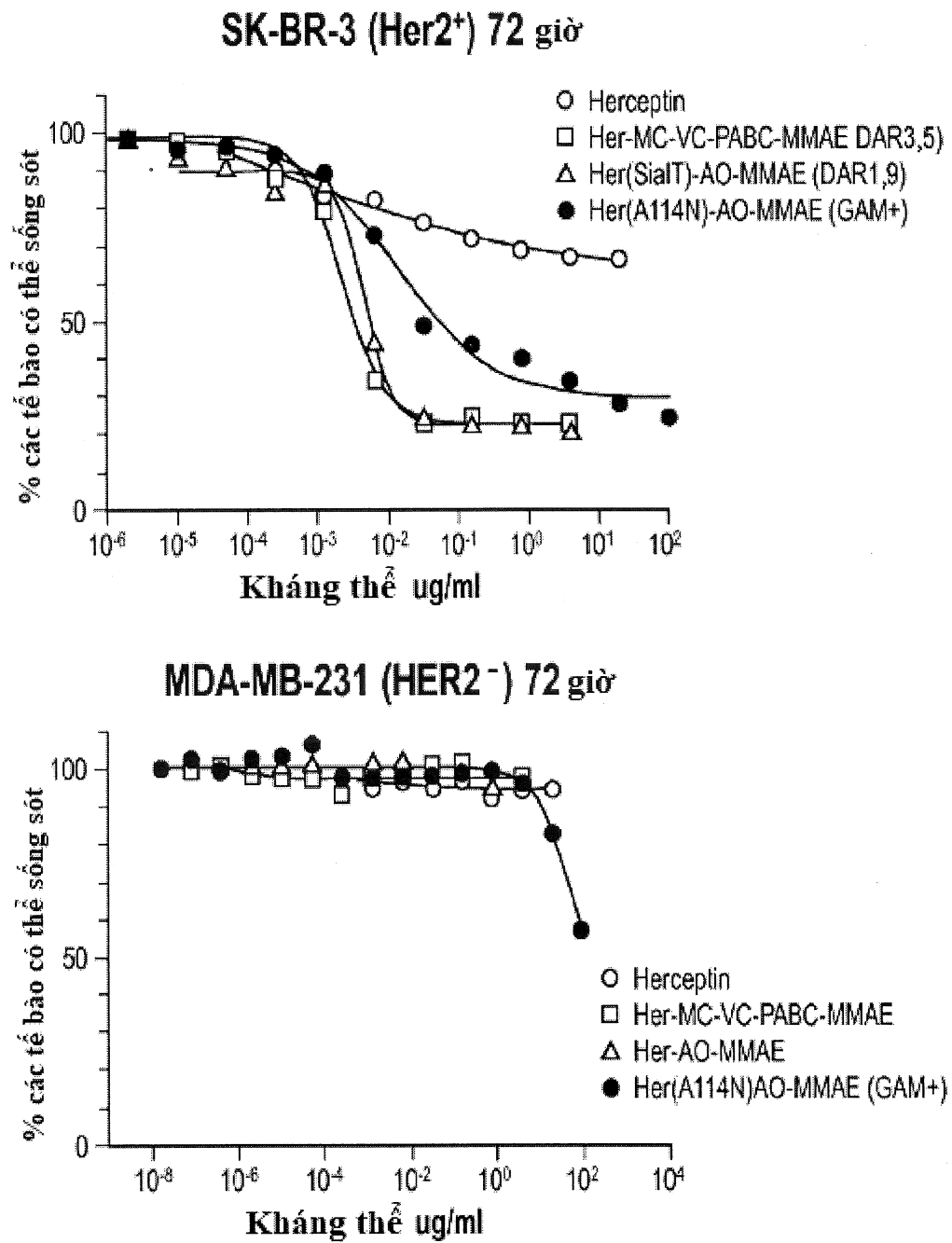
# LC/MS của chuỗi nặng S298NT299A/Y300S (NNAS)



Hình. 34



Hình. 35



Hình. 36

## Danh mục trình tự

&lt;110&gt; GENZYME CORPORATION

&lt;120&gt; KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP GỒM MIỀN FC CỦA IGG1 Ở NGƯỜI VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

