



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0039315

(51)⁷ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2017-00372

(22) 03/08/2015

(86) PCT/EP2015/067776 03/08/2015

(87) WO 2016/020309 11/02/2016

(30) 14179764.7 04/08/2014 EP; 15170866.6 05/06/2015 EP

(45) 25/04/2024 433

(43) 26/06/2017 351A

(73) F. Hoffmann-La Roche AG (CH)

Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland

(72) AST, Oliver (DE); BACAC, Marina (IT); IMHOF-JUNG, Sabine (DE); JAEGER, Christiane (DE); KLEIN, Christian (DE); KLOSTERMANN, Stefan (DE); MOLHOJ, Michael (DK); REGULA, Joerg Thomas (DE); SCHAEFER, Wolfgang (DE); UMAÑA, Pablo (CR).

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

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

(57) Nhìn chung, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép mới để hoạt hóa tế bào T và định hướng lại để nhắm đến tế bào đích đặc hiệu. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các polynucleotit mã hóa các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này, và các vector và các tế bào vật chủ chứa các polynucleotit này. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp để sản xuất các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế, và dược phẩm chứa các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này để điều trị bệnh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nhìn chung, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép để hoạt hóa tế bào T. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các polynucleotit mã hóa các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này, và các vector và các tế bào vật chủ chứa các polynucleotit này. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp sản xuất các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế, và các phương pháp sử dụng các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép này để điều trị bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tính tiêu diệt có chọn lọc đối với từng tế bào hoặc từng loại tế bào cụ thể thường là được mong muốn trong rất nhiều các thiết lập lâm sàng khác nhau. Ví dụ, mục đích chủ yếu của việc điều trị bệnh ung thư là phá hủy có chọn lọc đối với tế bào khối u, trong khi vẫn để lại các tế bào và các mô khỏe mạnh nguyên vẹn và không bị tổn thương.

Phương pháp đáng quan tâm để đạt được mục đích này là kích thích đáp ứng miễn dịch kháng khối u, để làm cho các tế bào tác động miễn dịch như các tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK) hoặc các tế bào lympho T gây độc tế bào (các CTL) tấn công và phá hủy các tế bào khối u. Các CTL tạo thành nhóm tế bào tác động hiệu quả nhất của hệ miễn dịch, tuy nhiên chúng không thể hoạt hóa thông qua cơ chế tác động được điều chỉnh bởi miễn dịch của các kháng thể thường dùng trong trị liệu.

Liên quan đến vấn đề này, các kháng thể đặc hiệu kép được thiết kế sao cho một “nhánh” của chúng gắn kháng nguyên bề mặt nằm trên các tế bào đích, và “nhánh” thứ hai gắn vào thành phần hoạt hoá, không thay đổi của phức chất thụ thể tế bào T, đã thu hút sự quan tâm trong những năm gần đây. Việc gắn kết đồng thời kháng thể này vào cả hai đích của nó sẽ buộc các tế bào đích tương tác tạm thời với tế bào T, điều này sẽ gây hoạt hóa tế bào T bất kỳ có chức năng gây độc tế bào và tiếp đó sẽ phân giải tế bào đích. Do vậy, đáp ứng miễn dịch được định hướng lại và nhắm vào các tế bào đích và không phụ thuộc vào quá trình trình diện kháng nguyên peptit bởi tế bào đích hoặc không phụ thuộc vào tính đặc hiệu của tế bào T mà có thể liên quan đến quá trình hoạt hóa giới hạn MHC bình thường

của các CTL. Trong trường hợp này, điều kiện tiên quyết là các CTL chỉ được hoạt hóa khi tế bào đích trình diện kháng thể đặc hiệu kép với chúng, tức là synap miễn dịch sẽ được mô phỏng. Điều đặc biệt mong muốn là các kháng thể đặc hiệu kép không cần phải điều hòa trước lympho bào hoặc đồng kích thích để tạo ra quá trình phân giải hiệu quả đối với các tế bào đích.

Một số dạng kháng thể đặc hiệu kép đã được phát triển và tính phù hợp của chúng trong liệu pháp điều trị miễn dịch qua trung gian tế bào T đã được nghiên cứu. Ngoài các dạng này, cũng đã xác định được chính xác các phân tử được gọi là BiTE (chất gắn kết đặc hiệu kép tế bào T) và cũng đã thấy một số triển vọng trong lâm sàng (xem trong tài liệu Nagorsen and Bäuerle, *Exp Cell Res* 317, 1255-1260 (2011)). Các BiTE là các phân tử scFv nối tiếp trong đó hai phân tử scFv được dung hợp thông qua tác nhân liên kết linh động. Các dạng đặc hiệu kép khác đã được đánh giá về khả năng gắn kết với tế bào T bao gồm các kháng thể thể đôi (Holliger et al., *Prot Eng* 9, 299-305 (1996)) và các dẫn xuất của nó, như các kháng thể thể đôi nối tiếp (Kipriyanov et al., *J Mol Biol* 293, 41-66 (1999)). Một phân tử mới được phát hiện gần đây hơn được gọi là các phân tử DART (tạo đích lại ái lực kép), các phân tử này dựa trên dạng kháng thể thể đôi nhưng cầu disulfua đầu tận cùng C cần phải làm ổn định thêm (Moore et al., *Blood* 117, 4542-51 (2011)). Phân tử được gọi là trimab, là một phân tử IgG toàn phần lai giữa chuột nhắt/chuột cống và hiện cũng đang đánh giá trong các thử nghiệm lâm sàng, là một dạng được tạo ra với kích cỡ lớn hơn (xem trong Seimetx et al., *Cancer Treat Rev* 36, 458-467 (2010)).

Rất nhiều dạng đang được nghiên cứu thể hiện hoạt lực cao. Điều này được cho là nhờ việc định hướng lại và hoạt hóa tế bào T trong liệu pháp miễn dịch. Tuy nhiên, nhiệm vụ tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép thích hợp chưa khi nào dễ mà nó gặp rất nhiều trở ngại cần vượt quá liên quan đến hiệu lực, độc tính, khả năng áp dụng và khả năng sản xuất các kháng thể này.

Các cấu trúc nhỏ như, ví dụ, các phân tử BiTE – vừa có khả năng tạo ra liên kết ngang hiệu quả giữa tế bào tác động và tế bào đích – vừa có thời gian bán hủy trong huyết thanh rất ngắn nếu dùng cho bệnh nhân thường cần phải dùng thông qua việc truyền liên tục. Mặt khác, các dạng giống IgG – trong khi có ưu điểm về thời gian bán hủy lâu – nhưng lại có độc tính gắn với chức năng tác động tự nhiên vốn thuộc về phân tử IgG. Khả năng sinh miễn dịch của chúng đã tạo nên các đặc điểm khác không có lợi cho các kháng thể đặc hiệu kép giống IgG, đặc biệt là các dạng không có nguồn gốc từ người, để có thể sử dụng

thành công chúng trong điều trị. Cuối cùng, trở ngại chính khi phát triển các kháng thể đặc hiệu kép nói chung là việc sản xuất ra các cấu trúc kháng thể đặc hiệu kép với số lượng và độ tinh khiết đủ để sử dụng trong lâm sàng, do việc bắt cặp không chính xác giữa chuỗi nặng với chuỗi nhẹ có tính đặc hiệu của kháng thể khi đồng biểu hiện sẽ làm giảm hiệu suất thu được cấu trúc được lắp ghép chính xác và tạo ra một số sản phẩm phụ không có chức năng mà khó tách ra khỏi kháng thể đặc hiệu kép mong muốn.

Nhiều phương pháp khác nhau đã được thực hiện nhằm khắc phục được vấn đề ghép cặp các chuỗi nêu trên trong các kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ xem: Klein et al., mAbs 6, 653-663 (2012)). Ví dụ, phương pháp “khóa trong ổ” là một phương pháp làm cho hai chuỗi nặng kháng thể khác nhau ghép cặp với nhau thông qua việc đưa các đột biến vào miền CH3 để làm thay đổi bề mặt tiếp xúc. Trên một chuỗi, các axit amin lớn được thay thế bằng các axit amin có mạch bên ngắn để tạo ra ‘phần ổ’. Ngược lại, các axit amin có mạch bên lớn được đưa vào miền CH3 khác, để tạo ra ‘phần khóa’. Bằng cách đồng biểu hiện hai chuỗi nặng này (và hai chuỗi nhẹ giống nhau, mà cần phù hợp với cả hai chuỗi nặng này), quan sát thấy lượng dị dime (‘khóa-ổ’) cao hơn so với lượng đồng dime (‘ổ-ổ’ hoặc ‘khóa-khóa’) (Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; và WO 96/027011). Tỷ lệ phần trăm của dị dime có thể tăng lên bằng cách sắp xếp lại bề mặt tương tác của hai miền CH3 sử dụng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn và bằng cách đưa cầu disulfua vào để làm ổn định các dị dime (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35). Các phương pháp tiếp cận mới đối với công nghệ khóa trong ổ được mô tả, ví dụ trong EP 1870459 A1.

Tuy nhiên, phương pháp “khóa trong ổ” không giải quyết được vấn đề về việc ghép cặp sai giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mà thường xuất hiện trong các kháng thể đặc hiệu kép có mang các chuỗi nhẹ khác nhau để gắn kết vào các kháng nguyên đích khác nhau.

Một phương pháp giúp tránh được vấn đề ghép cặp sai giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là trao đổi các miền giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của một trong số các nhánh liên kết của kháng thể đặc hiệu kép (xem WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254 và Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-11191, phương pháp này liên quan đến các kháng thể IgG đặc hiệu kép có tính lai chéo miền).

Việc trao đổi các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, VH và VL, trong một trong số các nhánh liên kết của kháng thể đặc hiệu kép (WO2009/080252, đồng thời xem:

Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-11191) làm giảm một cách rõ rệt lượng sản phẩm phụ được tạo ra do sự ghép cặp sai của chuỗi nhẹ trên kháng nguyên thứ nhất có chuỗi nặng sai so với kháng nguyên thứ hai (so với các phương pháp không trao đổi miền). Tuy nhiên, chế phẩm kháng thể thu được không hoàn toàn không chứa các sản phẩm phụ. Các sản phẩm phụ chính dựa vào tương tác kiểu Bence Jones (Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-11191; trên Fig.S1I của trang bổ sung). Do đó, cần tiếp tục giảm lượng sản phẩm phụ tạo ra để cải thiện, ví dụ hiệu quả sản xuất các kháng thể đặc hiệu kép này.

Với các khó khăn và nhược điểm gắn với các kháng thể đặc hiệu kép hiện đang được sử dụng trong liệu pháp miễn dịch qua trung gian tế bào T nêu trên thì vẫn cần phải có các dạng mới, được cải tiến của các phân tử nêu trên. Sáng chế đề xuất các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép được thiết kế để hoạt hóa tế bào và định hướng lại và hướng vào tế bào T, vừa có hiệu quả và khả năng sản xuất tốt, vừa có độc tính thấp và các tính chất được động học thích hợp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo sáng chế, tỷ lệ giữa kháng thể đặc hiệu kép mong muốn so với các sản phẩm phụ không mong muốn, cụ thể là các sản phẩm phụ sinh ra từ tương tác kiểu Bence Jones xuất hiện trong các kháng thể đặc hiệu kép có sự trao đổi miền VH/VL trong một trong số các nhánh liên kết của chúng, có thể được cải thiện bằng cách đưa các axit amin tích điện với các điện tích trái dấu vào các vị trí axit amin đặc hiệu trong miền CH1 và CL.

Như vậy, theo khía cạnh đầu tiên, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

(a) phân tử Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất;

(b) phân tử Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó các miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được trao đổi cho nhau;

trong đó kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên hoạt hóa tế bào T và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên tế bào đích, hoặc kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên tế bào đích và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên hoạt hóa tế bào T; và

trong đó

i) trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số

theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat); hoặc

- ii) trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo sáng chế, phân tử Fab thứ hai là phân tử Fab lai chéo, trong đó các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được trao đổi cho nhau. Theo các phương án cụ thể, phân tử Fab thứ nhất (và thứ ba, nếu có) là phân tử Fab thông thường. Theo phương án cụ thể khác, không quá một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T có mặt trong phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (tức là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T tạo ra kháng nguyên hoạt hóa tế bào T).

Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên tế bào đích và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên hoạt hóa tế bào T. Theo phương án cụ thể hơn, kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là CD3, cụ thể là epsilon CD3. Theo một phương án, kháng nguyên tế bào đích là CD20.

Theo một phương án của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án khác, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ

nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án khác nữa, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án cụ thể, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án cụ thể khác nữa, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

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

- (a) phân tử Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất;
- (b) phân tử Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó các miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được thay thế lẫn nhau;

trong đó kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên tế bào đích và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên hoạt hóa tế bào T; và

trong đó trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat). Theo một phương án thay thế của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án khác, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án khác nữa, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213

được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án khác nữa, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế còn bao gồm phân tử Fab thứ ba mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất.

Theo các phương án cụ thể, phân tử Fab thứ ba giống hệt với phân tử Fab thứ nhất. Trong các phương án này, phân tử Fab thứ ba này có thay thế axit amin giống như phân tử Fab thứ nhất. Giống như phân tử Fab thứ nhất, phân tử Fab thứ ba, cụ thể là phân tử Fab thông thường.

Nếu phân tử Fab thứ ba có mặt, theo một phương án cụ thể, phân tử Fab thứ nhất và thứ ba gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và phân tử Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, cụ thể là CD3, cụ thể hơn là epsilon CD3.

Theo một số phương án về phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ hai trong b) được dung hợp với nhau, tùy ý thông qua tác nhân liên kết peptit. Theo một phương án cụ thể, phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất. Theo một phương án thay thế, phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi

nặng Fab của phân tử Fab thứ hai. Theo các phương án, trong đó (i) phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất hoặc (ii) phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai, ngoài ra chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab và chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai có thể được dung hợp với nhau, tùy ý thông qua tác nhân liên kết peptit.

Theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế còn bao gồm miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng liên kết ổn định.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể có các cấu hình khác nhau, tức là phân tử Fab thứ nhất, thứ hai (và thứ ba tùy ý) có thể được dung hợp với nhau và với miền Fc theo các cách khác nhau. Các thành phần này có thể được dung hợp trực tiếp với nhau hoặc, tốt hơn là, thông qua một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit thích hợp. Khi việc dung hợp được diễn ra ở đầu tận cùng N của một cấu trúc siêu phân tử thuộc miền Fc thì việc dung hợp này thường được thực hiện thông qua vùng bản lề của globulin miễn dịch.

Theo một phương án, phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo phương án này, phân tử Fab thứ nhất có thể được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai hoặc với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab khác của một trong số các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc.

Theo một phương án, từng phân tử trong số phân tử Fab thứ nhất và thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo phương án này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu bao gồm phân tử globulin miễn dịch, trong đó trong một trong các nhánh Fab các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ VH và VL được trao đổi/được thay thế lẫn nhau (xem Fig.1A, D).

Theo các phương án thay thế, phân tử Fab thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo phương án cụ thể này, các phân tử Fab thứ hai và thứ ba đều được dung hợp

ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong số các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai. Theo phương án này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu bao gồm phân tử globulin miễn dịch, trong đó bên trong một trong các nhánh Fab, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ VH và VL được trao đổi/được thay thế cho nhau, và trong đó phân tử Fab bổ sung (thông thường) được dung hợp ở đầu tận cùng N với nhánh Fab đã nêu (xem Fig.1B, E). Theo một phương án khác nữa, các phân tử Fab thứ nhất và thứ ba đều được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất. Theo phương án này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu bao gồm phân tử globulin miễn dịch với phân tử Fab khác được dung hợp ở đầu tận cùng N vào một trong các nhánh Fab globulin miễn dịch, trong đó trong phân tử Fab bổ sung nêu trên, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ VH và VL được trao đổi/được thay thế lẫn nhau (xem Fig.1C, F).

Trong tất cả trong các cấu hình khác nhau của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, thay thế axit amin được mô tả trong bản mô tả hoặc là có thể trong các miền CH1 và CL của phân tử Fab thứ nhất và (nếu có thể) phân tử Fab thứ ba, hoặc trong các miền CH1 và CL của phân tử Fab thứ hai. Tốt hơn là, chúng có trong các miền CH1 và CL của phân tử Fab thứ nhất và (nếu có thể) phân tử Fab thứ ba. Theo quan điểm của sáng chế, nếu thay thế axit amin như được mô tả ở đây xảy ra trong phân tử Fab thứ nhất (và, nếu cần, thứ ba), không tạo ra sự thay thế axit amin này trong phân tử Fab thứ hai. Ngược lại, nếu sự thay thế axit amin như được mô tả ở đây được tạo ra trong phân tử Fab thứ hai, không xảy ra sự thay thế axit amin này trong phân tử Fab thứ nhất (và, nếu cần, phân tử Fab thứ ba).

Theo các phương án cụ thể của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, cụ thể là trong đó sự thay thế axit amin như được mô tả ở đây xảy ra trong phân tử Fab thứ nhất (và, nếu cần, phân tử Fab thứ ba), miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất (và, nếu cần, phân tử Fab thứ ba) là loại isotyp kappa. Theo các phương án khác của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, cụ thể là trong đó sự thay thế axit amin như được mô tả ở đây được tạo ra trong phân tử Fab

thứ hai, miền cố định CL của phân tử Fab thứ hai là loại isotyp kappa. Theo một số phương án, miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất (và, nếu cần, phân tử Fab thứ ba) và miền cố định CL của phân tử Fab thứ hai là loại isotyp kappa.

Theo một phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế là globulin miễn dịch lớp IgG. Theo phương án cụ thể hơn globulin miễn dịch này là globulin miễn dịch phân lớp IgG₁. Theo một phương án khác nữa, globulin miễn dịch này là globulin miễn dịch phân lớp IgG₄.

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

- a) phân tử Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất;
- b) phân tử Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó các miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được thay thế lẫn nhau;
- c) phân tử Fab thứ ba mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và
- d) miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng liên kết ổn định;

trong đó kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên tế bào đích và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, cụ thể là CD3, cụ thể hơn là epsilon CD3;

trong đó phân tử Fab thứ ba trong c) giống hệt với phân tử Fab thứ nhất trong a);

trong đó trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng lysin (K) hoặc arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat); và

trong đó:

- (i) phân tử Fab thứ nhất trong a) được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai trong b), và phân tử Fab thứ hai trong b) và phân tử Fab thứ ba trong c) mỗi phân tử được dung hợp ở đầu tận

cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc trong d), hoặc

(ii) phân tử Fab thứ hai trong b) được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất trong a), và phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) mỗi phân tử được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc trong d).

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

- a) phân tử Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất;
- b) phân tử Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó các miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được thay thế lẫn nhau;
- c) phân tử Fab thứ ba mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và
- d) miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng liên kết ổn định;

trong đó kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên tế bào đích và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, cụ thể là CD3, cụ thể hơn là epsilon CD3;

trong đó phân tử Fab thứ ba trong c) giống hệt với phân tử Fab thứ nhất trong a);

trong đó trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat); và

trong đó phân tử Fab thứ nhất trong a) được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai trong b), và phân tử Fab thứ hai trong b) và phân tử Fab thứ ba trong c) mỗi phân tử được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc trong d).

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

- a) phân tử Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất;
- b) phân tử Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó các miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được thay thế lẫn nhau; và
- c) miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng liên kết ổn định;

trong đó:

(i) kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên tế bào đích và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, cụ thể là CD3, cụ thể hơn là epsilon CD3; hoặc

(ii) kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên tế bào đích và kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, cụ thể là CD3, cụ thể hơn là epsilon CD3;

trong đó trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng lysin (K) hoặc arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat); và

trong đó phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ hai trong b) mỗi phân tử được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc trong c).

Theo các phương án cụ thể của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, miền Fc là miền Fc của IgG. Theo một phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc của IgG₁. Theo một phương án cụ thể khác, miền Fc là miền Fc của IgG₄. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, miền Fc là miền Fc của IgG₄ bao gồm sự thay thế axit amin S228P (đánh số theo Kabat). Theo các phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc ở người.

Theo các phương án cụ thể, miền Fc bao gồm sự biến đổi thúc đẩy liên kết của cấu trúc siêu phân tử miền Fc thứ nhất và thứ hai. Theo một phương án cụ thể này, gốc axit amin trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc được thay thế bằng

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

Theo một phương án cụ thể, miền Fc có ái lực liên kết giảm đối với thụ thể Fc và/hoặc có chức năng tác động giảm, so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên. Theo các phương án nhất định, miền Fc được thiết kế di truyền để có ái lực liên kết giảm đối với thụ thể Fc và/hoặc có chức năng tác động giảm so với miền Fc không được thiết kế di truyền. Theo một phương án, miền Fc bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin mà làm giảm gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động. Theo một phương án, một hoặc nhiều thay thế axit amin trong miền Fc mà làm giảm gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm L234, L235, và P329 (đánh số theo chỉ số đánh số Kabat EU). Theo các phương án cụ thể, mỗi cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bao gồm ba thay thế axit amin mà làm giảm gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động trong đó thay thế axit amin đã nêu là L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số đánh số Kabat EU). Theo một phương án này, miền Fc là miền Fc của IgG₁, cụ thể là miền Fc của IgG₁. Theo các phương án khác, mỗi cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bao gồm hai thay thế axit amin mà làm giảm gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động trong đó thay thế axit amin đã nêu là L235E và P329G (đánh số theo chỉ số đánh số Kabat EU). Theo một phương án này, miền Fc là miền Fc của IgG₄, cụ thể là miền Fc của IgG₄ ở người. Theo một phương án, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là miền Fc của IgG₄ và bao gồm sự thay thế axit amin L235E và S228P (SPLE) (đánh số theo chỉ số đánh số Kabat EU).

Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ . Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc ở người. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là Fc γ RIIa, Fc γ RI, và/hoặc Fc γ RIIIa ở người. Theo một phương án, chức năng tác động là độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

Theo một phương án cụ thể của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế

bào T, cụ thể là CD3, cụ thể hơn là epsilon CD3, bao gồm vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (CDR) 1 của SEQ ID NO: 4, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 5, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 8, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 9 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 10. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, cụ thể là CD3, cụ thể hơn là epsilon CD3, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7. Theo một phương án cụ thể, phân tử Fab thứ hai bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với CD3, cụ thể hơn là epsilon CD3, và bao gồm vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (CDR) 1 của SEQ ID NO: 4, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 5, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 8, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 9 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 10. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, phân tử Fab thứ hai nêu trên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7.

Theo một phương án cụ thể hơn của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, cụ thể là CD20, bao gồm vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (CDR) 1 của SEQ ID NO: 46, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 47, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 48, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 49, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 50 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 51. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, cụ thể là CD20, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31. Theo một phương án cụ thể, phân tử Fab thứ nhất (và, nếu có, phân tử Fab thứ ba) bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với CD20, và bao gồm vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (CDR) 1 của SEQ ID NO: 46, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 47, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 48, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ

ID NO: 49, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 50 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 51. Theo một phương án cụ thể hơn nữa, phân tử Fab thứ nhất đã nêu (và, nếu có, phân tử Fab thứ ba đã nêu) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

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

- a) phân tử Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất;
- b) phân tử Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó các miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được thay thế lẫn nhau;
- c) phân tử Fab thứ ba gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và
- d) miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng liên kết ổn định;

trong đó

(i) kháng nguyên thứ nhất là CD20 và kháng nguyên thứ hai là CD3, cụ thể là epsilon CD3;

(ii) phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) mỗi phân tử bao gồm vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (CDR) 1 của SEQ ID NO: 46, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 47, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 48, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 49, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 50 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 51, và phân tử Fab thứ hai trong b) bao gồm chuỗi nặng CDR 1 của SEQ ID NO: 4, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 5, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 8, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 9 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 10;

(iii) trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng lysin (K) hoặc arginin (R), cụ thể là bằng arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit

amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat); và

(iv) phân tử Fab thứ nhất trong a) được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai trong b), và phân tử Fab thứ hai trong b) và phân tử Fab thứ ba trong c) mỗi phân tử được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc trong d).

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

- a) phân tử Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất;
- b) phân tử Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó các miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được thay thế lẫn nhau;
- c) phân tử Fab thứ ba gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và
- d) miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng liên kết ổn định;

trong đó

(i) kháng nguyên thứ nhất là CD20 và kháng nguyên thứ hai là CD3, cụ thể là epsilon CD3;

(ii) phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) mỗi phân tử bao gồm vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (CDR) 1 của SEQ ID NO: 46, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 47, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 48, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 49, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 50 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 51, và phân tử Fab thứ hai trong b) bao gồm chuỗi nặng CDR 1 của SEQ ID NO: 4, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 67, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 68, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 9 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 10;

(iii) trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng lysin (K) hoặc arginin (R), cụ thể là bằng arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định

CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat); và

(iv) phân tử Fab thứ nhất trong a) được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai trong b), và phân tử Fab thứ hai trong b) và phân tử Fab thứ ba trong c) mỗi phân tử được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc trong d).

Theo khía cạnh khác nữa của sáng chế, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất một hoặc nhiều vector biểu hiện bao gồm (các) polynucleotit được phân lập theo sáng chế, và tế bào vật chủ bao gồm (các) polynucleotit được phân lập hoặc vector biểu hiện của sáng chế. Theo một số phương án tế bào vật chủ là tế bào nhân chuẩn, cụ thể là tế bào động vật có vú.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, bao gồm các bước a) nuôi cấy tế bào vật chủ của sáng chế trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và b) thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T. Sáng chế còn bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được tạo ra bởi phương pháp của sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất được phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế và chất mang được dung.

Sáng chế bao gồm phương pháp sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và được phẩm theo sáng chế. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T hoặc được phẩm theo sáng chế để dùng làm thuốc. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T hoặc được phẩm theo sáng chế để dùng để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế để bào chế thuốc để điều trị bệnh ở đối tượng cần điều trị; cũng

như phương pháp điều trị bệnh ở cá thể, bao gồm việc cho cá thể đã nêu sử dụng một lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của dược phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế ở dạng dược dụng. Theo một phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, cá thể tốt hơn là động vật có vú, cụ thể là người.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp kích thích phân giải tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u, bao gồm việc cho tế bào đích tiếp xúc với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế với sự có mặt của tế bào T, cụ thể là tế bào T gây độc tế bào.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1. Cấu hình minh họa của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (các TCB) của sáng chế. (A, D) Minh họa phân tử “1+1 CrossMab”. (B, E) Minh họa phân tử “2+1 IgG Crossfab” với trật tự thay thế của các thành phần Crossfab và Fab (“đảo ngược”). (C, F) Minh họa phân tử “2+1 IgG Crossfab”. (G, K) Minh họa phân tử “1+1 IgG Crossfab” với trật tự thay thế của các thành phần Crossfab và Fab (“đảo ngược”). (H, L) Minh họa phân tử “1+1 IgG Crossfab”. (I, M) Minh họa phân tử “2+1 IgG Crossfab” có hai CrossFab. (J, N) Minh họa phân tử “2+1 IgG Crossfab” có hai CrossFab và trật tự thay thế của các thành phần Crossfab và Fab (“đảo ngược”). (O, S) Minh họa phân tử “Fab-Crossfab”. (P, T) Minh họa phân tử “Crossfab-Fab”. (Q, U) Minh họa phân tử “(Fab)₂-Crossfab”. (R, V) Minh họa phân tử “Crossfab-(Fab)₂”. (W, Y) Minh họa phân tử “Fab-(Crossfab)₂”. (X, Z) Minh họa phân tử “(Crossfab)₂-Fab”. Chấm đen: biến đổi tùy ý trong miền Fc thúc đẩy sự dị dime hóa. ++, --: các axit amin có điện tích trái dấu được đưa vào trong các miền CH và CL.

Fig.2. Minh họa các TCB được điều chế trong Ví dụ 1. (A) “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” không biến đổi điện tích (trao đổi CH1/CL trong tác nhân gắn kết CD3), (B) “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” có các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, biến đổi điện tích trong các tác nhân gắn kết CD20, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (C) “2+1 IgG CrossFab” có các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, biến đổi điện tích trong các tác nhân gắn kết CD20, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (D) “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” không biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3), (E) “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” không biến đổi

điện tích (trao đổi VH-CH1/VL-CL trong tác nhân gắn kết CD3), (F) “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” có các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong các chất gắn kết CD20, có biến đổi điện tích trong tác nhân gắn kết CD3, EE = 147E, 213E; KK = 123K, 124K), (G) “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” có các biến đổi điện tích và sự đột biến DDKK trong vùng Fc (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, biến đổi điện tích trong các tác nhân gắn kết CD20, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (H) “1+1 CrossMab” có các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, có biến đổi điện tích trong chất gắn kết CD20, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (I) “1+1 CrossMab” với các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, có biến đổi điện tích trong chất gắn kết CD20, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K, chất gắn kết CD20 khác nhau), (J) “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” có các biến đổi điện tích 213E, 123R (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, các biến đổi điện tích trong chất gắn kết CD20, E = 213E; R = 123R), (K) “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” có các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL và sự biến đổi điện tích trong tác nhân gắn kết CD3).

Fig.3. (A-I, N, O) phân tích CE-SDS của các TCB được điều chế trong Ví dụ 1 (các chế phẩm được tinh chế cuối cùng). (A) Điện di đồ của phân tử “A”, được thể hiện trên Fig.2A, (B) điện di đồ của phân tử “B”, được thể hiện trên Fig.2B, (C) điện di đồ của phân tử “C”, được thể hiện trên Fig.2C, (D) điện di đồ của phân tử “D”, được thể hiện trên Fig.2D, (E) điện di đồ của phân tử “E”, được thể hiện trên Fig.2E, (F) điện di đồ của phân tử “F”, được thể hiện trên Fig.2F, (G) điện di đồ của phân tử “G”, được thể hiện trên Fig.2G, (H) điện di đồ của phân tử “H”, được thể hiện trên Fig.2H, (I) điện di đồ của phân tử “I”, được thể hiện trên Fig.2I, (N) Điện di đồ của phân tử “J”, được thể hiện trên Fig.2J, (O) điện di đồ của phân tử “K”, được thể hiện trên Fig.2K. Làn A = không khử, làn B = khử. (J-L, P, Q) Phân tích SDS-PAGE của các TCB được điều chế trong Ví dụ 1 sau bước tinh chế đầu tiên (Sắc ký ái lực protein A). (J) 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE, không khử; làn 1 = gen đánh dấu (Mark 12, chuẩn không nhuộm màu, Invitrogen); làn 2-11 = các phân mảnh từ sắc ký ái lực protein A của phân tử B, (K) 3-8% Tris-Acetate SDS-PAGE, không khử; làn 1 = gen đánh dấu (HiMark, Invitrogen); làn 2-12 = phân mảnh từ sắc ký ái lực protein A của phân tử C, (L) 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE, không khử; làn 1 = gen đánh dấu (Mark 12, chuẩn không nhuộm màu, Invitrogen); làn 2-14 = phân mảnh từ sắc ký ái lực protein A của phân tử D, (P) 4-12% Bis/Tris SDS PAGE, không khử; làn 1 = gen đánh dấu (Mark 12, Invitrogen); làn 2 -10 = phân mảnh từ sắc ký ái lực protein A của phân tử J, (Q) 4-12%

Bis/Tris SDS PAGE, không khử; làn 1 = gen đánh dấu (Mark 12, Invitrogen); làn 2 -12= phân mảnh từ sắc ký ái lực protein A của phân tử K. (M) Sắc ký loại trừ theo kích cỡ điều chế (SEC; bước tinh chế đầu tiên) của các TCB được điều chế trong Ví dụ 1 (phân tử A (bước SEC đầu tiên), B và D, như đã chỉ ra).

Fig.4. Việc gắn kết CD3 và CD20 của các kháng thể đặc hiệu kép tế bào T kháng CD3 /kháng CD20 (TCB) (“CD20 TCB”) có hoặc không có sự biến đổi điện tích (“các gốc tích điện”) (xem Ví dụ 1).

Fig.5. Phân giải tế bào khối u được kích thích bằng các kháng thể đặc hiệu kép tế bào T (TCB) kháng CD3/kháng CD20 (“CD20 TCB”) có hoặc không có sự biến đổi điện tích (“các gốc tích điện”) khi ủ 22 giờ bằng PBMC người (xem Ví dụ 1).

Fig.6. Sự hoạt hóa của các tế bào T CD8⁺ (A) hoặc các tế bào T CD4⁺ (B) khi tiêu diệt qua trung gian tế bào T tế bào đích khối u biểu hiện CD20 (Nalm-6) được kích thích bằng các kháng thể đặc hiệu kép tế bào T (TCB) kháng CD3/kháng CD20 (“CD20 TCB”) có hoặc không có sự biến đổi điện tích (“các gốc tích điện”) (xem Ví dụ 1).

Fig.7. Sự hoạt hóa của các tế bào T CD8⁺ (A) hoặc các tế bào T CD4⁺ (B) khi tiêu diệt qua trung gian tế bào T tế bào đích khối u biểu hiện CD20 (Z-138) được kích thích bằng các kháng thể đặc hiệu kép tế bào T (TCB) kháng CD3/kháng CD20 (“CD20 TCB”) có hoặc không có sự biến đổi điện tích (“các gốc tích điện”) (xem Ví dụ 1).

Fig.8. Sự tiêu tế bào trong dòng máu chung ở người khỏe mạnh khi ủ với kháng thể đặc hiệu kép tế bào T kháng CD3/kháng CD20 (TCB) (“CD20 TCB”) có hoặc không có sự biến đổi điện tích (“các gốc tích điện”); thử nghiệm 22 giờ (xem Ví dụ 1).

Fig.9. Sự hoạt hóa của các tế bào T CD8⁺ (A) hoặc các tế bào T CD4⁺ (B) khi tiêu diệt qua trung gian tế bào T của tế bào B biểu hiện CD20 trong máu nguyên vẹn khỏe mạnh của người được kích thích bằng các kháng thể đặc hiệu kép tế bào T (TCB) kháng CD3/kháng CD20 (“CD20 TCB”) có hoặc không có sự biến đổi điện tích (“các gốc tích điện”) (xem Ví dụ 1).

Fig.10. Việc gắn kết của TCB kháng CD20/kháng CD3 (phân tử “B” được thể hiện trên Fig.2B) với tế bào đích biểu hiện CD20 (A) và biểu hiện CD3 (B) ở người.

Fig.11. Việc gắn kết của TCB kháng CD20/kháng CD3 (phân tử “B” được thể hiện trên Fig.2B) với tế bào đích biểu hiện CD20 và CD3 ở người và khi đầu chó. (A) tế bào B, (B) tế bào T CD4, (C) tế bào T CD8.

Fig.12. Phân giải tế bào khối u qua trung gian bằng các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau.

Fig.13. Phân giải tế bào khối u và sự hoạt hóa tế bào T sau đó qua trung gian bằng các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau. (A-C) phân giải tế bào đích khối u Z138 bằng tế bào tác động PBMC từ ba người cho khác nhau. (D) Phân giải panen của các dòng tế bào khối u DLBCL như đã chỉ.

Fig.14. Sự tiêu tế bào trong dòng máu chung ở người qua trung gian bằng các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau.

Fig.15. Sự hoạt hóa của các tế bào T bằng các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau, được đánh giá bằng cách xác định số lượng của cường độ tín hiệu xuôi dòng CD3 sử dụng thử nghiệm báo cáo Jurkat-NFAT.

Fig.16. Các thông số dược động học của 0,5 mg/kg dùng liều lớn trong tĩnh mạch của kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 (phân tử “B” được thể hiện trên Fig.2B) từ dữ liệu lấy mẫu rải rác ở các con chuột nhắt NOG.

Fig.17. Thể hiện sơ lược về thiết kế nghiên cứu để đánh giá hoạt tính tiêu tế bào của kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 (phân tử “B” được thể hiện trên Fig.2B) ở các con chuột nhắt NOG được nhân hóa đầy đủ.

Fig.18. Động học của tần suất tế bào B và tế bào T trong máu của các con chuột nhắt NOG được nhân hóa đầy đủ được xử lý bằng (B) kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 (phân tử “B” được thể hiện trên Fig.2B) hoặc (A) đối chứng tá được lỏng. D0, D7: ngày tiêm điều trị.

Fig.19. Phân tích các sự biểu hiện gen đánh dấu bề mặt khác nhau trên tế bào T ngoại vi ba ngày (D3) và mười ngày (D10) sau khi tiêm chất dẫn thuốc (thanh màu đen) hoặc kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 (phân tử “B” được thể hiện trên Fig.2B) (thanh màu trắng) ở chuột nhắt được nhân hóa đầy đủ.

Fig.20. Phân tích tần suất tế bào B (A), tần suất tế bào T (B) và sự biểu hiện gen đánh dấu bề mặt trên tế bào T (C) trong lá lách của chuột nhắt được nhân hóa đầy đủ được

điều trị bằng chất dẫn thuốc (thanh màu đen) hoặc kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 (phân tử “B” được thể hiện trên Fig.2B) (thanh màu trắng) ở cuối thử nghiệm (D10 sau khi tiêm trị liệu lần đầu).

Fig.21. Hoạt tính kháng khối u của kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 (phân tử “B” được thể hiện trên Fig.2B) (0,5 mg/kg, một lần một tuần) trong mô hình WSU-DLCL2 ở các con chuột nhắt NOG có truyền huPBMC.

Fig.22. Minh họa phân tử “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” được điều chế trong Ví dụ 2. (1) Phân tử không biến đổi điện tích, (2) phân tử với các biến đổi điện tích trong các miền CH1 và CL của phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với BCMA (EE = 147E, 213E; KK = 123K, 124K).

Fig.23. Phân tích CE-SDS (làn A = không khử, làn B = khử, bảng trên cùng cho làn A) của phân tử “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” được sử dụng trong Ví dụ 2. Các phương pháp tinh chế khác nhau (Sắc ký ái lực protein A (PA), sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC), sắc ký trao đổi cation (cIEX), và bước sắc ký loại trừ kích cỡ cuối cùng (re-SEC)) được áp dụng cho phân tử không biến đổi điện tích (83A10-TCB) và phân tử có các biến đổi điện tích (83A10-TCBcv).

Fig.24. Phân tích CE-SDS (làn A = không khử, làn B = khử, bảng trên cùng cho làn A) của phân tử “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” được sử dụng trong Ví dụ 2, trong so sánh đối đầu (H2H) sau bước tinh chế sắc ký ái lực protein A (PA) và sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC).

Fig.25. Phân tích bào kế chảy của việc gắn kết của các kháng thể đặc hiệu kép tế bào T kháng BCMA/kháng CD3 với dòng tế bào đa u tủy dương tính với BCMA. (A) 83A10-TCB trên tế bào H929 và tế bào MKN45, (B) 83A10-TCBcv trên tế bào H929 và tế bào MKN45, (C) so sánh 83A10-TCB và 83A10-TCBcv trên tế bào H929.

Fig.26. Tiêu diệt tế bào u tủy H929 dương tính với BCMA bằng kháng thể TCB kháng BCMA/kháng CD3 ((A) 83A10-TCB, (B) 83A10-TCBcv) như được xác định bởi sự giải phóng LDH.

Fig.27. Minh họa TCB được điều chế trong Ví dụ 3. (A) “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” có các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, các biến đổi điện tích trong chất gắn kết Her2, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (B) “2+1 IgG

CrossFab” có các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, các biến đổi điện tích trong chất gắn kết Her3, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K).

Fig.28. Phân tích CE-SDS của TCB được điều chế trong Ví dụ 3 (chế phẩm được tinh chế cuối cùng). (A) Điện di đồ của TCB Her2, được thể hiện trên Fig.27A, (B) điện di đồ của TCB Her3, được thể hiện trên Fig.27B. Làn A = không khử, làn B = khử.

Fig.29. Việc gắn kết của TCB Her2 (A) và TCB Her3 (B) với tế bào, như được xác định bởi FACS. Các cường độ huỳnh quang trung bình đối với việc gắn kết của phân tử TCB Her2 với CD3 ở người trên tế bào Jurkat (bên trái) hoặc với Her2 ở người (A) hoặc Her3 (B) trên tế bào KPL-4 (bên phải), như được xác định bằng bào kế chảy. Được thể hiện là giá trị huỳnh quang trung bình, dựa trên ba bản sao, bao gồm SD.

Fig.30. Sự hoạt hóa tế bào T bằng TCB Her3. Khi cùng ủ tế bào tác động PBMC ở người, tế bào đích KPL-4 và làm tăng nồng độ của TCB Her3, phần trăm tế bào T CD8 dương tính với CD69 được xác định bởi FACS sau 48 giờ. Được thể hiện là ba bản sao với SD.

Fig.31. Sự hoạt hóa của tế bào Jurkat thông qua CD3 sau 5 giờ, như được xác định bằng sự phát quang. Khi ủ các tế bào khối u KPL4 với tế bào báo cáo Jurkat-NFAT (E:T 5:1 (A) hoặc 2,5:1 (B)) và làm tăng nồng độ của TCB Her2 (A) hoặc TCB Her3 (B), sự hoạt hóa của Jurkat được xác định bằng các tín hiệu phát quang liên quan (RLUS) sau 5 giờ. Giá trị EC50 được tính toán bằng Graph Pad Prism (34,4 pM (A) và 22 pM (B)). Được thể hiện là giá trị trung bình từ ba bản sao, thanh sai số chỉ SD.

Fig.32. (A, B) Phân giải tế bào khối u, như được xác định bởi giải phóng LDH, khi ủ tế bào đích KPL4, N87, T47D hoặc MDA-MB-231 dương tính với Her2 với tế bào tác động PBMC người (E:T 10:1) và làm tăng nồng độ của phân tử TCB Her 2 trong 25 giờ (A) hoặc 46 giờ (B). Được thể hiện là giá trị trung bình từ ba bản sao, thanh sai số chỉ SD. Giá trị EC50 được tính toán bằng GraphPadPrism: 7,5 pM (tế bào KPL4), 25,6 pM (tế bào N87), 30,6 pM (tế bào T47D), và 59,9 pM (tế bào MDA-MB-231). (C) Phân giải tế bào khối u, như được xác định bằng sự giải phóng LDH, khi ủ tế bào đích KPL4 dương tính với Her3 với tế bào tác động PBMC người (E:T 10:1) và làm tăng nồng độ của phân tử Her 3 TCB trong 24 giờ hoặc 48 giờ, như đã chỉ ra. Được thể hiện là giá trị trung bình từ ba bản sao, thanh sai số chỉ SD. Giá trị EC50 được tính toán bằng GraphPadPrism: 2,54 pM (24 giờ) và 0,53 pM (48 giờ).