&lt;130&gt; 550502 SA9-109PC

&lt;140&gt; PCT/US2013/059481

&lt;141&gt; 2013-09-12

&lt;150&gt; 61/776,715

&lt;151&gt; 2013-03-11

&lt;150&gt; PCT/EP2012/003819

&lt;151&gt; 2012-09-12

&lt;160&gt; 45

&lt;170&gt; Bảng sáng chế trong phiên bản 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; nguồn

&lt;223&gt; /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit "

&lt;400&gt; 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 | Leu | Tyr | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |

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

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

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Val | Gln | Gly |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

85 90 95  
 Thr His Leu His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 115 120 125  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 130 135 140  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 165 170 175  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 180 185 190  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 195 200 205  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215  
 <210> 2  
 <211> 443  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"  
 <400> 2  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Trp  
 20 25 30

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

Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser  
 50 55 60

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

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

Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
|     | 245 |     | 250 |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
| Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn |     |  |  |  |
|     | 260 |     |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |  |  |  |
| Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg |     |  |  |  |
|     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |  |  |  |
| Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val |     |  |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |  |  |  |
| Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser |     |  |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     |     | 320 |  |  |  |
| Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys |     |  |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |  |  |  |
| Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp |     |  |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     |  |  |  |
| Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe |     |  |  |  |
|     | 355 |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |     |  |  |  |
| Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu |     |  |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |  |  |  |
| Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe |     |  |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |     |  |  |  |
| Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly |     |  |  |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |  |  |  |
| Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr |     |  |  |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |     |  |  |  |
| Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys |     |     |     |     |     |     |  |  |  |
|     | 435 |     |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |

<210> 3  
<211> 444



&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; nguồn

&lt;223&gt; /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

&lt;400&gt; 3

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 Thr Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 100 105 110

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

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

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

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

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
|                                                                 |     | 400 |

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

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

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

<210> 4

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 4

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 Thr Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 100 105 110

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 115 |     |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |     |     | 125 |
| Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys |
| 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro |
| 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |

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

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 5

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 Thr Tyr  
20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

|                                                                 |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 50                                                              |     | 55  |     | 60  |
| Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser |     |     |     |     |
| 65                                                              |     | 70  | 75  | 80  |
| Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr |     |     |     |     |
|                                                                 | 85  | 90  |     | 95  |
| Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val |     |     |     |     |
|                                                                 | 100 | 105 |     | 110 |
| Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser |     |     |     |     |
|                                                                 | 115 | 120 |     | 125 |
| Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys |     |     |     |     |
|                                                                 | 130 | 135 |     | 140 |
| Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu |     |     |     |     |
|                                                                 | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu |     |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 |     | 175 |
| Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr |     |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 |     | 190 |
| Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val |     |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 |     | 205 |
| Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro |     |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |     |
| Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe |     |     |     |     |
|                                                                 | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val |     |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 |     | 255 |
| Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe |     |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 |     | 270 |

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285

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

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

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

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

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355 360 365

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Asn Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440

<210> 6

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 6

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 Thr Tyr  
20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
100 105 110

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

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

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

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

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

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



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

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285

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

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

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

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

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355 360 365

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Asn Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440

<210> 7

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 7

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 Thr Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285

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

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

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

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

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355 360 365

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Thr  
 435 440 445

<210> 8

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 8

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 Thr Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285

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

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

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

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

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /luu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 9

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 10  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 10

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Ala Ile Tyr Asn Pro Ser Leu Gln  
 50 55 60

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

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

Arg Glu Gly Val Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 11

<211> 454

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 11

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Ala Ile Tyr Asn Pro Ser Leu Gln  
50 55 60

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

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

Arg Glu Gly Val Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Asn Ser Thr Lys  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 12

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 13  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 13  
 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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly Lys  
450

<210> 14

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<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 Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

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

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

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

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



Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asn Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly Lys  
450

<210> 15

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 16  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 16  
 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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asn Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 17

<400> 17  
 000

<210> 18

<400> 18  
 000

<210> 19

<400> 19  
 000

<210> 20

<400> 20  
 000

<210> 21

<400> 21  
000

<210> 22

<400> 22  
000

<210> 23  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<221> nguồn  
<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 23  
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu  
65 70 75 80

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

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

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



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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 24