Fig.33. Phân giải tế bào khối u, được gây cảm ứng bằng TCB Her3, như được xác định bằng hoạt tính caspaza 3/7 (sự phát quang). Được thể hiện là tín hiệu phát quang liên quan, được xác định là kết quả của hoạt tính caspaza 3/7 trong tế bào đích KPL-4-Caspaza-3/7 GloSensor sau 6,5 giờ cùng ủ với các PBMC (E:T = 10:1) và các nồng độ khác nhau của TCB Her3, như đã chỉ ra. Được thể hiện là ba bản sao với SD. Giá trị EC50 được tính bằng GraphPadPrism: 0,7 pM.

Fig.34. Minh họa TCB được điều chế trong Ví dụ 4. (A) “(Fab)₂-CrossFab” có các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, các biến đổi điện tích trong tác nhân liên kết MCSP, EE = 147E, 213E; RK = 123R, 124K), (B) “(Fab)₂-CrossFab” không biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3).

Fig.35. Phân tích CE-SDS của TCB có các biến đổi điện tích được điều chế trong Ví dụ 4 (chế phẩm được tinh chế cuối cùng): Điện di đồ của (Fab)₂-XFab-LC007cv, được thể hiện trên Fig.34A. Làn A = không khử, làn B = khử.

Fig.36. Các cường độ huỳnh quang trung bình đối với việc gắn kết của phân tử TCB với MCSP ở người trên tế bào MV-3 (bên trái) hoặc CD3 ở người trên tế bào Jurkat (bên phải), như được xác định bằng bào kế chảy. Được thể hiện là giá trị huỳnh quang trung bình, dựa trên ba bản sao, bao gồm SD.

Fig.37. Phân giải tế bào khối u, như được xác định bởi sự giải phóng LDH, khi ủ tế bào MV-3 dương tính với MCSP ở người với tế bào tác động PBMC người (E:T 10:1) và làm tăng nồng độ của phân tử TCB trong 24 giờ (bên trái) hoặc 48 giờ (bên phải). Được thể hiện là giá trị trung bình từ ba bản sao, thanh sai số chỉ SD.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

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

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

Thuật ngữ “đặc hiệu kép” có nghĩa là phân tử gắn kết kháng nguyên có thể gắn kết đặc hiệu với ít nhất hai chất xác định kháng nguyên riêng biệt. Thông thường, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép bao gồm hai điểm gắn kết kháng nguyên, mỗi điểm đặc hiệu với chất xác định kháng nguyên khác nhau. Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép có khả năng gắn kết đồng thời hai chất xác định kháng nguyên, cụ thể là hai chất xác định kháng nguyên được biểu hiện trên hai tế bào riêng biệt.

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

“Vị trí gắn kết kháng nguyên” đề cập đến vị trí, tức là một hoặc nhiều gốc axit amin, của phân tử gắn kết kháng nguyên tạo ra tương tác với kháng nguyên. Ví dụ, vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể bao gồm các gốc axit amin từ vùng xác định bổ thể (CDR). Phân tử globulin miễn dịch tự nhiên thường có hai điểm gắn kết kháng nguyên, phân tử Fab thường có một vị trí gắn kết kháng nguyên.

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

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất xác định kháng nguyên" là đồng nghĩa với "kháng nguyên" và "epitop," và chỉ vị trí (ví dụ dải liên liên kề của các axit amin hoặc cấu trúc cấu hình được tạo thành từ các vùng khác nhau của các axit amin không liên kề) trên đại phân tử polypeptit mà gốc gắn kết kháng nguyên gắn kết vào đó, hình thành phức gốc gắn kết kháng nguyên-kháng nguyên. Chất xác định kháng nguyên hữu ích có thể được tìm thấy, ví dụ, trên bề mặt của tế bào khối u, trên bề mặt của tế bào bị nhiễm khuẩn virus, trên bề mặt của các tế bào bị bệnh khác, trên bề mặt của các tế bào miễn dịch, tự do trong huyết thanh, và/hoặc trong chất đệm ngoại bào (ECM). Các protein được gọi là các kháng nguyên trong bản mô tả (ví dụ CD3) có thể là dạng tự nhiên bất kỳ, các protein từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như các loài linh trưởng (ví dụ người) và các loài gặm nhấm (ví dụ chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Theo phương án cụ thể, kháng nguyên là protein ở người. Khi viện dẫn được thực hiện cho protein đặc hiệu trong bản mô tả, thuật ngữ này bao gồm "chiều dài đầy đủ", protein chưa được xử lý cũng như dạng protein bất kỳ mà tạo ra từ việc xử lý trong tế bào. Thuật ngữ này còn bao gồm các biến thể của protein có trong tự nhiên, ví dụ các biến thể nổi hoặc các biến thể alen. Protein người lấy làm ví dụ hữu ích để làm kháng nguyên là CD3, cụ thể là cấu trúc siêu phân tử epsilon của CD3 (xem UniProt số P07766 (phiên bản 130), NCBI RefSeq số NP_000724.1, SEQ ID NO: 1 đối với trình tự người; hoặc UniProt số Q95LI5 (phiên bản 49), NCBI GenBank số BAB71849.1, SEQ ID NO: 2 đối với trình tự ở khỉ đầu chó [*Macaca fascicularis*])). Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế gắn kết với epitop của CD3 hoặc kháng nguyên tế bào đích được bảo toàn giữa CD3 hoặc kháng nguyên tế bào đích từ các loài khác.

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" có nghĩa là việc gắn kết chọn lọc đối với kháng nguyên và có thể được phân biệt với các tương tác không mong muốn hoặc không đặc hiệu. Khả năng của gốc gắn kết kháng nguyên để gắn kết với chất xác định kháng nguyên đặc hiệu có thể được xác định thông qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (được phân tích trên dụng cụ BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), và các thử nghiệm gắn kết truyền thống (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Theo một phương án, mức độ gắn kết của gốc gắn kết kháng nguyên với protein không liên quan là nhỏ hơn khoảng 10% mức độ gắn kết của gốc gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên như được xác định, chẳng hạn, bằng

SPR. Theo các phương án nhất định, gốc gắn kết kháng nguyên mà gắn kết với kháng nguyên, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm gốc gắn kết kháng nguyên này, có hằng số phân ly (K_D) $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$, hoặc $\leq 0,001 \text{ nM}$ (ví dụ 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, ví dụ từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M , chẳng hạn, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M).

“Ái lực” dùng để chỉ độ bền của tổng cộng các tương tác không phải cùng hóa trị giữa vị trí liên kết đơn của phân tử (ví dụ, thụ thể) và cặp gắn kết của nó (ví dụ, phối tử). Trừ khi có quy định khác, như được sử dụng trong bản mô tả, “ái lực gắn kết” đề cập đến ái lực gắn kết bên trong mà phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp gắn kết (ví dụ, gốc gắn kết kháng nguyên và kháng nguyên, hoặc thụ thể và phối tử của nó). Ái lực của phân tử X đối với cặp Y của nó thông thường có thể được thể hiện bằng hằng số phân ly (K_D), là tỷ lệ giữa hằng số phân ly và tốc độ kết hợp (k_{off} và k_{on} , một cách tương ứng). Như vậy, các ái lực tương đương có thể bao gồm các hằng số tốc độ khác nhau, miễn là tỷ lệ giữa hằng số tốc độ vẫn như vậy. Ái lực có thể được xác định bằng các phương pháp được thiết lập tốt đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các phương pháp được mô tả ở đây. Phương pháp cụ thể để đo ái lực là phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

“Gắn kết giảm”, ví dụ gắn kết giảm với thụ thể Fc, chỉ giảm về ái lực đối với tương tác tương ứng, như được xác định ví dụ bằng SPR. Để làm rõ hơn, thuật ngữ này còn bao gồm cả sự giảm ái lực đến bằng không (hoặc thấp hơn giới hạn phát hiện của phương pháp phân tích), tức là hủy bỏ hoàn toàn tương tác. Ngược lại, “gắn kết tăng” chỉ sự tăng ái lực gắn kết đối với sự tương tác tương ứng.

“Kháng nguyên hoạt hóa tế bào T” như được sử dụng trong bản mô tả chỉ chất xác định kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt của tế bào lympho T, cụ thể là tế bào lympho T gây độc tế bào, có khả năng kích thích sự hoạt hóa tế bào T khi tương tác với phân tử gắn kết kháng nguyên. Cụ thể là, tương tác của phân tử gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T có thể kích thích sự hoạt hóa tế bào T bằng cách khởi phát tăng truyền tín hiệu của phức chất thụ thể tế bào T. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là CD3, cụ thể là cấu trúc siêu phân tử epsilon của CD3 (xem UniProt số P07766 (phiên bản 130), NCBI RefSeq số NP_000724.1, SEQ ID NO: 1 đối với trình tự người; hoặc UniProt số Q95LI5 (phiên bản 49), NCBI GenBank số BAB71849.1, SEQ ID NO: 2 đối với trình tự ở khi đầu chó [*Macaca fascicularis*]).

“Hoạt hóa tế bào T” như được sử dụng trong bản mô tả chỉ một hoặc nhiều đáp ứng tế bào của tế bào lympho T, cụ thể là tế bào lympho T gây độc tế bào, được chọn từ: sự tăng sinh, sự biệt hóa, sự tiết xytokin, giải phóng phân tử tác động gây độc tế bào, hoạt tính gây độc tế bào, và sự biểu hiện của gen đánh dấu hoạt hóa. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có khả năng kích thích sự hoạt hóa tế bào T. Thử nghiệm thích hợp để xác định sự hoạt hóa tế bào T là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này được mô tả ở đây.

“Kháng nguyên tế bào đích” như được sử dụng trong bản mô tả chỉ chất xác định kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt của tế bào đích, ví dụ tế bào trong khối u như tế bào ung thư hoặc tế bào của mô đệm khối u. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên tế bào đích là CD20, cụ thể là CD20 ở người (xem UniProt số P11836).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “thứ nhất”, “thứ hai” hoặc “thứ ba” liên quan đến phân tử Fab v.v., được sử dụng để thuận lợi cho việc phân biệt khi có nhiều hơn một trong mỗi loại gốc. Việc sử dụng các thuật ngữ này không được dự định để tạo ra thứ tự hoặc hướng cụ thể của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trừ khi được nêu rõ ràng.

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

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

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “chuỗi đơn” chỉ phân tử bao gồm monome của axit amin được liên kết thẳng bằng liên kết peptit. Theo các phương án nhất định, một trong số các gốc gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab chuỗi đơn, tức là phân tử Fab trong đó chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được nối bằng tác nhân liên kết peptit để tạo ra chuỗi peptit đơn. Theo phương án cụ thể này, đầu tận cùng C của chuỗi nhẹ Fab được nối với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab trong phân tử Fab chuỗi đơn.

Thuật ngữ phân tử Fab “lai chéo” (còn gọi là “Crossfab”) chỉ phân tử Fab trong đó các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi (tức là được thay thế lẫn nhau), tức là phân tử Fab lai chéo bao gồm chuỗi peptit gồm có miền biến đổi chuỗi nhẹ VL và miền cố định chuỗi nặng 1 CH1 (VL-CH1, theo chiều từ đầu tận cùng N đến đầu

tận cùng C), và chuỗi peptit gồm có miền biến đổi chuỗi nặng VH và miền cố định chuỗi nhẹ CL (VH-CL, theo chiều từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C). Để rõ ràng, trong phân tử Fab lai chéo trong đó các miền biến đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được trao đổi, chuỗi peptit bao gồm miền cố định chuỗi nặng 1 CH1 được đề cập đến trong bản mô tả là “chuỗi nặng” của phân tử Fab lai chéo.

Ngược lại, thuật ngữ phân tử Fab “thông thường” chỉ phân tử Fab ở dạng tự nhiên của nó, tức là bao gồm chuỗi nặng gồm có miền biến đổi và miền hằng định chuỗi nặng (VH-CH1, theo chiều từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C), và chuỗi nhẹ gồm có miền biến đổi và miền hằng định chuỗi nhẹ (VL-CL, theo chiều từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C).

Thuật ngữ “phân tử globulin miễn dịch” chỉ protein có cấu trúc của kháng thể có trong tự nhiên. Ví dụ, globulin miễn dịch của lớp IgG là glycoprotein heterotetrame khoảng 150000 dalton, gồm có hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng được liên kết disulfua. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nặng có miền biến đổi (VH), còn gọi là miền nặng biến đổi hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng, tiếp theo là ba miền cố định (CH1, CH2, và CH3), còn gọi là vùng hằng định chuỗi nặng. Tương tự là, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nhẹ có miền biến đổi (VL), còn gọi là miền nhẹ biến đổi hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ, tiếp theo là miền nhẹ hằng định (CL), còn gọi là vùng hằng định chuỗi nhẹ. Chuỗi nặng của globulin miễn dịch có thể phân chia thành một trong năm loại, gọi là α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG), hoặc μ (IgM), một số loại còn có thể được chia nhỏ thành loại con, ví dụ, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) và α_2 (IgA₂). Chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có thể được chia thành một trong hai loại, gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của miền cố định của nó. Globulin miễn dịch chủ yếu gồm có hai phân tử Fab và miền Fc, được liên kết thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch này.

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

“Mảnh kháng thể” đề cập đến phân tử khác với kháng thể nguyên vẹn bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn gắn kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn này gắn

kết. Các ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm nhưng không giới hạn ở Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, kháng thể thể đôi, kháng thể mạch thẳng, phân tử globulin miễn dịch chuỗi đơn (ví dụ, scFv), và kháng thể miền đơn. Để có thể xem xét về một số mảnh kháng thể nhất định, xem Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Để có thể xem xét về các mảnh scFv, ví dụ xem: Plückthun, trong tài liệu: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, trang 269-315 (1994); đồng thời xem: WO 93/16185; và Patent Mỹ số 5,571,894 và 5,587,458. Để bàn luận về các mảnh Fab và F(ab')₂ chứa gốc epitop gắn kết thụ thể hỗ trợ gắn kết các gốc epitop và có chu kỳ bán hủy *in vivo* tăng, xem patent Mỹ số 5,869,046. Kháng thể thể đôi là các mảnh kháng thể có hai điểm gắn kết kháng nguyên có thể có hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép. Xem, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); và Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Kháng thể thể ba và kháng thể thể bốn cũng được mô tả trong Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Kháng thể miền đơn là các mảnh kháng thể bao gồm tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Theo các phương án nhất định, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; ví dụ xem: Patent Mỹ số 6,248,516 B1). Các mảnh kháng thể có thể được thực hiện bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở kỹ thuật phân hủy protein phân giải của kháng thể nguyên vẹn cũng như sự sản sinh bởi tế bào vật chủ tái tổ hợp (ví dụ E. coli hoặc đại thực bào), như được mô tả ở đây.

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

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" đề cập đến miền chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể liên quan đến việc gắn kết kháng thể với kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL, một cách tương ứng) của kháng thể tự nhiên thường có các cấu trúc tương tự, với mỗi miền bao gồm bốn vùng khung làm việc (FR) được bảo toàn và ba vùng siêu biến (HVR). Xem, chẳng hạn, Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., trang 91 (2007). Miền VH hoặc VL đơn có thể đủ để mang lại đặc tính gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ “vùng siêu biến” hoặc “HVR”, như được sử dụng trong bản mô tả, đề cập đến mỗi vùng của miền biến đổi kháng thể siêu biến về trình tự và/hoặc tạo ra vòng được xác định về mặt cấu trúc (“vùng siêu biến”). Nhìn chung, kháng thể bốn chuỗi tự nhiên bao gồm sáu HVR; ba trong VH (H1, H2, H3), và ba trong VL (L1, L2, L3). HVR thường chứa các gốc axit amin từ vùng siêu biến và/hoặc từ vùng xác định bổ thể (CDR), HVR chứa gốc axit amin từ vùng xác định bổ thể có độ biến đổi trình tự cao nhất và/hoặc liên quan đến sự nhận diện kháng nguyên. Ngoại trừ CDR1 trong VH, CDR thường chứa các gốc axit amin tạo ra vùng siêu biến. Vùng siêu biến (HVR) cũng được đề cập đến là “vùng xác định bổ thể” (CDR), và các thuật ngữ này được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả liên quan đến các phần của vùng biến đổi tạo ra vùng gắn kết kháng nguyên. Vùng cụ thể này được mô tả trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) và trong Chothia et al., *J Mol Biol* 196:901-917 (1987), ở đó các định nghĩa bao gồm sự chồng khớp hoặc tập hợp con của gốc axit amin khi so sánh với nhau. Tuy nhiên, việc áp dụng định nghĩa này để chỉ CDR của kháng thể hoặc các biến thể của nó được dự định nằm trong phạm vi của thuật ngữ như được định nghĩa và được sử dụng trong bản mô tả. Các gốc axit amin thích hợp bao gồm CDR như được định nghĩa bởi mỗi tài liệu tham khảo trong số các tài liệu được trích dẫn ở trên được nêu dưới đây trong Bảng 1 để so sánh. Số lượng chính xác các gốc bao gồm CDR cụ thể sẽ thay đổi phụ thuộc vào trình tự và kích thước của CDR. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng xác định gốc nào bao gồm CDR cụ thể tạo ra vùng biến đổi trình tự axit amin của kháng thể. Các trình tự CDR nêu trong bản mô tả thường theo định nghĩa Kabat.

Bảng 1. Định nghĩa CDR¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34

V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ việc đánh số tất cả các định nghĩa CDR trong Bảng 1 là theo công ước đánh số nêu trong Kabat et al. (xem dưới đây).

² "AbM" có chữ cái in thường "b" như được sử dụng trong Bảng 1 đề cập đến CDR như được định nghĩa trong phần mềm tạo mô hình kháng thể "AbM" của phân tử Oxford.

Kabat et al. cũng định nghĩa hệ đánh số cho trình tự vùng biến đổi áp dụng được vào kháng thể bất kỳ. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể chỉ định rõ ràng hệ "đánh số theo Kabat" này cho trình tự vùng biến đổi bất kỳ, mà không dựa trên dữ liệu thử nghiệm ngoài bản thân trình tự này. Như được sử dụng trong bản mô tả kết hợp với trình tự vùng biến đổi, việc "đánh số theo Kabat" đề cập đến hệ đánh số nêu trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Trừ khi có quy định khác, các tài liệu tham khảo việc đánh số vị trí gốc axit amin cụ thể trong vùng biến đổi kháng thể theo hệ đánh số theo Kabat.

Như được sử dụng trong bản mô tả, vị trí axit amin của tất cả các vùng và miền cố định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đánh số theo hệ đánh số theo Kabat được mô tả trong Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) và được đề cập đến là "đánh số theo hệ thống đánh số Kabat" hoặc "đánh số theo Kabat" trong bản mô tả. Cụ thể là, hệ đánh số theo Kabat (xem trang 647-660 của tài liệu Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) được sử dụng cho miền cố định chuỗi nhẹ CL của isotyp kappa và lambda và hệ đánh số theo chỉ số đánh số Kabat EU (xem trang 661-723) được sử dụng cho miền cố định chuỗi nặng (CH1, bản lề, CH2 và CH3), còn được làm rõ hơn trong bản mô tả bằng cách đề cập đến "đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat" trong trường hợp này.

Trình tự polypeptit của danh mục trình tự không được đánh số theo hệ đánh số theo Kabat. Tuy nhiên, cũng được biết rõ bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ

thuật này để biến đổi việc đánh số của các trình tự của danh mục trình tự sang đánh số theo Kabat.

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

"Lớp" kháng thể hoặc globulin miễn dịch đề cập đến loại miền cố định hoặc vùng hằng định được sở hữu bởi chuỗi nặng của nó. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài lớp trong các lớp này có thể còn được chia thành các phân lớp (isotyp), chẳng hạn, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Miền cố định chuỗi nặng tương ứng với các lớp globulin miễn dịch khác nhau được gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ , một cách tương ứng.

Thuật ngữ "miền Fc" hoặc "vùng Fc" trong bản mô tả được sử dụng để xác định vùng đầu tận cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch mà chứa ít nhất một phần vùng hằng định. Thuật ngữ bao gồm vùng Fc trình tự tự nhiên và vùng Fc đột biến. Mặc dù ranh giới của vùng Fc của chuỗi nặng IgG có thể thay đổi nhẹ, vùng Fc chuỗi nặng IgG người thường được xác định là kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, các kháng thể được sản sinh bởi tế bào vật chủ có thể trải qua quá trình phân tách sau dịch mã của một hoặc nhiều, cụ thể là một hoặc hai, axit amin từ đầu tận cùng C của chuỗi nặng. Do đó kháng thể được sản sinh bởi tế bào vật chủ bằng cách biểu hiện phân tử axit nucleic đặc hiệu mã hóa chuỗi nặng độ dài đầy đủ có thể bao gồm chuỗi nặng độ dài đầy đủ này, hoặc nó có thể bao gồm biến thể được phân tách của chuỗi nặng độ dài đầy đủ này (ở đây còn được gọi là "chuỗi nặng biến thể được phân tách"). Điều này có thể là trường hợp trong đó hai axit amin đầu tận cùng C cuối cùng của chuỗi nặng là glyxin (G446) và lysin (K447, đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat). Do đó, lysin đầu tận cùng C (Lys447), hoặc glyxin (Gly446) và lysin (K447) đầu tận cùng C, của vùng Fc có thể hoặc không thể có mặt. Trình tự axit amin của chuỗi nặng bao gồm miền Fc (hoặc cấu trúc siêu phân tử của miền Fc như được xác định trong bản mô tả) được biểu thị ở đây không có dipeptit glyxin-lysin đầu tận cùng C nếu không được chỉ ra khác. Theo một phương án của sáng chế, chuỗi nặng bao gồm cấu trúc siêu phân tử của miền Fc như được cụ thể hóa trong bản mô tả, bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, bao gồm dipeptit glyxin-lysin đầu tận cùng C bổ sung (G446

và K447, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án của sáng chế, chuỗi nặng bao gồm cấu trúc siêu phân tử của miền Fc như được cụ thể hóa trong bản mô tả, bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, bao gồm gốc glyxin đầu tận cùng C bổ sung (G446, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Dược phẩm theo sáng chế, như được phẩm được mô tả ở đây, bao gồm quần thể các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế. Quần thể phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể bao gồm phân tử có chuỗi nặng độ dài đầy đủ và phân tử có chuỗi nặng biến thể được phân tách. Quần thể các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể gồm có hỗn hợp của các phân tử có chuỗi nặng độ dài đầy đủ và phân tử có chuỗi nặng biến thể được phân tách, trong đó ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80% hoặc ít nhất 90% phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có chuỗi nặng biến thể được phân tách. Theo một phương án của sáng chế, dược phẩm chứa quần thể các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm chuỗi nặng bao gồm cấu trúc siêu phân tử của miền Fc như được cụ thể hóa trong bản mô tả với dipeptit glyxin-lysin đầu tận cùng C bổ sung (G446 và K447, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án của sáng chế, dược phẩm chứa quần thể các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm chuỗi nặng bao gồm cấu trúc siêu phân tử của miền Fc như được cụ thể hóa trong bản mô tả với gốc glyxin đầu tận cùng C bổ sung (G446, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án của sáng chế, dược phẩm này chứa quần thể các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gồm có các phân tử bao gồm chuỗi nặng bao gồm cấu trúc siêu phân tử của miền Fc như được cụ thể hóa trong bản mô tả; phân tử bao gồm chuỗi nặng bao gồm cấu trúc siêu phân tử của miền Fc như được cụ thể hóa trong bản mô tả có gốc glyxin đầu tận cùng C bổ sung (G446, đánh số theo chỉ số EU của Kabat); và phân tử bao gồm chuỗi nặng bao gồm cấu trúc siêu phân tử của miền Fc như được cụ thể hóa trong bản mô tả có dipeptit glyxin-lysin đầu tận cùng C bổ sung (G446 và K447, đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định là theo hệ đánh số theo chỉ số EU, còn gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, MD, 1991 (đồng thời xem: ở trên). “Cấu trúc siêu phân tử” của miền Fc như được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến một trong hai polypeptit tạo ra miền Fc dime, tức là polypeptit bao gồm vùng hằng định đầu tận cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch, có khả năng tự kết hợp ổn định. Ví dụ, cấu trúc siêu phân tử của miền Fc của IgG bao gồm miền cố định IgG CH2 và IgG CH3.

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

Thuật ngữ “chức năng tác động” đề cập đến các hoạt tính sinh học có thể quy cho vùng Fc của kháng thể, thay đổi với isotyp kháng thể. Các ví dụ về chức năng tác động của kháng thể bao gồm: khả năng gắn kết C1q và tính gây độc tế bào phụ thuộc vào bề mặt (CDC), khả năng gắn kết thụ thể Fc, tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC), tính thực bào của tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP), khả năng tiết xytokin, khả năng hấp thụ của kháng nguyên qua trung gian phức chất miễn dịch bằng tế bào trình diện kháng nguyên, điều hòa giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B), và hoạt hóa tế bào B.

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

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

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "polypeptit" đề cập đến phân tử gồm có monome (axit amin) được liên kết thẳng bằng liên kết amit (còn được biết là liên kết peptit). Thuật ngữ "polypeptit" đề cập đến chuỗi bất kỳ của hai hoặc nhiều axit amin, và không dùng để chỉ độ dài cụ thể của sản phẩm. Như vậy, peptit, dipeptit, tripeptit, oligopeptit, "protein," "chuỗi axit amin," hoặc thuật ngữ bất kỳ khác được sử dụng để chỉ

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

Thuật ngữ polypeptit "được phân lập" hoặc biến thể, hoặc dẫn xuất của nó được dự định là polypeptit không có trong môi trường tự nhiên của nó. Không yêu cầu mức độ tinh chế cụ thể nào. Ví dụ, polypeptit được phân lập có thể được loại bỏ khỏi môi trường tự nhiên hoặc thiên nhiên của nó. Polypeptit và protein được sản xuất tái tổ hợp được biểu hiện trong tế bào vật chủ được coi là được phân lập nhằm mục đích của sáng chế, dưới dạng polypeptit tự nhiên hoặc polypeptit tái tổ hợp được tách, cắt phân đoạn, hoặc được tinh chế một phần hoặc hầu hết bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ.

"Phần trăm (%) đồng nhất trình tự axit amin" đối với trình tự polypeptit tham khảo được định nghĩa là phần trăm gốc axit amin trong trình tự dự phòng giống hệt với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham khảo, sau khi sắp xếp trình tự và đưa các khoảng trống vào, nếu cần, để đạt được phần trăm đồng nhất trình tự tối đa, và không coi thay thế bảo toàn bất kỳ là một phần của độ đồng nhất trình tự. Việc sắp xếp nhằm mục đích xác định phần trăm đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được theo các cách khác nhau thuộc kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính có sẵn đã được công bố như BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc phần mềm Megalign (DNASTAR). Người

có trình độ trung bình trong lĩnh vực có thể xác định các thông số thích hợp để sắp xếp trình tự, bao gồm thuật toán bất kỳ cần để đạt được sự sắp xếp tối đa trên độ dài đầy đủ của trình tự được so sánh. Tuy nhiên, nhằm mục đích trong bản mô tả, giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genentech, Inc., và mã nguồn được lưu trữ bằng việc lưu trữ tài liệu người sử dụng ở Cục Bản quyền Mỹ, Washington D.C., 20559, được đăng ký trong đăng ký bản quyền Mỹ số TXU510087. Chương trình ALIGN-2 được công bố sẵn của Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được viết lại từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 nên được viết lại để sử dụng trên hệ vận hành UNIX, bao gồm UNIX số V4.0D. Tất cả thông số so sánh trình tự được thiết lập bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi. Trong các tình huống mà ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, % đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin A cho trước đối với, với, hoặc dựa vào trình tự axit amin B cho trước (có thể được nói theo cách khác là trình tự axit amin A cho trước có hoặc bao gồm % đồng nhất trình tự axit amin nhất định đối với, với, hoặc dựa trên trình tự axit amin B cho trước) được tính như sau:

$$100 \text{ lần đoạn } X/Y$$

trong đó X là số lượng gốc axit amin được ghi điểm là các cặp giống hệt bởi chương trình sắp xếp trình tự ALIGN-2 trong quá trình sắp xếp của A và B của chương trình, và trong đó Y là tổng số lượng gốc axit amin trong B. Sẽ hiểu được rằng khi độ dài của trình tự axit amin A không bằng với độ dài của trình tự axit amin B, % đồng nhất trình tự axit amin của A đối với B không bằng % đồng nhất trình tự axit amin của B đối với A. Trừ khi có quy định cụ thể khác, tất cả giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng trong bản mô tả thu được như được mô tả trong đoạn mô tả ngay trước bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ "polynucleotit" chỉ phân tử hoặc cấu trúc axit nucleic được phân lập, ví dụ ARN thông tin (mARN), ARN nguồn gốc virus, hoặc ADN plasmid (pADN). Polynucleotit có thể bao gồm liên kết phosphodiester thông thường hoặc liên kết không thông thường (ví dụ liên kết amit, như được tìm thấy trong peptit axit nucleic (PNA). Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" chỉ một hoặc nhiều đoạn axit nucleic bất kỳ, ví dụ các mảnh ADN hoặc ARN, có trong polynucleotit.

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

Thuật ngữ axit nucleic hoặc polynucleotit có trình tự nucleotit "đồng nhất" ít nhất là, ví dụ, 95% với trình tự nucleotit tham khảo theo sáng chế, được dự định là trình tự nucleotit của polynucleotit giống hệt với trình tự tham khảo ngoại trừ việc trình tự polynucleotit có thể bao gồm lên đến năm đột biến điểm trong mỗi 100 nucleotit của trình tự nucleotit tham khảo. Nói cách khác, để đạt được polynucleotit có trình tự nucleotit tương đồng ít nhất 95% với trình tự nucleotit tham khảo, lên đến 5% nucleotit trong trình tự tham khảo có thể được làm khuyết hoặc được thay thế bằng một nucleotit khác, hoặc một số nucleotit lên đến 5% tổng số nucleotit trong trình tự tham khảo có thể được xen vào trình tự tham khảo. Các thay đổi này của trình tự tham khảo có thể xuất hiện ở vị trí tận cùng 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit tham khảo hoặc ở vị trí bất kỳ giữa các vị trí tận cùng này, được đặt rải rác riêng rẽ giữa các gốc trong trình tự tham khảo hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liền kề trong trình tự tham khảo. Để làm đối tượng thực tiễn, xem liệu trình tự polynucleotit cụ thể bất kỳ có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nucleotit theo sáng chế có thể được xác định theo cách thông thường bằng cách sử dụng các chương trình máy tính đã biết, như các chương trình được mô tả ở trên đối với polypeptit (ví dụ, ALIGN-2).

Thuật ngữ "cát-xét biểu hiện" chỉ polynucleotit được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp, với một loạt thành phần axit nucleic được cụ thể hóa mà cho phép sự phiên

mã của axit nucleic cụ thể trong tế bào đích. Cát-xét biểu hiện tái tổ hợp có thể được kết hợp vào plasmid, nhiễm sắc thể, ADN ty thể, ADN plastid, virus, hoặc mảnh axit nucleic. Thông thường, phần cát-xét biểu hiện tái tổ hợp của vector biểu hiện bao gồm, trong số các trình tự khác, trình tự axit nucleic cần được phiên mã và gen khởi đầu. Theo các phương án nhất định, cát-xét biểu hiện theo sáng chế bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế hoặc các mảnh của nó.

Thuật ngữ "vector" hoặc "vector biểu hiện" đồng nghĩa với "cấu trúc biểu hiện" và đề cập đến phân tử ADN được sử dụng để đưa vào và định hướng sự biểu hiện của gen đặc hiệu mà nó được liên kết điều khiển được trong tế bào đích. Thuật ngữ bao gồm vector dưới dạng cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vector kết hợp vào hệ gen của tế bào vật chủ mà nó được đưa vào. Vector biểu hiện theo sáng chế bao gồm cát-xét biểu hiện. Vector biểu hiện cho phép sự phiên mã của một lượng lớn mRNA ổn định. Ngay khi vector biểu hiện ở bên trong tế bào đích, phân tử axit ribonucleic hoặc protein được mã hóa bằng gen được sản sinh bằng cơ chế phiên mã tế bào và/hoặc dịch mã tế bào. Theo một phương án, vector biểu hiện theo sáng chế bao gồm cát-xét biểu hiện mà bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế hoặc các mảnh của nó.

Thuật ngữ "tế bào vật chủ", "dòng tế bào vật chủ," và "môi trường nuôi cấy tế bào vật chủ" được sử dụng thay thế cho nhau và dùng để chỉ tế bào mà axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, bao gồm thế hệ con của tế bào này. Tế bào vật chủ bao gồm "thể biến nạp" và "tế bào được biến nạp," bao gồm tế bào được biến nạp sơ cấp và thế hệ con thu được từ đó mà không quan tâm đến số lần cấy chuyển. Thế hệ con có thể không hoàn toàn giống hệt về hàm lượng axit nucleic đối với tế bào gốc, nhưng có thể chứa các đột biến. Thế hệ con đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc chọn lọc trong tế bào được biến nạp ban đầu được bao gồm trong bản mô tả. Tế bào vật chủ là loại hệ tế bào bất kỳ có thể được sử dụng để tạo ra các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép theo sáng chế. Tế bào vật chủ bao gồm các tế bào đã được nuôi cấy, ví dụ các tế bào động vật có vú được nuôi cấy, như tế bào CHO, tế bào BHK, tế bào NS0, tế bào SP2/0, tế bào u tủy YO, tế bào u tủy chuột nhắt P3X63, tế bào PER, tế bào PER.C6 hoặc tế bào lai, tế bào nấm men, tế bào côn trùng, và tế bào thực vật, để gọi tên chỉ một số tế bào, mà còn cả tế bào được bao gồm ở động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc thực vật được nuôi cấy hoặc mô động vật.

“Thụ thể Fc hoạt hóa” là thụ thể Fc mà gắn kết sau đó bởi miền Fc của kháng thể tạo ra các tín hiệu kích thích tế bào mang thụ thể thực hiện chức năng tác động. Thụ thể Fc hoạt hóa người bao gồm FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), và FcαRI (CD89).

Tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC) là cơ chế miễn dịch dẫn đến sự phân giải tế bào đích được phủ kháng thể bằng tế bào miễn dịch tác động. Tế bào đích là tế bào mà kháng thể hoặc các dẫn xuất của chúng bao gồm vùng Fc gắn kết đặc hiệu, thường thông qua phần protein từ đầu tận cùng N đến vùng Fc. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “ADCC giảm” được định nghĩa là sự giảm số lượng tế bào đích được phân giải trong thời gian đã định, ở nồng độ kháng thể đã định trong môi trường xung quanh tế bào đích, bằng cơ chế của ADCC được định nghĩa ở trên, và/hoặc sự tăng nồng độ của kháng thể trong môi trường xung quanh tế bào đích, được yêu cầu để đạt được sự phân giải của số lượng tế bào đích đã định trong thời gian đã định, bằng cơ chế của ADCC. Sự giảm ADCC liên quan đến ADCC qua trung gian cùng một kháng thể được sản sinh bằng cùng loại tế bào vật chủ, sử dụng các phương pháp sản xuất, tinh chế, phối trộn và bảo quản tiêu chuẩn giống nhau (mà đã được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực biết rõ), nhưng chưa được thiết kế di truyền. Ví dụ sự giảm ADCC qua trung gian kháng thể bao gồm trong miền Fc của nó phần thể axit amin mà làm giảm ADCC, liên quan đến ADCC qua trung gian cùng một axit amin không có thay thế axit amin này trong miền Fc. Thử nghiệm thích hợp để xác định ADCC là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ xem: công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2006/082515 hoặc công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831).

“Lượng hữu hiệu” của một chất được dùng để chỉ lượng cần thiết để làm biến đổi sinh lý trong tế bào hoặc mô mà nó được dùng.

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

“Cá thể” hoặc “đối tượng” là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật thuần hóa (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng

(ví dụ, người và động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Đặc biệt là, cá thể hoặc đối tượng này là người.

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

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

Như được sử dụng trong bản mô tả, “sự điều trị” (và các biến thể về ngữ pháp của nó như “điều trị” hoặc “việc điều trị”) dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng nhằm mục đích làm thay đổi tiến trình tự nhiên của bệnh ở cá thể được điều trị, và có thể được tiến hành để phòng ngừa hoặc trong tiến trình bệnh học lâm sàng. Các tác dụng điều trị bệnh mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngăn chặn sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh, làm dịu các triệu chứng, làm giảm hậu quả gây bệnh trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, ngăn chặn di căn, làm giảm tốc độ tiến triển bệnh, cải thiện hoặc giảm nhẹ tình trạng bệnh, và thuyên giảm hoặc cải thiện sự tiên lượng bệnh. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế được sử dụng để trì hoãn sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh.

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

Mô tả chi tiết các phương án

Sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có các tính chất ưu tiên để áp dụng điều trị bệnh, cụ thể là có khả năng sản xuất cải thiện (ví dụ đối với độ tinh khiết, hiệu suất). Thay thế axit amin trong phân tử Fab bao gồm các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế đặc biệt hữu hiệu trong việc làm giảm sự ghép cặp sai của chuỗi nhẹ với chuỗi nặng không bắt cặp (sản phẩm phụ loại Bence-Jones), có thể xuất hiện trong quá trình sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên hai/nhiều đặc hiệu dựa trên Fab có sự trao đổi VH/VL trong một (hoặc nhiều, trong trường hợp các phân tử bao gồm nhiều hơn hai phân tử Fab mà gắn kết kháng nguyên) của

các nhánh gắn kết của chúng (đồng thời xem: đơn sáng chế quốc tế số PCT/EP2015/057165, đặc biệt là các ví dụ trong đó, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn).

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

(a) phân tử Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất

(b) phân tử Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó các miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được thay thế lẫn nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên hoạt hóa tế bào T và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên tế bào đích, hoặc kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên tế bào đích và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên hoạt hóa tế bào T; và

trong đó:

- i) trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng axit amin tích điện dương (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit amin tích điện âm (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat); hoặc
- ii) trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng axit amin tích điện dương (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit amin tích điện âm (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo sáng chế, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T không bao gồm cả hai cải biến được nêu trong i) và ii). Miền cố định CL và CH1 của phân tử Fab thứ hai không được thay thế lẫn nhau (tức là vẫn không được trao đổi).

Theo một phương án về phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147

hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án khác, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án cụ thể, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án cụ thể hơn, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng lysin (K) hoặc arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo phương án cụ thể hơn, trong miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng arginin (R) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo các phương án cụ thể, miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) là loại isotyp kappa.

Theo cách khác, sự thay thế axit amin theo các phương án ở trên có thể được thực hiện trong miền cố định CL và miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ hai trong b) thay vì trong miền cố định CL và miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a). Theo các phương án đặc biệt như vậy, miền cố định CL của phân tử Fab thứ hai trong b) là loại isotyp kappa.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể còn bao gồm phân tử Fab thứ ba mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất. Theo các phương án cụ thể, phân tử Fab thứ ba nêu trên giống hệt với phân tử Fab thứ nhất trong a). Trong các phương án này, sự thay thế axit amin theo các phương án ở trên sẽ được thực hiện trong miền cố định CL và miền cố định CH1 của mỗi phân tử trong số phân tử Fab thứ nhất và phân tử Fab thứ ba. Theo cách khác, sự thay thế axit amin theo các phương án ở trên có thể được thực hiện trong miền cố định CL và miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ hai trong b), nhưng không được thực hiện trong miền cố định CL và miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất và phân tử Fab thứ ba.

Theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế còn bao gồm miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng liên kết ổn định.

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

Các thành phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được dung hợp với nhau trong các cấu hình khác nhau. Các cấu hình lấy làm ví dụ được thể hiện trên Fig.1.

Theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng liên kết ổn định.

Theo một số phương án, phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc.

Theo một phương án này, phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai. Theo một phương án cụ thể này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có phân tử Fab thứ nhất và thứ hai, miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit, trong đó phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai, và phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Cấu hình này được mô tả sơ lược trên các hình vẽ Fig.1G và 1K. Tùy ý, chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai còn có thể được dung hợp với nhau.

Theo một phương án khác nữa, phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Theo một phương án cụ thể này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có phân tử Fab thứ nhất và thứ hai, miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit, trong đó phân tử Fab thứ nhất và thứ hai mỗi phân tử được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Cấu hình này được mô tả sơ lược trên các hình vẽ Fig.1A và 1D. Phân tử Fab thứ nhất và thứ hai có thể được dung hợp với miền Fc trực tiếp hoặc thông qua tác nhân liên kết peptit. Theo một phương án cụ thể, mỗi phân tử Fab thứ nhất và thứ hai được dung hợp với miền Fc thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, vùng bản lề globulin miễn dịch này là vùng bản lề IgG₁ người, cụ thể là khi miền Fc là miền Fc của IgG₁.

Theo các phương án khác, phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc.

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

thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất, và phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc. Cấu hình này được mô tả sơ lược trên các hình vẽ Fig. 1H và 1L. Tùy ý, chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai còn có thể được dung hợp với nhau.