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 25

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

&lt;400&gt; 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420

425

430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; nguồn

&lt;223&gt; /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

&lt;400&gt; 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

340 345 350

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

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

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
435 440 445

Gly Lys  
450

<210> 27  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<221> nguồn  
<223> /luu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 27  
Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Asn Thr Ser Arg |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Gly Lys                                                         |     |     |
| 450                                                             |     |     |
| <210> 28                                                        |     |     |
| <211> 218                                                       |     |     |

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; nguồn

&lt;223&gt; /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

&lt;400&gt; 28

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 Leu Tyr Ser  
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190

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

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

<210> 29  
<211> 444  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<221> nguồn  
<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 29  
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 Thr Tyr  
20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285

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

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

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

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

```

340
345
350
Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440
<210> 30
<211> 444
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> nguồn
<223> /luu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"
<400> 30
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 Thr Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

```

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

275                      280                      285  
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 290                      295                      300  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 305                      310                      315                      320  
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 325                      330                      335  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 340                      345                      350  
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355                      360                      365  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 370                      375                      380  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 385                      390                      395                      400  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 405                      410                      415  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 420                      425                      430  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435                      440

<210> 31

<211> 218

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 31



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 Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Val Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly  
 85 90 95  
 Ser His Phe His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105 110  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 115 120 125  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 130 135 140  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 165 170 175  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 180 185 190  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 195 200 205  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 444

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; nguồn

&lt;223&gt; /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

&lt;400&gt; 32

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 Pro Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285

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

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

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

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

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355 360 365

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

370                                      375                                      380  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 385                                      390                                      395                                      400  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
                                     405                                      410                                      415  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
                                     420                                      425                                      430  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                                     435                                      440  
 <210> 33  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"  
 <400> 33  
 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 Pro Phe Ser Asn Tyr  
                                     20                                      25                                      30  
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                                     35                                      40                                      45  
 Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
                                     50                                      55                                      60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
                                     85                                      90                                      95

Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285

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

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305 310 315 320  
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 325 330 335  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 340 345 350  
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355 360 365  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 370 375 380  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 385 390 395 400  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 405 410 415  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 420 425 430  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440  
 <210> 34  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"  
 <400> 34  
 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 Pro Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys                 |     |     |
| 435                                                             | 440 |     |
| <210> 35                                                        |     |     |
| <211> 444                                                       |     |     |



&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; nguồn

&lt;223&gt; /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

&lt;400&gt; 35

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 Pro Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu  
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
 100 105 110

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

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

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

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

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Asn Thr Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
|                                                                 |     | 400 |

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

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

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

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 36

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115                                      120                                      125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130                                      135                                      140  
  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145                                      150                                      155                                      160  
  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165                                      170                                      175  
  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180                                      185                                      190  
  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195                                      200                                      205  
  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
  
 <210> 37  
 <211> 450  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"  
  
 <400> 37  
 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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20                                      25                                      30  
  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35                                      40                                      45  
  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50                                      55                                      60

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

39041

[illegible]

```
<210> 38
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
```

&lt;221&gt; nguồn

&lt;223&gt; /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

&lt;400&gt; 38

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 Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

|                                                                 |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 195                                                             | 200 | 205     |
| Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp |     |         |
| 210                                                             | 215 | 220     |
| Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly |     |         |
| 225                                                             | 230 | 235 240 |
| Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile |     |         |
|                                                                 | 245 | 250 255 |
| Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu |     |         |
|                                                                 | 260 | 265 270 |
| Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His |     |         |
|                                                                 | 275 | 280 285 |
| Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg |     |         |
|                                                                 | 290 | 295 300 |
| Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys |     |         |
| 305                                                             | 310 | 315 320 |
| Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu |     |         |
|                                                                 | 325 | 330 335 |
| Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr |     |         |
|                                                                 | 340 | 345 350 |
| Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu |     |         |
|                                                                 | 355 | 360 365 |
| Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp |     |         |
|                                                                 | 370 | 375 380 |
| Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val |     |         |
| 385                                                             | 390 | 395 400 |
| Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp |     |         |
|                                                                 | 405 | 410 415 |



Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 39  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 39  
 Gly Gly Gly Gly  
 1

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

<220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 40  
 Gly Gly Gly Gly Gly  
 1 5

<210> 41  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 41  
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1

5

<210> 42  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 42  
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 1 5

<210> 43  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 43  
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 1 5

<210> 44  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 44  
 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 45  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <221> nguồn  
 <223> /lưu ý="Mô tả Trình tự nhân tạo: Tổng hợp polypeptit"

<400> 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10