Phân tử Fab có thể được dung hợp với miền Fc hoặc với nhau trực tiếp hoặc thông qua tác nhân liên kết peptit, bao gồm một hoặc nhiều axit amin, thường khoảng 2-20 axit amin. Tác nhân liên kết peptit là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả ở đây. Thích hợp là, tác nhân liên kết peptit không sinh miễn dịch bao gồm, ví dụ, tác nhân liên kết peptit $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ hoặc $G_4(SG_4)_n$. “n” thường là số nguyên từ 1 đến 10, thường từ 2 đến 4. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit này có chiều dài ít nhất là 5 axit amin, theo một phương án, chiều dài là 5 đến 100, theo một phương án khác từ 10 đến 50 axit amin. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit này là $(G_xS)_n$ hoặc $(G_xS)_nG_m$ với G=glyxin, S=serin, và $(x=3, n=3, 4, 5$ hoặc 6, và $m=0, 1, 2$ hoặc 3) hoặc $(x=4, n=2, 3, 4$ hoặc 5 và $m=0, 1, 2$ hoặc 3), theo một phương án $x=4$ và $n=2$ hoặc 3, theo một phương án khác $x=4$ và $n=2$. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit này là $(G_4S)_2$. Tác nhân liên kết peptit đặc biệt thích hợp để dung hợp chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất và thứ hai với nhau là $(G_4S)_2$. Tác nhân liên kết peptit lấy làm ví dụ thích hợp để nối chuỗi nặng Fab của mảnh Fab thứ nhất và thứ hai bao gồm trình tự (D)- $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO 11 và 12). Ngoài ra, tác nhân liên kết có thể bao gồm (một phần của) vùng bản lề globulin miễn dịch. Cụ thể là khi phân tử Fab được dung hợp với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, nó có thể được dung hợp thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch hoặc một phần của nó, có hoặc không có tác nhân liên kết peptit bổ sung.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có gốc gắn kết kháng nguyên đơn lẻ (như phân tử Fab) có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích (ví dụ như được thể hiện trên Fig. 1A, D, G, H, K, L) là hữu ích, cụ thể là trong trường hợp sự tiếp nhận kháng nguyên tế bào đích được mong đợi sau khi gắn kết gốc gắn kết kháng nguyên ái lực cao. Trong các trường hợp như vậy, sự có mặt của nhiều hơn một gốc gắn kết kháng nguyên đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích có thể tăng cường sự tiếp nhận kháng nguyên tế bào đích, từ đó làm giảm khả năng của nó.

Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp khác, thuận lợi là có phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm hai hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên (như phân tử Fab) đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích (xem các Ví dụ được thể hiện trên Fig.1B, 1C, 1E, 1F, 1I, 1J, 1M hoặc 1N), ví dụ để tối ưu hóa việc hướng đích đến vị trí đích hoặc cho phép liên kết ngang các kháng nguyên tế bào đích.

Do đó, theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế còn bao gồm phân tử Fab thứ ba mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất. Kháng nguyên thứ nhất tốt hơn là kháng nguyên tế bào đích. Theo một phương án, phân tử Fab thứ ba là phân tử Fab thông thường. Theo một phương án, phân tử Fab thứ ba giống hệt với phân tử Fab thứ nhất (tức là phân tử Fab thứ nhất và thứ ba bao gồm trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ giống nhau và có cùng cách sắp xếp các miền (tức là thông thường hoặc lai chéo)). Theo một phương án cụ thể, phân tử Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, cụ thể là CD3, và phân tử Fab thứ nhất và thứ ba gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Theo các phương án thay thế, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế còn bao gồm phân tử Fab thứ ba mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai. Trong các phương án này, kháng nguyên thứ hai tốt hơn là kháng nguyên tế bào đích. Theo một phương án này, phân tử Fab thứ ba là phân tử Fab lai chéo (phân tử Fab trong đó các miền biến đổi VH và VL của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi/được thay thế lẫn nhau). Theo một phương án này, phân tử Fab thứ ba có độ tương đồng với phân tử Fab thứ hai (tức là phân tử Fab thứ hai và thứ ba bao gồm trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ giống nhau và có cùng cách sắp xếp các miền (tức là thông thường hoặc lai chéo)). Theo một phương án này, phân tử Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, cụ thể là CD3, và phân tử Fab thứ hai và thứ ba gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Theo một phương án, phân tử Fab thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất hoặc thứ hai của miền Fc.

Theo một phương án cụ thể, phân tử Fab thứ hai và thứ ba mỗi phân tử được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai. Theo một

phương án cụ thể này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có phân tử Fab thứ nhất, thứ hai và thứ ba, miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit, trong đó phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai, và phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, và trong đó phân tử Fab thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc. Cấu hình này được mô tả sơ lược trên Fig.1B và 1E (các phương án cụ thể, trong đó phân tử Fab thứ ba là phân tử Fab thông thường và tốt hơn là tương đồng với phân tử Fab thứ nhất), và Fig.1I và 1M (các phương án thay thế, trong đó phân tử Fab thứ ba là phân tử Fab lai chéo và tốt hơn là tương đồng với phân tử Fab thứ hai). Phân tử Fab thứ hai và thứ ba có thể được dung hợp với miền Fc trực tiếp hoặc thông qua tác nhân liên kết peptit. Theo một phương án cụ thể, mỗi phân tử Fab thứ hai và thứ ba được dung hợp với miền Fc thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, vùng bản lề globulin miễn dịch này là vùng bản lề IgG₁ người, cụ thể trong đó miền Fc là miền Fc của IgG₁. Tùy ý, chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai còn có thể được dung hợp với nhau.

Theo một phương án khác nữa, mỗi phân tử Fab thứ nhất và thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất. Theo một phương án cụ thể này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có phân tử Fab thứ nhất, thứ hai và thứ ba, miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit, trong đó phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất, và phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, và trong đó phân tử Fab thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc. Cấu hình này được mô tả sơ lược trên Fig.1C và Fig.1F (các phương án cụ thể, trong đó phân tử Fab thứ ba là phân tử Fab thông thường và tốt hơn là tương đồng với phân tử Fab thứ nhất) và trên Fig.1J

và 1N (các phương án thay thế, trong đó phân tử Fab thứ ba là phân tử Fab lai chéo và tốt hơn là tương đồng với phân tử Fab thứ hai). Phân tử Fab thứ nhất và thứ ba có thể được dung hợp với miền Fc trực tiếp hoặc thông qua tác nhân liên kết peptit. Theo một phương án cụ thể, mỗi phân tử Fab thứ nhất và thứ ba được dung hợp với miền Fc thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, vùng bản lề globulin miễn dịch này là vùng bản lề IgG₁ người, cụ thể trong đó miền Fc là miền Fc của IgG₁. Tùy ý, chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai còn có thể được dung hợp với nhau.

Trong các cấu hình của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T trong đó phân tử Fab được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của mỗi một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc thông qua vùng bản lề globulin miễn dịch, hai phân tử Fab, các vùng bản lề và miền Fc chủ yếu tạo ra phân tử globulin miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, phân tử globulin miễn dịch là globulin miễn dịch lớp IgG. Theo phương án cụ thể hơn, phân tử globulin miễn dịch là phân tử globulin miễn dịch phân lớp IgG₁. Theo một phương án khác nữa, globulin miễn dịch này là globulin miễn dịch phân lớp IgG₄. Theo phương án cụ thể khác, globulin miễn dịch này là globulin miễn dịch người. Theo các phương án khác, globulin miễn dịch này là globulin miễn dịch khảm hoặc globulin miễn dịch được nhân hóa.

Trong một số phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất và chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai được dung hợp với nhau, tùy ý thông qua liên kết peptit. Phụ thuộc vào cấu hình của phân tử Fab thứ nhất và thứ hai, chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất có thể được dung hợp ở đầu tận cùng C của nó đến đầu tận cùng N của chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai, hoặc chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai có thể được dung hợp ở đầu tận cùng C của nó đến đầu tận cùng N của chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất. Việc dung hợp của chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất và thứ hai còn làm giảm sự ghép cặp sai của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab không được bắt cặp, và còn làm giảm số lượng plasmit cần để biểu hiện một số phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế.

Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai (tức là phân tử Fab thứ hai bao gồm chuỗi nặng Fab lai

chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ), lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$), và polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). Theo các phương án nhất định, các polypeptit được liên kết đồng hóa trị, chẳng hạn, bằng liên kết disulfua.

Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai (tức là phân tử Fab thứ hai bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ), lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất, lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-CH2-CH3(-CH4)$). Theo các phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai (tức là phân tử Fab thứ hai bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ), lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}-CH2-CH3(-CH4)$).

Theo một số phương án trong các phương án này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit chuỗi nhẹ Fab lai chéo của phân tử Fab thứ hai, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$), và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). Theo các phương án khác trong các phương án này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử

tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(1)}-CL_{(1)}$), hoặc polypeptit trong đó polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai ($VL_{(1)}-CL_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}$), khi cần.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo các phương án này còn có thể bao gồm (i) polypeptit cấu trúc siêu phân tử của miền Fc ($CH2-CH3(-CH4)$), hoặc (ii) polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ ba có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với cấu trúc siêu phân tử của miền Fc ($VH_{(3)}-CH1_{(3)}-CH2-CH3(-CH4)$) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ ba ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$). Theo các phương án nhất định, các polypeptit được liên kết đồng hóa trị, chẳng hạn, bằng liên kết disulfua.

Theo một số phương án, phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai. Theo các phương án nhất định này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T không bao gồm miền Fc. Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có phân tử Fab thứ nhất và thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit, trong đó phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai. Cấu hình này được mô tả sơ lược trên các hình vẽ Fig.1O và 1S.

Theo các phương án khác, phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất. Theo các phương án nhất định này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T không bao gồm miền Fc. Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có phân tử Fab thứ nhất và thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit, trong đó phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất. Cấu hình này được mô tả sơ lược trên các hình vẽ Fig.1P và 1T.

Theo một số phương án, phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai, và phân

tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm phân tử Fab thứ ba, trong đó phân tử Fab thứ ba này được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất. Theo các phương án đặc biệt như vậy, phân tử Fab thứ ba này là phân tử Fab thông thường. Theo các phương án khác, phân tử Fab thứ ba này là phân tử Fab lai chéo như được mô tả ở đây, tức là phân tử Fab trong đó các miền biến đổi VH và VL của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi/được thay thế lẫn nhau. Theo các phương án nhất định này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có phân tử Fab thứ nhất, thứ hai và thứ ba, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit, trong đó phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai, và phân tử Fab thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất. Cấu hình này được mô tả sơ lược trên Fig.1Q và 1U (các phương án cụ thể, trong đó phân tử Fab thứ ba là phân tử Fab thông thường và tốt hơn là tương đồng với phân tử Fab thứ nhất).

Theo một số phương án, phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai, và phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm phân tử Fab thứ ba, trong đó phân tử Fab thứ ba này được dung hợp ở đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai. Theo các phương án đặc biệt như vậy, phân tử Fab thứ ba này là phân tử Fab lai chéo như được mô tả ở đây, tức là phân tử Fab trong đó các miền biến đổi VH và VL của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi/được thay thế lẫn nhau. Theo các phương án khác, phân tử Fab thứ ba này là phân tử Fab thông thường. Theo các phương án nhất định này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có phân tử Fab thứ nhất, thứ hai và thứ ba, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit, trong đó phân tử Fab thứ nhất được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai, và phân tử Fab thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai. Cấu hình này được mô tả sơ lược trên Fig.1W và 1Y (các phương án cụ thể, trong đó phân tử Fab thứ ba là phân tử Fab lai chéo và tốt hơn là tương đồng với phân tử Fab thứ hai).

Theo một số phương án, phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất, và phân

tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm phân tử Fab thứ ba, trong đó phân tử Fab thứ ba này được dung hợp ở đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất. Theo các phương án đặc biệt như vậy, phân tử Fab thứ ba này là phân tử Fab thông thường. Theo các phương án khác, phân tử Fab thứ ba này là phân tử Fab lai chéo như được mô tả ở đây, tức là phân tử Fab trong đó các miền biến đổi VH và VL của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi/được thay thế lẫn nhau. Theo các phương án nhất định này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có phân tử Fab thứ nhất, thứ hai và thứ ba, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit, trong đó phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất, và phân tử Fab thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất. Cấu hình này được mô tả sơ lược trên Fig.1R và 1V (các phương án cụ thể, trong đó phân tử Fab thứ ba là phân tử Fab thông thường và tốt hơn là tương đồng với phân tử Fab thứ nhất).

Theo một số phương án, phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất, và phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm phân tử Fab thứ ba, trong đó phân tử Fab thứ ba này được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai. Theo các phương án đặc biệt như vậy, phân tử Fab thứ ba này là phân tử Fab lai chéo như được mô tả ở đây, tức là phân tử Fab trong đó các miền biến đổi VH và VL của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi/được thay thế lẫn nhau. Theo các phương án khác, phân tử Fab thứ ba này là phân tử Fab thông thường. Theo các phương án nhất định này, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu gồm có phân tử Fab thứ nhất, thứ hai và thứ ba, và tùy ý một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit, trong đó phân tử Fab thứ hai được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất, và phân tử Fab thứ ba được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai. Cấu hình này được mô tả sơ lược trên Fig.1X và 1Z (các phương án cụ thể, trong đó phân tử Fab thứ ba là phân tử Fab lai chéo và tốt hơn là tương đồng với phân tử Fab thứ nhất).

Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ

nhất có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai, lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai (tức là phân tử Fab thứ hai bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ) ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}$). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$).

Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai (tức là phân tử Fab thứ hai bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ), lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$).

Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ ba có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất, lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai, lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai (tức là phân tử Fab thứ hai bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ) ($VH_{(3)}-CH1_{(3)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}$). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). Theo một số phương

án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ ba ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$).

Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai (tức là phân tử Fab thứ hai bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ), lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất, lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ ba ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VH_{(3)}-CH1_{(3)}$). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ ba ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$).

Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm polypeptit trong đó chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai, lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai (tức là phân tử Fab thứ hai bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ), lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ ba, lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ ba (tức là phân tử Fab thứ ba bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ) ($VH_{(1)}-CH1_{(1)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(3)}-CH1_{(3)}$). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit trong

đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ ba có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ ba ($VH_{(3)}-CL_{(3)}$).

Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ ba có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ ba (tức là phân tử Fab thứ ba bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ), lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng biến đổi chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai, lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai (tức là phân tử Fab thứ hai bao gồm chuỗi nặng Fab lai chéo, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng vùng biến đổi chuỗi nhẹ), lần lượt có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất ($VL_{(3)}-CH1_{(3)}-VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VH_{(1)}-CH1_{(1)}$). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ hai ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$) và polypeptit chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ nhất ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). Theo một số phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T còn bao gồm polypeptit trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ ba có chung liên kết peptit đầu tận cùng carboxy với vùng hằng định chuỗi nhẹ Fab của phân tử Fab thứ ba ($VH_{(3)}-CL_{(3)}$).

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, các thành phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (ví dụ, phân tử Fab, miền Fc) có thể được dung hợp trực tiếp hoặc thông qua các tác nhân liên kết khác nhau, cụ thể là tác nhân liên kết peptit bao gồm một hoặc nhiều axit amin, thường khoảng từ 2 đến 20 axit amin, được mô tả ở đây hoặc được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thích hợp là, tác nhân liên kết peptit không sinh miễn dịch bao gồm, ví dụ, tác nhân liên kết peptit $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ hoặc $G_4(SG_4)_n$, trong đó n thường là số nguyên từ 1 đến 10, thường là từ 2 đến 4.

Miền Fc

Miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gồm có cặp chuỗi polypeptit bao gồm các miền chuỗi nặng của phân tử globulin miễn dịch. Ví dụ, miền Fc của phân tử globulin miễn dịch G (IgG) là dime, mỗi cấu trúc siêu phân tử của nó

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

Theo một phương án theo sáng chế, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là miền Fc của IgG. Theo một phương án cụ thể, miền Fc là miền Fc của IgG₁. Theo một phương án khác nữa, miền Fc là miền Fc của IgG₄. Theo phương án cụ thể hơn, miền Fc là miền Fc của IgG₄ bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí S228 (đánh số theo Kabat), cụ thể là thay thế axit amin S228P. Sự thay thế axit amin này làm giảm việc trao đổi nhánh Fab in vivo của các kháng thể IgG₄ (xem Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). Theo phương án cụ thể khác, miền Fc là miền Fc người. Trình tự lấy làm ví dụ của vùng Fc của IgG₁ người được nêu trong SEQ ID NO: 13.

Cải biến miền Fc thúc đẩy sự dị dime hóa

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

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

Có một vài phương pháp để cải biến trong miền CH3 của miền Fc để ép dị dime hóa, được mô tả rõ trong, ví dụ, WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012058768, WO 2013157954,

WO 2013096291. Thông thường, trong tất cả các phương pháp này, miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc và miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc đều được xử lý kỹ thuật theo cách bổ sung để mỗi miền CH3 (hoặc chuỗi nặng chứa nó) không thể homodime hóa với chính nó nhưng bị ép dị dime hóa với miền CH3 khác được thiết kế di truyền bổ sung (sao cho miền CH3 thứ nhất và thứ hai dị dime hóa và không tạo ra homodime giữa hai miền CH3 thứ nhất hoặc hai miền CH3 thứ hai). Các phương pháp khác nhau để cải thiện sự dị dime hóa này được dự định là các thay thế khác nhau kết hợp với cải biến chuỗi nặng-chuỗi nhẹ (trao đổi/thay thế VH và VL ở một nhánh gắn kết và đưa các thay thế axit amin tích điện với các điện tích trái dấu ở bề mặt phân cách pha chung CH1/CL vào) trong phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế mà làm giảm sự ghép cặp sai chuỗi nhẹ và các sản phẩm phụ loại Bence Jones.

Theo một phương án cụ thể, cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc nêu trên còn được gọi là cải biến “khóa trong ổ”, bao gồm cải biến “khóa” trong một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và cải biến “ổ” trong một trong hai cấu trúc siêu phân tử còn lại của miền Fc.

Công nghệ khóa trong ổ được mô tả trong, ví dụ, US 5,731,168; US 7,695,936; Ridgway et al., *Prot Eng* 9, 617-621 (1996) and Carter, *J Immunol Meth* 248, 7-15 (2001). Nhìn chung, phương pháp này bao gồm việc đưa phần nhô ra (“khóa”) ở bề mặt chung của polypeptit thứ nhất và hốc tương ứng (“ổ”) ở bề mặt phân cách pha chung của polypeptit thứ hai, sao cho phần nhô ra này có thể được nằm trong hốc sao cho để thúc đẩy sự hình thành dị dime và cản trở sự hình thành homodime. Các phần nhô ra được cấu trúc bằng cách thay thế các chuỗi bên axit amin nhỏ từ bề mặt chung của polypeptit thứ nhất với chuỗi bên lớn hơn (ví dụ tyrosin hoặc tryptophan). Các hốc bù có kích thước giống hệt hoặc tương tự với các phần nhô ra được tạo ra ở bề mặt phân cách pha chung của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế các chuỗi bên axit amin lớn bằng các chuỗi axit amin nhỏ hơn (ví dụ alanin hoặc threonin).

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

phân tử thứ hai của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó phần nhô ra trong miền CH₃ của cấu trúc siêu phân tử thứ hai trong đó phần nhô ra trong miền CH₃ của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất là có thể được định vị.

Tốt hơn là gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm arginin (R), phenylalanin (F), tyrosin (Y), và tryptophan (W).

Tốt hơn là gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), serin (S), threonin (T), và valin (V).

Phần nhô ra và hốc có thể được thực hiện bằng cách làm biến đổi axit nucleic mã hóa polypeptit, ví dụ, bằng cách gây đột biến đặc hiệu điểm, hoặc bằng cách tổng hợp peptit.

Theo một phương án cụ thể, trong miền CH₃ của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc (cấu trúc siêu phân tử “khóa”), gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong miền CH₃ của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc cấu trúc siêu phân tử (“lỗm”), gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V). Ngoài ra, theo một phương án, trong cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc leuxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Ngoài ra, theo một phương án khác nữa, trong cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein (S354C) hoặc gốc axit glutamic ở vị trí 356 được thay thế bằng gốc xystein (E356C), và ngoài ra, trong cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Việc đưa hai gốc xystein này vào làm tạo hình thành cầu disulfua giữa hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, còn làm ổn định dime (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Theo một phương án cụ thể, cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin S354C và T366W, và cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin Y349C, T366S, L368A và Y407V (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án cụ thể, phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu kháng nguyên hoạt hóa tế bào T được dung hợp (tùy ý thông qua phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích) với cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc (bao gồm cải biến “khóa”). Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, việc dung hợp của phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu kháng nguyên hoạt hóa tế bào T với cấu trúc siêu phân tử chứa khóa của miền Fc sẽ (còn) làm tối thiểu hóa việc tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm hai phân tử Fab mà gắn kết với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T (va chạm trong không gian của hai polypeptit chứa khóa).

Các kỹ thuật khác để cải biến CH3 để ép dị dime hóa được dự định làm các kỹ thuật thay thế theo sáng chế và được mô tả trong, ví dụ, WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong EP 1870459 A1, được sử dụng theo cách khác. Phương pháp này dựa trên việc đưa vào các axit amin tích điện với các điện tích trái dấu ở những vị trí axit amin đặc hiệu ở bề mặt phân cách pha chung của miền CH3/CH3 giữa hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Một phương án được ưu tiên về phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế là đột biến axit amin R409D; K370E trong một trong hai miền CH3 (của miền Fc) và đột biến axit amin D399K; E357K trong miền còn lại trong các miền CH3 của miền Fc (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm đột biến axit amin T366W trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc và đột biến axit amin T366S, L368A, Y407V trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, và ngoài ra là đột biến axit amin R409D; K370E trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc và đột biến axit amin D399K; E357K trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm đột biến axit amin S354C, T366W trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc và đột biến axit amin Y349C, T366S, L368A,

Y407V trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T này bao gồm đột biến axit amin Y349C, T366W trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc và đột biến axit amin S354C, T366S, L368A, Y407V trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc và ngoài ra là đột biến axit amin R409D; K370E trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc và đột biến axit amin D399K; E357K trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc (tất cả đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO 2013/157953 được sử dụng theo cách khác. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin T366K và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin L351D (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác, miền CH3 thứ nhất còn bao gồm đột biến axit amin L351K. Theo một phương án khác, miền CH3 thứ hai còn bao gồm đột biến axit amin được chọn từ Y349E, Y349D và L368E (tốt hơn là L368E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO 2012/058768 được sử dụng theo cách khác. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin L351Y, Y407A và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin T366A, K409F. Theo một phương án khác, miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin khác ở vị trí T411, D399, S400, F405, N390, hoặc K392, ví dụ được chọn từ a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E hoặc T411W, b) D399R, D399W, D399Y hoặc D399K, c) S400E, S400D, S400R, hoặc S400K, d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V hoặc F405W, e) N390R, N390K hoặc N390D, f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F hoặc K392E (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin L351Y, Y407A và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin T366V, K409F. Theo một phương án khác, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin Y407A và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin T366A, K409F. Theo một phương án khác, miền CH3 thứ hai còn bao gồm đột biến axit amin K392E, T411E, D399R và S400R (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO 2011/143545 được sử dụng theo cách khác, ví dụ với cải biến axit amin ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm 368 và 409 (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Theo một phương án, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO 2011/090762, cũng sử dụng công nghệ khóa trong ổ được mô tả ở trên, được sử dụng theo cách khác. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin T366W và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin Y407A. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin T366Y và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin Y407T (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T hoặc miền Fc của nó là phân lớp IgG₂ và phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO 2010/129304 được sử dụng theo cách khác.

Theo một phương án thay thế, cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai của miền Fc bao gồm cải biến điều tiết tác dụng dẫn hướng tĩnh điện, ví dụ như được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế số WO 2009/089004. Nhìn chung, phương pháp này bao gồm bước thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin ở bề mặt chung của hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bằng gốc axit amin tích điện sao cho sự hình thành homodime trở thành không ưu tiên về mặt tĩnh điện nhưng dị dime hóa ưu tiên về mặt tĩnh điện. Theo một phương án như vậy, miền CH3 thứ nhất bao gồm sự thay thế axit amin của K392 hoặc N392 bằng axit amin tích điện âm (ví dụ axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D), tốt hơn là K392D hoặc N392D) và miền CH3 thứ hai bao gồm sự thay thế axit amin của D399, E356, D356, hoặc E357 bằng axit amin tích điện dương (ví dụ lysin (K) hoặc arginin (R), tốt hơn là D399K, E356K, D356K, hoặc E357K, và tốt hơn nữa là D399K và E356K). Theo một phương án khác, miền CH3 thứ nhất còn bao gồm sự thay thế axit amin của K409 hoặc R409 bằng axit amin tích điện âm (ví dụ axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D), tốt hơn là K409D hoặc R409D). Theo một phương án khác, miền CH3 thứ nhất còn hoặc theo cách khác bao gồm sự thay thế axit amin K439 và/hoặc K370 bằng axit amin tích điện âm (ví dụ axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D)) (tất cả đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án khác nữa, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO 2007/147901 được sử dụng theo cách khác. Theo một phương án, miền CH3 thứ nhất bao gồm đột biến axit amin K253E, D282K, và K322D và miền CH3 thứ hai bao gồm đột biến axit amin D239K, E240K, và K292D (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án khác nữa, phương pháp dị dime hóa được mô tả trong WO 2007/110205 có thể được sử dụng theo cách khác.

Theo một phương án, cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin K392D và K409D, và cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin D356K và D399K (đánh số theo hệ thống đánh số EU Kabat).

Cải biến miền Fc làm giảm khả năng gắn kết thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động

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

Do đó, theo các phương án cụ thể, miền Fc của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế thể hiện ái lực liên kết giảm với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động giảm, khi so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên. Theo một phương án này miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc nêu trên) thể hiện ít hơn 50%, tốt hơn là ít hơn 20%, tốt hơn nữa là ít hơn 10% và tốt nhất là ít hơn 5% ái lực gắn kết với thụ thể Fc, khi so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc của IgG₁ tự nhiên), và/hoặc ít hơn 50%, tốt hơn là ít hơn 20%, tốt hơn nữa là ít hơn 10% và tốt nhất là ít hơn 5% chức năng tác động, khi so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc của IgG₁ tự nhiên). Theo một phương án, miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc nêu trên) hầu như không gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc cảm ứng chức năng tác động. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo một

phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc người. Theo một phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ người hoạt hóa, cụ thể hơn là Fc γ RIIIa, Fc γ RI hoặc Fc γ RIIa người, cụ thể nhất là Fc γ RIIIa người. Theo một phương án, chức năng tác động là một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm CDC, ADCC, ADCCP, và tiết xytokin. Theo một phương án cụ thể, chức năng tác động là ADCC. Theo một phương án, miền Fc thể hiện ái lực gắn kết hầu như tương tự với thụ thể Fc mới sinh (FcRn), khi so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên. Đạt được gắn kết hầu như tương tự với FcRn khi miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc nêu trên) thể hiện lớn hơn khoảng 70%, cụ thể là lớn hơn khoảng 80%, cụ thể hơn là lớn hơn khoảng 90% ái lực gắn kết của miền Fc của IgG₁ tự nhiên (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc của IgG₁ tự nhiên) đối với FcRn.

Theo các phương án nhất định, miền Fc được thiết kế di truyền để có ái lực liên kết giảm với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động giảm, khi so với miền Fc không được thiết kế di truyền. Theo các phương án cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm một hoặc nhiều đột biến axit amin mà làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động. Thông thường, một hoặc nhiều đột biến axit amin giống nhau có mặt trong mỗi một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Theo một phương án, đột biến axit amin mà làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc. Theo một phương án, đột biến axit amin mà làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc ít nhất 2 lần, ít nhất 5 lần, hoặc ít nhất 10 lần. Theo các phương án, khi có nhiều hơn một đột biến axit amin mà làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc, tổ hợp của các đột biến axit amin này có thể làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc ít nhất 10 lần, ít nhất 20 lần, hoặc thậm chí ít nhất 50 lần. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc được thiết kế di truyền thể hiện ít hơn 20%, cụ thể là ít hơn 10%, cụ thể hơn là ít hơn 5% ái lực gắn kết với thụ thể Fc khi so với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc không được thiết kế di truyền. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ . Theo một số phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc ở người. Theo một số phương án, thụ thể Fc là thụ thể Fc hoạt hóa. Theo một phương án cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fc γ người hoạt hóa, cụ thể hơn là Fc γ RIIIa, Fc γ RI hoặc Fc γ RIIa người, cụ thể nhất là Fc γ RIIIa người. Tốt hơn là, khả năng gắn kết với mỗi một trong các thụ thể này được làm

giảm. Theo một số phương án, ái lực gắn kết với thành phần bổ sung, ái lực gắn kết đặc hiệu với C1q, cũng được làm giảm. Theo một phương án, ái lực gắn kết với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) không được làm giảm. Đạt được việc gắn kết hầu như tương tự với FcRn, tức là sự bảo quản ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể này khi miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc nêu trên) thể hiện lớn hơn khoảng 70% ái lực gắn kết của dạng không được thiết kế di truyền của miền Fc (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm dạng không được thiết kế di truyền nêu trên của miền Fc) với FcRn. Miền Fc, hoặc các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm miền Fc nêu trên, có thể thể hiện lớn hơn khoảng 80% và thậm chí lớn hơn khoảng 90% ái lực này. Theo các phương án nhất định, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được thiết kế di truyền để có chức năng tác động giảm, khi so với miền Fc không được thiết kế di truyền. Chức năng tác động giảm có thể bao gồm, như không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều chức năng sau: tính gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC) giảm, tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC) giảm, tính thực bào của tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP) giảm, khả năng tiết xytokin giảm, khả năng hấp thụ của kháng nguyên qua trung gian phức chất miễn dịch bằng tế bào trình diện kháng nguyên giảm, khả năng gắn kết với tế bào NK giảm, khả năng gắn kết với đại thực bào giảm, khả năng gắn kết với bạch cầu đơn nhân giảm, khả năng gắn kết với tế bào nhân đa hình giảm, sự chết tế bào theo chương trình cảm ứng việc truyền tín hiệu trực tiếp giảm, khả năng liên kết ngang của kháng thể gắn kết với đích giảm, sự trưởng thành tế bào đuôi gai giảm, hoặc việc môi tế bào T giảm. Theo một phương án, chức năng tác động giảm là một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm CDC giảm, ADCC giảm, ADCP giảm, và khả năng tiết xytokin giảm. Theo một phương án cụ thể, chức năng tác động giảm là ADCC giảm. Theo một phương án, ADCC giảm ít hơn 20% ADCC được gây cảm ứng bằng miền Fc không được thiết kế di truyền (hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc không được thiết kế di truyền).

Theo một phương án, đột biến axit amin mà làm giảm ái lực gắn kết của miền Fc với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động là thay thế axit amin. Theo một phương án, miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí được chọn từ nhóm E233, L234, L235, N297, P331 và P329 (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án cụ thể hơn, miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí được chọn từ nhóm L234, L235 và P329 (đánh số theo

chỉ số Kabat EU). Theo một số phương án, miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin L234A và L235A (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án này, miền Fc là miền Fc của IgG₁, cụ thể là miền Fc của IgG₁ người. Theo một phương án, miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí P329. Theo phương án cụ thể hơn, thay thế axit amin là P329A hoặc P329G, cụ thể là P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án, miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí P329 và thay thế axit amin khác ở vị trí được chọn từ E233, L234, L235, N297 và P331 (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án cụ thể hơn, thay thế axit amin khác nêu trên là E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D hoặc P331S. Theo các phương án cụ thể, miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí P329, L234 và L235 (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo các phương án cụ thể hơn, miền Fc bao gồm đột biến axit amin L234A, L235A và P329G (“P329G LALA”). Theo một phương án này, miền Fc là miền Fc của IgG₁, cụ thể là miền Fc của IgG₁ người. Tổ hợp “P329G LALA” của thay thế axit amin loại bỏ hầu như hoàn toàn khả năng gắn kết thụ thể Fc γ (cũng như bổ thể) của miền Fc của IgG₁ người, như được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. WO 2012/130831 cũng mô tả phương pháp tạo ra miền Fc đột biến như vậy và phương pháp xác định các tính chất của nó như khả năng gắn kết thụ thể Fc hoặc chức năng tác động.

Kháng thể IgG₄ thể hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và chức năng tác động giảm so với kháng thể IgG₁. Do vậy, theo một số phương án, miền Fc của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế là miền Fc của IgG₄, cụ thể là miền Fc của IgG₄ người. Theo một phương án, miền Fc của IgG₄ bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí S228, cụ thể là thay thế axit amin S228P (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Để làm giảm thêm ái lực gắn kết của nó với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động của nó, theo một phương án, miền Fc của IgG₄ bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí L235, cụ thể là thay thế axit amin L235E (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác nữa, miền Fc của IgG₄ bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí P329, cụ thể là thay thế axit amin P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án cụ thể, miền Fc của IgG₄ bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí S228, L235 và P329, cụ thể là thay thế axit amin S228P, L235E và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Đột biến miền Fc của IgG₄ này và các tính chất gắn kết thụ thể Fc γ của nó được mô tả trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án cụ thể, miền Fc thể hiện ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, khi so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên, là miền Fc của IgG₁ người bao gồm sự thay thế axit amin L234A, L235A và tùy ý P329G, hoặc miền Fc của IgG₄ người bao gồm sự thay thế axit amin S228P, L235E và tùy ý P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo các phương án nhất định, việc N-glycosyl hóa của miền Fc được loại bỏ. Theo một phương án này, miền Fc bao gồm đột biến axit amin ở vị trí N297, cụ thể là thay thế axit amin thay thế asparagin bằng alanin (N297A) hoặc axit aspartic (N297D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

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

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

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

Chức năng tác động của miền Fc, hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm miền Fc, có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết

trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thử nghiệm thích hợp để xác định ADCC được mô tả ở đây. Các ví dụ khác về thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm được mô tả trong Patent Mỹ số 5,500,362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) and Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); Patent Mỹ số 5,821,337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Theo cách khác, phương pháp thử nghiệm không có hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (xem, ví dụ, thử nghiệm gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACTITM để đo số lượng tế bào theo dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); và thử nghiệm gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Các tế bào tác động hữu ích để thử nghiệm bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mô hình động vật như được mô tả trong Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

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

Gốc gắn kết kháng nguyên

Phân tử gắn kết kháng nguyên theo sáng chế là đặc hiệu kép, tức là nó bao gồm ít nhất hai gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với hai chất xác định kháng nguyên riêng biệt. Theo sáng chế, các gốc gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab (tức là miền gắn kết kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mỗi miền bao gồm miền biến đổi và miền cố định). Theo một phương án, phân tử Fab nêu trên là người. Theo một phương án khác nữa, phân tử Fab này được nhân hóa. Theo một phương án khác nữa, phân tử Fab này bao gồm miền cố định chuỗi nặng và miền cố định chuỗi nhẹ của người.

Ít nhất một trong các gốc gắn kết kháng nguyên là phân tử Fab lai chéo. Sự biến đổi này làm giảm sự ghép cặp sai của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ các phân tử Fab khác nhau, nhờ đó làm cải thiện năng suất cả độ tinh khiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế trong sản xuất tái tổ hợp. Trong phân tử Fab lai chéo cụ thể hữu ích đối với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, các miền biến đổi của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab (lần lượt là VL và VH) được trao đổi. Tuy nhiên, thậm chí với sự trao đổi miền này, việc chuẩn bị phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể bao gồm các sản phẩm phụ nhất định do cái gọi là sự tương tác loại Bence Jones giữa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ghép cặp sai (xem tài liệu: Schaefer et al, PNAS, 108 (2011) 11187-11191). Để làm giảm thêm sự ghép cặp sai của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ các phân tử Fab khác nhau và từ đó làm tăng độ tinh khiết và hiệu suất của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T mong muốn, theo sáng chế, các axit amin tích điện với các điện tích trái dấu được đưa vào ở những vị trí axit amin đặc hiệu trong các miền CH1 và CL của (các) phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, hoặc phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T. Các biến đổi điện tích được tạo ra hoặc ở (các) phân tử Fab thông thường bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (như được thể hiện trong các hình vẽ Fig.1 A-C, G-J), hoặc trong (các) phân tử Fab lai chéo bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (như được thể hiện ví dụ trên Fig.1 D-F, K-N) (nhưng không phải trong cả hai phân tử). Theo các phương án cụ thể, các biến đổi điện tích được tạo ra trong (các) phân tử Fab thông thường bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mà theo các phương án cụ thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích).

Theo một phương án cụ thể theo sáng chế, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng gắn kết đồng thời với kháng nguyên tế bào đích, cụ thể là kháng nguyên tế bào khối u, và kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, cụ thể là CD3. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng liên kết ngang tế bào T và tế bào đích bằng cách gắn kết đồng thời với kháng nguyên tế bào đích và kháng nguyên hoạt hóa tế bào T. Theo phương án cụ thể hơn, việc gắn kết đồng thời này làm tế bào đích phân giải, cụ thể là tế bào khối u. Theo một phương án, việc gắn kết đồng thời này tạo ra đáp ứng tế bào của tế bào lympho T. Theo các phương án khác, việc gắn kết đồng thời này tạo ra đáp ứng tế bào của tế bào lympho T, cụ thể là tế bào

lympho T gây độc tế bào, được chọn từ nhóm: tăng sinh, biệt hóa, tiết xytokin, giải phóng phân tử tác động gây độc tế bào, hoạt tính gây độc tế bào, và sự biểu hiện của gen đánh dấu hoạt hóa. Theo một phương án, việc gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, cụ thể là CD3, mà không gắn kết đồng thời với kháng nguyên tế bào đích không làm hoạt hóa tế bào T.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng hướng lại hoạt tính gây độc tế bào của tế bào T với tế bào đích. Theo một phương án cụ thể, việc hướng lại này là độc lập với sự trình bày kháng nguyên peptit qua trung gian MHC bằng tế bào đích và và/hoặc tính đặc hiệu của tế bào T.

Cụ thể là, tế bào T theo phương án bất kỳ trong số các phương án của sáng chế là tế bào T gây độc tế bào. Theo một số phương án, tế bào T là tế bào T $CD4^+$ hoặc $CD8^+$, cụ thể là tế bào T $CD8^+$.

Làm hoạt hóa phân tử Fab mà gắn kết với kháng nguyên tế bào T

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm ít nhất một phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T (ở đây còn được gọi là “làm hoạt hóa phân tử Fab mà gắn kết với kháng nguyên tế bào T”). Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm không quá một phân tử Fab (hoặc phân tử Fab khác) có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T tạo ra gắn kết hóa trị 1 với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T.

Theo các phương án cụ thể, phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là phân tử Fab lai chéo như được mô tả ở đây, tức là phân tử Fab trong đó các miền biến đổi VH và VL của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi/được thay thế lẫn nhau. Theo các phương án này, (các) phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu kháng nguyên tế bào đích là phân tử Fab thông thường. Theo các phương án, trong đó có trên một phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, tối hơn là phân tử Fab lai chéo và các phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là các phân tử Fab thông thường.

Theo các phương án thay thế, phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là phân tử Fab thông thường. Theo các phương án này, (các) phân tử Fab mà

gắn kết đặc hiệu kháng nguyên tế bào đích là phân tử Fab lai chéo như được mô tả ở đây, tức là phân tử Fab trong đó các miền biến đổi VH và VL của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi/được thay thế lẫn nhau.

Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là CD3, cụ thể là CD3 ở người (SEQ ID NO: 1) hoặc CD3 ở khỉ đuôi chó (SEQ ID NO: 2), cụ thể nhất là CD3 ở người. Theo một phương án cụ thể, phân tử Fab mà gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T phản ứng chéo đối với (tức là gắn kết đặc hiệu với) CD3 ở người và khỉ đuôi chó. Theo một số phương án, kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là cấu trúc siêu phân tử epsilon của CD3 (epsilon CD3).

Theo một số phương án, phân tử Fab mà gắn kết kháng nguyên hoạt hóa tế bào T gắn kết đặc hiệu với CD3, cụ thể là epsilon CD3, và bao gồm ít nhất một vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (CDR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 và ít nhất một CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án, phân tử Fab mà gắn kết CD3 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 5, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 8, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 9, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án khác nữa, phân tử Fab mà gắn kết CD3 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 4, CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 67, CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 68, CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 9, và CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án, phân tử Fab mà gắn kết CD3 bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 3 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với SEQ ID NO: 7.

Theo một phương án, phân tử Fab mà gắn kết CD3 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7.

Theo một phương án, phân tử Fab mà gắn kết CD3 bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 3 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 7.

Phân tử Fab mà gắn kết kháng nguyên tế bào đích

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm ít nhất một phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích (ở đây còn được gọi là “phân tử Fab mà gắn kết kháng nguyên tế bào đích”). Theo các phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm hai phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích. Theo phương án cụ thể này, mỗi trong các phân tử Fab này gắn kết đặc hiệu với cùng chất xác định kháng nguyên. Theo phương án cụ thể hơn, tất cả trong số các phân tử Fab này là giống hệt nhau, tức là chúng bao gồm các trình tự axit amin giống nhau bao gồm sự thay thế axit amin giống nhau trong miền CH1 và CL như được mô tả ở đây (nếu có). Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm phân tử globulin miễn dịch mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích. Theo một phương án phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm không quá hai phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Theo các phương án cụ thể, (các) phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là phân tử Fab thông thường. Theo các phương án này, (các) phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là phân tử Fab lai chéo như được mô tả ở đây, tức là phân tử Fab trong đó các miền biến đổi VH và VL của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi/được thay thế lẫn nhau.

Theo các phương án thay thế, (các) phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là phân tử Fab lai chéo như được mô tả ở đây, tức là phân tử Fab trong đó các miền biến đổi VH và VL của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi/được thay thế lẫn nhau. Theo các phương án này, (các) phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là phân tử Fab thông thường.

Phân tử Fab mà gắn kết kháng nguyên tế bào đích gắn với chất xác định kháng nguyên đặc hiệu và có khả năng hướng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T đến vị trí đích, ví dụ đến loại tế bào khối u đặc hiệu mà mang chất xác định kháng nguyên.

Theo các phương án nhất định, phân tử Fab mà gắn kết kháng nguyên tế bào đích gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào.

Theo các phương án nhất định, phân tử Fab mà gắn kết kháng nguyên tế bào đích được nhằm vào kháng nguyên có liên quan đến điều kiện bệnh lý, như kháng nguyên được trình bày trên tế bào khối u hoặc trên tế bào nhiễm virus. Các kháng nguyên tế bào đích thích hợp là các kháng nguyên bề mặt tế bào, ví dụ, nhưng không giới hạn ở, các thụ thể bề mặt tế bào. Theo các phương án cụ thể, kháng nguyên tế bào đích là kháng nguyên ở người. Các kháng nguyên tế bào đích minh họa bao gồm CD20, Her2, Her3, MCSP (chondroitin sulfat proteoglycan liên quan đến u hắc sắc tố, còn được biết là chondroitin sulfat proteoglycan 4), hoặc BCMA (đích chín tế bào B ở người, còn được biết là thành viên siêu họ thụ thể yếu tố hoại tử khối u 17 (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 17 (UniProt Q02223))).

Theo các phương án cụ thể, kháng nguyên tế bào đích là CD20, cụ thể là CD20 ở người. Theo một phương án, kháng nguyên tế bào đích là CD20 và phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích nêu trên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (CDR) 1 của SEQ ID NO: 46, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 47, và CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 48, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 49, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 50 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 51. Theo một phương án khác, kháng nguyên tế bào đích là CD20 và phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích nêu trên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 30, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 31. Theo một phương án khác, kháng nguyên tế bào đích là CD20 và phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích nêu trên bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 30, và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 31. Theo một phương án cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 18, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 19, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 20, và polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc

99% với trình tự của SEQ ID NO: 21. Theo phương án cụ thể khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 18, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 19, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 20 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 21. Theo một phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 32, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 19, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 20, và polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 21. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 32, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 19, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 20 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 21. Theo một phương án khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 36, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 37, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 38, và polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 39. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 36, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 37, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 38 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 39. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 40, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 41, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 20, và polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 21. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 40, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 41, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 20 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 21.

Theo các phương án khác, kháng nguyên đích là Her2, cụ thể là Her2 ở người. Theo một phương án, kháng nguyên tế bào đích là Her2 và phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích nêu trên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 61, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 62, Theo một phương án khác, kháng nguyên tế bào đích là Her2 và phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích nêu trên bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 61, và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 62. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 21, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 52, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 53, và polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 54. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 21, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 52, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 53 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 54.

Theo các phương án khác, kháng nguyên đích là Her3, cụ thể là Her3 ở người. Theo một phương án, kháng nguyên tế bào đích là Her3 và phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích nêu trên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 63, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 64, Theo một phương án khác, kháng nguyên tế bào đích là Her3 và phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích nêu trên bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 63, và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 64. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 21, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 55, polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 56, và polypeptit mà có độ tương đồng trình tự ít nhất

là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 57. Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 21, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 55, trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 56 và trình tự polypeptit của SEQ ID NO: 57.

Theo các phương án khác, kháng nguyên đích là chondroitin sulfat proteoglycan liên quan đến u hắc sắc tố (MCSP), cụ thể là MCSP ở người. Theo một phương án, kháng nguyên tế bào đích là MCSP và phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích nêu trên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 65, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 66. Theo một phương án khác, kháng nguyên tế bào đích là Her2 và phân tử Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích nêu trên bao gồm trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 65, và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 66.

Theo một số phương án, kháng nguyên đích là BCMA. Theo các phương án khác, kháng nguyên tế bào đích không phải là BCMA.

Các polynucleotit

Sáng chế còn đề xuất các polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T như được mô tả ở đây hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, mảnh đã nêu là mảnh gắn kết kháng nguyên.

Các polynucleotit mã hóa các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể được biểu hiện dưới dạng polynucleotit đơn mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T hoặc dưới dạng đa (ví dụ hai hoặc nhiều) polynucleotit mà được đồng biểu hiện. Các polypeptit được mã hóa bởi các polynucleotit mà được đồng biểu hiện có thể liên kết qua, ví dụ liên kết disulfua hoặc các biện pháp khác để tạo thành phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chức năng. Ví dụ, phần chuỗi nhẹ của phân tử Fab có thể được mã hóa bởi polynucleotit riêng từ phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm phần chuỗi nặng của phân tử Fab, cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và tùy ý (một phần của) phân tử Fab khác. Khi được đồng biểu hiện, các polypeptit chuỗi nặng sẽ gắn kết với các polypeptit chuỗi nhẹ để tạo ra phân tử Fab. Theo ví dụ khác nữa, phần của phân tử gắn

kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và tùy ý (một phần của) một hoặc nhiều phân tử Fab có thể được mã hóa bằng polynucleotit riêng từ phần của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm phần kia của hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và tùy ý (một phần của) phân tử Fab. Khi được đồng biểu hiện, các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc sẽ liên kết để tạo ra miền Fc.

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

Theo các phương án nhất định, polynucleotit hoặc axit nucleic là ADN. Theo các phương án khác, polynucleotit của sáng chế là ARN, ví dụ, ở dạng của ARN thông tin (mARN). ARN của sáng chế có thể dài đơn hoặc dài kép.

Phương pháp tái tổ hợp

Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể thu được, ví dụ, bằng cách tổng hợp peptit ở trạng thái rắn (ví dụ, tổng hợp pha rắn Merrifield) hoặc sản xuất tái tổ hợp. Để sản xuất tái tổ hợp một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh), ví dụ, như được mô tả trên đây, được phân lập và được xen vào một hoặc nhiều vec-tơ để tách dòng và/hoặc biểu hiện thêm trong tế bào vật chủ. Polynucleotit này có thể dễ được phân lập và được giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường. Theo một phương án, sáng chế đề xuất vec-tơ, tốt hơn là vec-tơ biểu hiện, chứa một hoặc nhiều polynucleotit theo sáng chế. Các phương pháp đã biết rõ đối với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để xây dựng nên cấu trúc vec-tơ biểu hiện chứa trình tự mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) cùng với các tín hiệu kiểm soát phiên mã/dịch mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp *in vivo*/tái tổ hợp di truyền. Xem, ví dụ, các kỹ thuật được mô tả trong Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); và Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.

(1989). Vec-tơ biểu hiện có thể là một phần của plasmid, virut, hoặc có thể là mảnh axit nucleic. Vec-tơ biểu hiện bao gồm cát-xét biểu hiện mà polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) (tức là vùng mã hóa) được tách dòng trong quá trình kết hợp điều khiển được với gen khởi đầu và/hoặc thành phần kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã khác. Như được sử dụng trong bản mô tả, "vùng mã hóa" là một phần của axit nucleic gồm các codon được dịch mã thành axit amin. Mặc dù "codon kết thúc" (TAG, TGA, hoặc TAA) không được dịch mã thành axit amin, nó có thể được coi là một phần của vùng mã hóa, nếu có, nhưng trình tự bên sườn bất kỳ, ví dụ, gen khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, đầu cuối phiên mã, intron, vùng không được dịch mã 5' và 3', và dạng tương tự, không phải một phần của vùng mã hóa. Hai hoặc nhiều vùng mã hóa có thể có mặt trong cấu trúc polynucleotit đơn, ví dụ, trên vec-tơ đơn, hoặc trong các cấu trúc polynucleotit riêng rẽ, ví dụ, trên các vec-tơ (khác nhau) riêng rẽ. Hơn nữa, vec-tơ bất kỳ có thể chứa vùng mã hóa đơn, hoặc có thể chứa hai hoặc nhiều vùng mã hóa, ví dụ, vec-tơ theo sáng chế có thể mã hóa một hoặc nhiều polypeptit, được tách sau dịch mã hoặc đồng dịch mã thành các protein cuối cùng thông qua phân tách protein phân giải. Ngoài ra, vec-tơ, polynucleotit, hoặc axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa các vùng mã hóa khác loại, được dung hợp hoặc không được dung hợp với polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T (mảnh) theo sáng chế, hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của nó. Các vùng mã hóa khác loại bao gồm, nhưng không giới hạn, các thành phần hoặc mô-típ được cụ thể hóa, như peptit tín hiệu bài tiết hoặc miền chức năng khác loại. Sự kết hợp điều khiển được là khi vùng mã hóa sản phẩm gen, ví dụ, polypeptit, được kết hợp với một hoặc nhiều trình tự điều hòa theo cách để biểu hiện sản phẩm gen dưới sự ảnh hưởng hoặc kiểm soát của (các) trình tự điều hòa. Hai mảnh ADN (như vùng mã hóa polypeptit và gen khởi đầu được kết hợp với nó) "được kết hợp điều khiển được" nếu sự cảm ứng của chức năng gen khởi đầu dẫn đến sự phiên mã mRNA mã hóa sản phẩm gen mong muốn và nếu bản chất của liên kết giữa hai mảnh ADN không can thiệp vào khả năng định hướng sự biểu hiện của sản phẩm gen của trình tự điều hòa biểu hiện hoặc can thiệp vào khả năng được phiên mã của mẫu ADN. Do đó, vùng gen khởi đầu được kết hợp điều khiển được với axit nucleic mã hóa polypeptit nếu gen khởi đầu này có khả năng ảnh hưởng đến sự phiên mã của axit nucleic này. Gen khởi đầu có thể là gen khởi đầu đặc hiệu tế bào định hướng sự phiên mã cơ bản của ADN chỉ ở các tế bào được xác định trước. Các thành phần kiểm soát phiên mã khác, ngoài gen khởi đầu, ví dụ, gen tăng cường, gen thực hiện, gen

kìm hãm, và tín hiệu kết thúc phiên mã, có thể được kết hợp điều khiển được với polynucleotit để định hướng sự phiên mã đặc hiệu tế bào. Các gen khởi đầu thích hợp và các vùng kiểm soát phiên mã khác được bộc lộ ở đây. Các vùng kiểm soát phiên mã khác nhau đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vùng này bao gồm, nhưng không giới hạn, vùng kiểm soát phiên mã, có chức năng trong các tế bào động vật có xương sống, như, nhưng không giới hạn ở, đoạn gen khởi đầu và gen tăng cường từ xytomegalovirut (ví dụ, gen khởi đầu sớm tức thời, tiếp hợp với intron-A), virut khi không đuôi 40 (ví dụ, gen khởi đầu sớm), và retrovirut (như, ví dụ, virut sarcom Rous). Các vùng kiểm soát phiên mã khác bao gồm các vùng có nguồn gốc từ gen động vật có xương sống như actin, protein sốc nhiệt, hormon sinh trưởng bò và α -globin thỏ, cũng như các trình tự khác có khả năng kiểm soát sự biểu hiện gen trong các tế bào nhân chuẩn. Các vùng kiểm soát phiên mã thích hợp khác bao gồm gen khởi đầu và gen tăng cường đặc hiệu mô cũng như gen khởi đầu cảm ứng được (ví dụ, gen khởi đầu cảm ứng được tetracyclin). Tương tự, các thành phần kiểm soát dịch mã khác nhau đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thành phần này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vị trí gắn kết ribosom, codon bắt đầu và kết thúc dịch mã, và các thành phần có nguồn gốc từ hệ virut (đặc biệt là vị trí vào của ribosom bên trong, hoặc IRES, còn được gọi là trình tự CITE). Cát-xét biểu hiện còn có thể bao gồm các dấu hiệu khác như gốc sao chép, và/hoặc thành phần kết hợp nhiễm sắc thể như đoạn lặp cuối dài của retrovirut (LTR), hoặc đoạn lặp cuối đảo ngược (ITR) của virut liên quan đến adeno (AAV).

Vùng mã hóa polynucleotit và axit nucleic theo sáng chế có thể được kết hợp với các vùng mã hóa bổ sung mà mã hóa peptit bài tiết hoặc tín hiệu, mà hướng sự tiết của polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit theo sáng chế. Ví dụ, nếu mong muốn sự tiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, ADN mã hóa trình tự tín hiệu có thể được bố trí ngược dòng axit nucleic mã hóa các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế hoặc mảnh của nó. Theo giả thiết tín hiệu, protein được tiết ra bởi tế bào động vật có vú có peptit tín hiệu hoặc trình tự dẫn hướng tiết được phân tách từ protein trưởng thành ngay khi phát chuỗi protein sinh trưởng qua lưới nội bào thô được bắt đầu. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rằng polypeptit được tiết ra bởi các tế bào động vật có xương sống thường có peptit tín hiệu được dung hợp với đầu tận cùng N của polypeptit, được phân tách từ polypeptit được dịch mã để sản sinh dạng được tiết hoặc "trưởng thành" của polypeptit. Theo một số

phương án nhất định, peptit tín hiệu tự nhiên, ví dụ, peptit tín hiệu của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch được sử dụng, hoặc dẫn xuất chức năng của trình tự giữ được khả năng hướng sự tiết polypeptit được kết hợp điều khiển được với nó. Theo một cách khác, peptit tín hiệu của động vật có vú khác loại, hoặc dẫn xuất chức năng của nó, có thể được sử dụng. Ví dụ, trình tự gen dẫn hướng loại đại có thể được thay thế bằng trình tự gen dẫn hướng của gen hoạt hóa plasminogen mô người (TPA) hoặc β -glucuronidaza chuột nhắt.

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

Theo phương án khác, tế bào vật chủ chứa một hoặc nhiều polynucleotit theo sáng chế được đề xuất. Theo một số phương án nhất định, tế bào vật chủ chứa một hoặc nhiều vec-tơ theo sáng chế được đề xuất. Polynucleotit và vec-tơ này có thể kết hợp dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu này, một mình hoặc kết hợp, được mô tả ở đây liên quan đến polynucleotit và vec-tơ, một cách lần lượt. Theo một phương án, tế bào vật chủ chứa (ví dụ, được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm với) vec-tơ chứa polynucleotit mà mã hóa (một phần của) các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "tế bào vật chủ" được dùng để chỉ loại hệ tế bào bất kỳ có thể được thiết kế di truyền để tạo ra các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T của sáng chế hoặc các mảnh của nó. Tế bào vật chủ thích hợp để sao chép và hỗ trợ sự biểu hiện của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các tế bào này có thể được chuyển nhiễm hoặc tải nạp ở dạng thích hợp với vec-tơ biểu hiện cụ thể và lượng lớn các tế bào chứa vec-tơ có thể được sinh trưởng để nuôi cấy chất gây men phạm vi lớn để thu được lượng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T đủ để sử dụng trong lâm sàng. Các tế bào vật chủ thích hợp bao gồm các vi sinh vật nhân rải rác, như E. coli, hoặc các tế bào nhân chuẩn khác nhau, như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào côn trùng, hoặc tế bào tương tự. Ví dụ, polypeptit có thể được sản sinh trong vi khuẩn đặc biệt là khi quá trình glycosyl hóa là không cần thiết. Sau khi biểu hiện, polypeptit có thể được phân lập từ hồ nhão chứa tế bào vi khuẩn trong phần hòa tan được và có thể được tinh chế thêm. Ngoài sinh vật không có nhân điển hình, các vi sinh vật nhân chuẩn như nấm sợi

hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp cho vec-tơ mã hóa polypeptit, bao gồm chủng nấm và nấm men có đường glycosyl hóa được “nhân hóa”, dẫn đến sự sản sinh polypeptit với mô hình glycosyl hóa ở người một phần hoặc đầy đủ. Xem Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), and Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006). Các tế bào vật chủ thích hợp để biểu hiện polypeptit (được glycosyl hóa) cũng có nguồn gốc từ sinh vật đa bào (sinh vật không xương sống và có xương sống). Các ví dụ về các tế bào sinh vật không có xương sống bao gồm tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirut được nhận biết có thể được sử dụng trong việc kết hợp với tế bào côn trùng, đặc biệt là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*. Môi trường nuôi cấy tế bào thực vật còn có thể được sử dụng làm vật chủ. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để sản xuất kháng thể ở thực vật chuyển gen). Tế bào sinh vật có xương sống còn có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, dòng tế bào động vật có vú được làm thích hợp để sinh trưởng trong huyền phù có thể hữu ích. Các ví dụ khác về dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được chuyển nhiễm bằng SV40 (COS-7); dòng thận phôi người (tế bào 293 hoặc 293T như được mô tả, ví dụ, trong Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)), tế bào thận chuột lang con (BHK), tế bào sertoli chuột nhắt (tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), tế bào thận khỉ (CV1), tế bào thận khỉ lông xanh Châu Phi (VERO-76), tế bào caxinom cổ tử cung người (HELA), tế bào thận chó (MDCK), tế bào gan chuột cống (BRL 3A), tế bào phổi người (W138), tế bào gan người (Hep G2), tế bào u vú chuột nhắt (MMT 060562), tế bào TRI (như được mô tả, ví dụ, trong Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), tế bào MRC 5, và tế bào FS4. Các dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), bao gồm tế bào CHO âm tính với dhfr (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); và dòng tế bào u tủy như YO, NS0, P3X63 và Sp2/0. Để tìm hiểu thêm về các dòng tế bào vật chủ động vật có vú đã biết thích hợp để sản xuất protein, xem, ví dụ, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), trang 255-268 (2003). Tế bào vật chủ bao gồm tế bào được nuôi cấy, ví dụ, tế bào động vật có vú được nuôi cấy, tế bào nấm men, tế bào côn trùng, tế bào vi khuẩn và tế bào thực vật, chỉ kể tên một số, nhưng bao gồm cả các tế bào có trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc cây canh tác hoặc mô động vật. Theo một phương án, tế bào vật chủ là tế bào nhân

chuẩn, tốt hơn là tế bào động vật có vú, như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào thận phôi người (HEK) hoặc tế bào bạch huyết (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20).

Các công nghệ chuẩn để biểu hiện gen ngoại lai trong các hệ này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các tế bào biểu hiện polypeptit chứa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của miền gắn kết kháng nguyên như kháng thể, có thể được thiết kế di truyền sao cho cũng biểu hiện chuỗi còn lại trong các chuỗi kháng thể sao cho sản phẩm được biểu hiện là kháng thể có cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

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

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

Theo một số phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc gắn kết kháng nguyên của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chứa ít nhất một vùng biến đổi kháng thể có khả năng gắn kết với chất xác định kháng nguyên. Vùng biến đổi có thể tạo ra một phần của và có nguồn gốc từ kháng thể có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên và các mảnh của nó. Phương pháp sản xuất kháng thể đa dòng và kháng thể đơn dòng là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Harlow and Lane,

"Anditbodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Các kháng thể không có trong tự nhiên có thể được cấu tạo bằng cách sử dụng kỹ thuật tổng hợp peptit pha rắn, có thể được sản xuất tái tổ hợp (ví dụ như được mô tả trong patent Mỹ số US 4186567) hoặc có thể thu được, ví dụ, bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp bao gồm các chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi (xem ví dụ patent Mỹ số 5,969,108 được cấp cho McCafferty).

Các loài động vật bất kỳ của kháng thể, mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi có thể được sử dụng trong phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế. Các kháng thể, mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi không làm giới hạn phạm vi của sáng chế hữu ích trong sáng chế có thể có nguồn gốc từ chuột, động vật linh trưởng, hoặc người. Nếu phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được dự định để sử dụng ở người, dạng khảm của kháng thể có thể được sử dụng, trong đó các vùng hằng định của kháng thể là từ người. Dạng được nhân hóa hoặc người hoàn toàn của kháng thể còn có thể được điều chế theo phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem ví dụ, patent Mỹ số US 5,565,332 cấp cho Winter). Có thể đạt được việc nhân hóa bằng các phương pháp khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở (a) ghép CDR không phải của người (ví dụ, kháng thể cho) lên trên khung làm việc ở người (ví dụ, kháng thể nhận) và các vùng hằng định giữ được hoặc không giữ được gốc khung làm việc mang tính quyết định (ví dụ, vùng hằng định quan trọng để giữ được ái lực gắn kết kháng nguyên hoặc chức năng kháng thể tốt), (b) chỉ ghép vùng xác định tính đặc hiệu không ở người (SDR hoặc a-CDR; các gốc mang tính quyết định đối với tương tác kháng thể-kháng nguyên) lên trên khung làm việc người và vùng hằng định, hoặc (c) cấy toàn bộ các miền biến đổi không phải người, nhưng "che giấu" chúng bằng đoạn tương tự ở người bằng cách thay thế các gốc bề mặt. Kháng thể được nhân hóa và phương pháp tạo ra chúng được tìm hiểu thêm, ví dụ, trong Almagro and Fransson, *Front Biosci* 13, 1619-1633 (2008), và còn được mô tả thêm, ví dụ, trong Riechmann et al., *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); Patent Mỹ số 5821337, 7527791, 6982321, và 7087409; Jones et al., *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239, 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., *Methods* 36, 25-34 (2005) (mô tả quá trình ghép SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498

(1991) (mô tả quá trình “tái tạo bề mặt”); Dall’Acqua et al., *Methods* 36, 43-60 (2005) (mô tả “sự di chuyển FR”); và Osbourn et al., *Methods* 36, 61-68 (2005) and Klimka et al., *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (mô tả phương pháp “chọn lọc có dẫn hướng” để di chuyển FR). Các kháng thể cụ thể theo sáng chế là kháng thể người. Kháng thể người và vùng biến đổi người có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể người được mô tả tổng quát trong van Dijk and van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 368-74 (2001) và Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 450-459 (2008). Vùng biến đổi người có thể tạo ra một phần và có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng người được tạo ra nhờ phương pháp lai (xem ví dụ *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, trang 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Kháng thể người và vùng biến đổi người còn có thể được điều chế bằng cách sử dụng chất kháng nguyên cho động vật chuyển gen đã được cải biến để sản sinh kháng thể người nguyên vẹn hoặc kháng thể nguyên vẹn với vùng biến đổi người trong đáp ứng với thách thức kháng nguyên (xem ví dụ Lonberg, *Nat Biotech* 23, 1117-1125 (2005)). Kháng thể người và vùng biến đổi người còn có thể được thực hiện bằng cách phân lập trình tự vùng biến đổi dòng Fv được chọn từ thư viện thể hiện thực khuẩn thể có nguồn gốc từ người (xem ví dụ, Hoogenboom et al. trong tài liệu: *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37 (O’Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); và McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554; Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991)). Thực khuẩn thể thường biểu hiện các mảnh kháng thể, ở dạng mảnh chuỗi đơn Fv (scFv) hoặc ở dạng mảnh Fab.

Theo một số phương án nhất định, gốc gắn kết kháng nguyên hữu ích trong sáng chế được thiết kế di truyền để có ái lực gắn kết tăng cường theo, ví dụ, phương pháp được bộc lộ trong công bố đơn patent Mỹ số 2004/0132066, toàn bộ nội dung được kết hợp ở đây để tham khảo. Khả năng gắn kết của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể được xác định thông qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (được phân tích trên hệ thống BIACORE T100) (Liljeblad, et al., *Glyco J* 17, 323-329 (2000)), và thử nghiệm gắn kết truyền thống (Heeley, *Endocr Res* 28, 217-229 (2002)). Các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để nhận biết kháng thể, mảnh kháng thể, miền gắn kết kháng nguyên hoặc miền biến đổi mà cạnh tranh với kháng thể đối chiếu để gắn kết với kháng nguyên cụ thể, ví dụ, kháng thể cạnh tranh với kháng thể V9 để gắn kết với CD3. Theo một số phương

án nhất định, kháng thể cạnh tranh này gắn kết với cùng một epitop (ví dụ, epitop thẳng hoặc cấu dạng) được gắn kết bằng kháng thể đối chiếu. Phương pháp được lấy làm ví dụ chi tiết để vẽ sơ đồ epitop mà kháng thể gắn kết được nêu trong Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", trong *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Trong thử nghiệm cạnh tranh lấy làm ví dụ, kháng nguyên đã được cố định (ví dụ CD3) được ủ trong dung dịch chứa kháng thể được đánh dấu thứ nhất gắn kết với kháng nguyên (ví dụ kháng thể V9, được mô tả trong patent Mỹ số US6,054,297) và kháng thể không được đánh dấu thứ hai được thử nghiệm về khả năng cạnh tranh của nó trong việc gắn kết với kháng nguyên với kháng thể thứ nhất. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi trên bề mặt tế bào lai. Để làm đối chứng, kháng nguyên đã được cố định được ủ trong dung dịch chứa kháng thể được đánh dấu thứ nhất mà không chứa kháng thể không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ trong các điều kiện cho phép gắn kết kháng thể thứ nhất với kháng nguyên, kháng thể không gắn kết dư thừa được loại bỏ, và lượng nhãn đánh dấu kết hợp với kháng nguyên đã được cố định được đo. Nếu lượng nhãn đánh dấu kết hợp với kháng nguyên đã được cố về cơ bản giảm đi trong mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng, thì chỉ ra rằng kháng thể thứ hai đang cạnh tranh với kháng thể thứ nhất trong việc gắn kết với kháng nguyên. Xem Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được điều chế như được mô tả ở đây có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực như sắc ký lỏng cao áp, sắc ký trao đổi cation, điện di gel, sắc ký ái lực, sắc ký loại trừ kích cỡ, và kỹ thuật tương tự. Các điều kiện thực tế được sử dụng để tinh chế protein cụ thể phụ thuộc một phần vào các yếu tố như điện tích lưới, độ kỵ nước, độ ưa nước v.v., và sẽ rõ ràng đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để tinh chế bằng sắc ký ái lực, kháng thể, phối tử, thụ thể hoặc kháng nguyên có thể được sử dụng mà phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T gắn kết với. Ví dụ, để tinh chế bằng sắc ký ái lực của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, cơ chất có protein A hoặc protein G có thể được sử dụng. Sắc ký ái lực và sắc ký loại trừ kích cỡ lần lượt Protein A hoặc G có thể được sử dụng để phân lập phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T chủ yếu như được mô tả trong các ví dụ. Độ tinh khiết của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được xác định bằng phương pháp phân tích đã được biết rõ bất kỳ bao gồm điện di gel, sắc ký lỏng cao áp, và kỹ thuật tương tự. Ví dụ,

protein dung hợp chuỗi nặng được biểu hiện như được mô tả trong các Ví dụ được thể hiện là trợ và được lắp ráp chính xác như được thể hiện bằng cách giảm SDS-PAGE (xem ví dụ Fig.3). Ba dải được phân giải ở khoảng Mr 25000, Mr 50000 và Mr 75000, tương ứng với phân tử lượng dự đoán của chuỗi nhẹ phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, chuỗi nặng và protein dung hợp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ.

Thử nghiệm

Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề cập trong bản mô tả này có thể được xác định, sàng lọc, hoặc được đặc trưng về các đặc tính lý/hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học bằng nhiều loại thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực.

Thử nghiệm ái lực

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

Theo một phương án, K_D được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng máy BIACORE® T100 (GE Healthcare) ở 25°C.

Để phân tích tương tác giữa phần Fc và các thụ thể Fc, thụ thể Fc tái tổ hợp gắn đuôi nhân-His được bắt giữ bởi kháng thể kháng Penta His (Qiagen) được làm bất động trên các chip CM5 và các cấu trúc lưỡng đặc hiệu được sử dụng làm các chất phân tích. Tóm lại, các chip cảm biến sinh học dextran được carboxymethyl hoá (CM5, GE Healthcare) được hoạt hoá bằng N-etyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydroclorua (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng thể kháng Penta-His được pha loãng bằng dung dịch natri axetat 10 mM, pH = 5,0, đến nồng độ 40 µg/ml trước khi tiêm ở tốc độ chảy 5 µl/phút để thu được khoảng 6500 đơn vị đáp ứng (RU) của protein ngẫu hợp. Sau khi tiêm phối tử, tiêm 1 M etanolamin để phong bế các nhóm chưa phản

ứng. Sau đó, thụ thể Fc được bắt giữ trong 60 giây ở 4 hoặc 10 nM. Để xác định động học, tiêm dịch pha loãng theo bậc bốn lần của cấu trúc lưỡng đặc hiệu (trong khoảng từ 500 nM đến 4000 nM) vào HBS-EP (GE Healthcare, HEPES 10mM, NaCl 150mM, 3 mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20, pH 7,4) ở 25°C ở tốc độ chảy 30 μ l/phút trong 120 giây.

Để xác định ái lực với kháng nguyên đích này, các cấu trúc đặc hiệu kép được bắt giữ bởi kháng thể đặc hiệu Fab kháng người (GE Healthcare) được làm bất động trên bề mặt chip cảm biến-CM5 được hoạt hoá như được mô tả đối với kháng thể kháng Penta-His. Lượng protein được ngẫu hợp thành phẩm khoảng 12000 RU. Các cấu trúc đặc hiệu kép được bắt giữ trong 90 giây ở 300 nM. Các kháng nguyên đích được cho qua các tế bào chảy trong 180 giây ở nồng độ nằm trong khoảng từ 250 đến 1000 nM với tốc độ chảy là 30 μ l/phút. Theo dõi quá trình phân ly trong 180 giây.

Sự khác biệt chỉ số khúc xạ thể tích được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi đáp ứng thu được trên tế bào chảy tham chiếu. Phản ứng trạng thái ổn định được sử dụng để thu được hằng số phân ly K_D bằng cách điều chỉnh đường cong không tuyến tính của đường đẳng nhiệt liên kết Langmuir. Tốc độ liên kết (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được tính sử dụng mô hình liên kết Langmuir đơn giản theo kiểu một một (BIACORE® T100 Evaluation Software version 1.1.1) bằng cách liên kết ăn khớp đồng thời và gram cảm biến phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính bằng tỷ lệ k_{off}/k_{on} . Xem, ví dụ, Chen et al., J Mol Biol 293, 865-881 (1999).

Thử nghiệm hoạt tính

Hoạt tính sinh học của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được xác định bằng các thử nghiệm khác nhau như được nêu trong ví dụ thực hiện sáng chế. Các hoạt tính sinh học ví dụ có thể bao gồm kích thích sự tăng sinh tế bào T, kích thích tín hiệu trong các tế bào T, kích thích sự biểu hiện của gen đánh dấu hoạt hóa trong các tế bào T, kích thích sự tiết xytokin bởi tế bào T, kích thích sự phân giải của các tế bào đích như tế bào khối u, và kích thích sự thoái lui khối u và/hoặc cải thiện khả năng sống sót.

Dược phẩm, chế phẩm và đường dùng

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề cập trong bản mô tả, ví dụ để dùng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp trị liệu

dưới đây. Theo một phương án, dược phẩm chứa phân tử bất kỳ trong số phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bất kỳ được đề cập trong bản mô tả và chất mang dược dụng. Theo một phương án khác nữa, dược phẩm bao gồm phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề cập trong bản mô tả và ít nhất một tác nhân trị liệu khác, ví dụ, như được mô tả dưới đây.

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

Dược phẩm theo sáng chế chứa lượng cho tác dụng điều trị bệnh của một hoặc nhiều phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được hòa tan hoặc được phân tán trong chất mang dược dụng. Cụm từ "dược lý hoặc dược dụng" được dùng để chỉ các phân tử dược chất và chế phẩm thường không độc đối với người nhận ở liều lượng và nồng độ được sử dụng, tức là không tạo ra phản ứng có hại, dị ứng hoặc rủi ro khác khi dùng cho động vật, như, ví dụ, người, ở dạng thích hợp. Việc bào chế dược phẩm mà có chứa ít nhất một phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và tùy ý thành phần hoạt tính bổ sung là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này theo phần mô tả, như được lấy làm ví dụ trong Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, được kết hợp ở đây để tham khảo. Hơn nữa, để dùng cho động vật (ví dụ, người), nên hiểu rằng chế phẩm này cần đáp ứng các tiêu chuẩn về độ vô trùng, độ tỏa nhiệt, độ an toàn chung và độ tinh khiết như được yêu cầu bởi cơ quan FDA về các tiêu chuẩn sinh học hoặc các tổ chức tương tự ở các nước khác. Chế phẩm được ưu tiên là dạng phối trộn được làm khô lạnh hoặc dung dịch chứa nước. Như được sử dụng trong bản mô tả, "chất mang dược dụng" bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, chất đệm, môi trường phân tán, lớp phủ, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa, chất bảo quản (ví dụ, chất kháng khuẩn, chất chống nấm), chất đẳng trương, chất trì hoãn hấp thụ, muối, chất bảo quản, chất chống oxy hóa, protein, thuốc, chất ổn định dược chất, polyme, gel, tác nhân liên kết, tá dược, chất phân tán, chất bôi trơn, chất làm ngọt, chất tạo hương, thuốc nhuộm, các vật liệu tương tự và các hỗn hợp của chúng, như đã biết đối với một người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences,

18th Ed. Mack Printing Company, 1990, trang 1289-1329, được kết hợp ở đây để tham khảo). Ngoại trừ đến mức mà chất mang thông thường bất kỳ không tương thích với thành phần hoạt tính, việc sử dụng nó trong chế phẩm điều trị bệnh hoặc dược phẩm được dự định.

Dược phẩm có thể bao gồm các loại chất mang khác nhau phụ thuộc vào việc liệu nó được dùng ở dạng rắn, lỏng hay sol khí, và liệu rằng nó có cần vô trùng đối với đường dùng như tiêm hay không. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế (và tác nhân điều trị bệnh bổ sung bất kỳ) có thể được sử dụng trong tĩnh mạch, trong biểu bì, trong động mạch, trong màng bụng, trong thương tổn, trong sọ, trong khớp, trong tuyến tiền liệt, trong lách, trong thận, trong màng phổi, trong khí quản, trong mũi, trong thủy tinh thể, trong âm đạo, trong trực tràng, không khối u, trong cơ, trong màng bụng, dưới da, dưới kết mạc, trong mạch máu, trong màng nhày, trong màng ngoài tim, trong rốn, trong mắt, trong miệng, khu trú, cục bộ, bằng cách xông hít (ví dụ xông hít sol khí), tiêm, truyền, truyền liên tục, dung dịch truyền cục bộ tế bào đích trực tiếp, thông qua ống thông, thông qua việc rửa, trong kem, ở dạng chế phẩm lỏng (ví dụ các liposom), hoặc bằng phương pháp khác hoặc sự kết hợp bất kỳ của các phương pháp nêu trên vì người có trình độ trung bình trong lĩnh vực biết (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Việc dùng ngoài đường tiêu hóa, cụ thể là tiêm trong tĩnh mạch, được sử dụng thông dụng nhất để dùng các phân tử polypeptit như các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế.

Chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm chế phẩm được thiết kế di truyền để dùng bằng cách tiêm, ví dụ, tiêm dưới da, trong da, trong thương tổn, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong cơ, trong tủy mạc hoặc trong bụng. Để tiêm, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể được phối trộn trong dung dịch chứa nước, tốt hơn là trong chất đệm tương thích sinh lý như dung dịch Hanks, dung dịch Ringer, hoặc chất đệm nước muối sinh lý. Dung dịch này có thể chứa các chất phối trộn như chất tạo huyền phù, làm ổn định và/hoặc chất phân tán. Theo một cách khác, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể ở dạng bột để cấu thành với chất dẫn thuốc thích hợp, ví dụ, nước không có pyrogen vô trùng, trước khi sử dụng. Dung dịch tiêm vô trùng được điều chế bằng cách kết hợp các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế ở lượng được yêu cầu trong dung môi

thích hợp với các thành phần khác nhau khác được liệt kê dưới đây, như được yêu cầu. Độ vô trùng có thể dễ dàng đạt được, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Nhìn chung, các phần phân tán được điều chế bằng cách kết hợp các thành phần hoạt tính vô trùng khác nhau vào chất dẫn thuốc vô trùng chứa môi trường phân tán bazơ và/hoặc các thành phần khác. Trong trường hợp bột vô trùng để điều chế dung dịch tiêm vô trùng, huyền phù hoặc nhũ tương, phương pháp bào chế được ưu tiên là kỹ thuật sấy chân không hoặc sấy đông lạnh mà thu được bột chứa thành phần hoạt tính cộng thêm thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ môi trường lỏng được lọc vô trùng trước đó của nó. Môi trường lỏng nên được đệm thích hợp nếu cần thiết và chất pha loãng lỏng trước tiên được làm đẳng trương trước khi tiêm với đủ nước muối hoặc glucoza. Chế phẩm này phải ổn định trong điều kiện sản xuất và bảo quản, và được bảo quản chống lại tác động làm biến của vi sinh vật, như vi khuẩn và nấm. Nên hiểu rằng sự nhiễm bẩn do nội độc tố nên được duy trì tối thiểu ở mức độ an toàn, ví dụ, ít hơn 0,5 ng/mg protein. Các chất mang được dùng thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và metionin; chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexametoni clorua; benzalkoni clorua; benzetoni clorua; phenol, rượu butylic hoặc rượu benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catecol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc dextrin; chất tạo chelat như EDTA; đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; ion trái dấu tạo muối như natri; phức chất kim loại (ví dụ, phức chất Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Huyền phù tiêm chứa nước có thể chứa các hợp chất làm tăng độ nhớt của huyền phù, như natri carboxymetyl xeluloza, sorbitol, dextran, hoặc hợp chất tương tự. Tùy ý, huyền phù này còn có thể chứa chất ổn định hoặc chất thích hợp mà làm tăng độ hòa tan của hợp chất để cho phép điều chế được dung dịch nồng độ cao. Ngoài ra, huyền phù chứa hợp chất hoạt tính có thể được điều chế ở dạng huyền phù tiêm dạng dầu thích hợp. Dung môi ưa béo thích hợp hoặc chất dẫn thuốc bao gồm dầu béo như dầu vừng, hoặc este của axit béo tổng hợp, như etyl cleat hoặc triglyxerit, hoặc liposom.

Các thành phần hoạt tính có thể được bọc trong các vi nang được điều chế, ví dụ, bằng kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng cách polyme hóa ở bề mặt phân cách pha, ví dụ, hydroxymethylxenluloza hoặc các vi nang gelatin và các vi nang poly-(metylmetyxylat), một cách tương ứng, trong hệ chuyển thuốc dạng keo (ví dụ, các liposom, các vi cầu albumin, các vi nhũ tương, các hạt nano và các nang nano) hoặc trong các đại nhũ tương. Các kỹ thuật này được bộc lộ trong Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Các chế phẩm giải phóng kéo dài có thể được điều chế. Các ví dụ thích hợp về các chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm các chất nền bán thấm của các polyme kỵ nước dạng rắn chứa polypeptit, cơ chất này là ở dạng vật phẩm có hình dạng, ví dụ màng, hoặc các vi nang. Theo các phương án cụ thể, sự hấp phụ kéo dài của chế phẩm tiêm có thể là do việc sử dụng trong dược phẩm các tác nhân làm chậm sự hấp phụ, như, ví dụ, nhôm monostearat, gelatin hoặc sự kết hợp của chúng.

Ngoài chế phẩm được mô tả trên đây, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T cũng có thể được tạo chế phẩm dưới dạng chế phẩm chứa. Các chế phẩm tác dụng dài này có thể được sử dụng bằng cách cấy (ví dụ dưới da hoặc trong cơ) hoặc bằng cách tiêm trong cơ. Như vậy, ví dụ, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được phối trộn với các nguyên liệu polyme hoặc nguyên liệu kỵ nước thích hợp (ví dụ dưới dạng nhũ tương trong dầu có thể chấp nhận được) hoặc nhựa trao đổi cation, hoặc dưới dạng dẫn xuất tan ít, ví dụ, dưới dạng muối tan ít.

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

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được phối trộn thành hợp phần ở dạng axit hoặc bazơ tự do, dạng trung tính hoặc dạng muối. Các muối được dùng là các muối mà hầu như giữ được hoạt tính sinh của axit hoặc bazơ tự do. Các muối này là muối cộng axit, ví dụ, các muối được tạo thành với các nhóm amin tự do của chế phẩm có protein, hoặc được tạo thành với các axit vô cơ ví dụ như, axit clohydric hoặc axit phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như axit axetic, axit oxalic, axit tarttric hoặc axit

mandelic. Muối được tạo thành với các nhóm carboxyl tự do cũng có thể có nguồn gốc từ bazơ vô cơ như ví dụ, natri hydroxit, kali hydroxit, amoni hydroxit, canxi hydroxit hoặc sắt hydroxit; hoặc bazơ hữu cơ này là isopropylamin, trimetylamin, histidin hoặc procain. Các muối được liệu có xu hướng tan nhiều hơn trong các dung môi chứa nước hoặc các dung môi phân cực protic khác so với các dạng bazơ tự do tương ứng.

Phương pháp điều trị bệnh và dược phẩm

Phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được đề cập trong bản mô tả có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể được dùng làm tác nhân điều trị miễn dịch, ví dụ để điều trị bệnh ung thư.

Để sử dụng trong các phương pháp trị liệu, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây sẽ được bào chế, được định lượng và được dùng theo cách phù hợp với thực hành y tế tốt. Các yếu tố để xem xét trong trường hợp này, bao gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, các tình trạng bệnh lý lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn, điểm vận chuyển chất, phương pháp dùng, lịch dùng, và các yếu tố khác đã được người thực hành trong lĩnh vực y tế biết.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế để dùng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T như được mô tả ở đây để dùng để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được sử dụng để điều trị bệnh ở cá thể mắc bệnh bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T. Theo các phương án nhất định, bệnh cần được điều trị là bệnh tăng sinh. Theo một phương án cụ thể bệnh là bệnh ung thư. Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của ít nhất một tác nhân trị liệu khác, ví dụ tác nhân chống ung thư nếu bệnh cần được điều trị là bệnh ung thư. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất phân

tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T như được mô tả ở đây để sử dụng để gây cảm ứng sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để sử dụng trong phương pháp gây cảm ứng sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u, ở cá thể bao gồm việc sử dụng cho cá thể một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để gây cảm ứng sự phân giải của tế bào đích. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế để sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án thuốc này là để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một phương án khác, thuốc này là để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh bao gồm việc cho cá thể mắc bệnh dùng một lượng thuốc có tác dụng điều trị bệnh. Theo các phương án nhất định, bệnh cần được điều trị là bệnh tăng sinh. Theo một phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của ít nhất một tác nhân trị liệu khác, ví dụ tác nhân chống ung thư nếu bệnh cần được điều trị là bệnh ung thư. Theo một phương án khác, thuốc này là để gây cảm ứng sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u. Theo một phương án khác, thuốc này là để sử dụng trong phương pháp gây cảm ứng sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u, ở cá thể bao gồm việc sử dụng cho cá thể một lượng thuốc hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh để gây cảm ứng sự phân giải của tế bào đích. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể mắc bệnh dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế. Theo một phương án, chế phẩm được sử dụng cho cá thể đã nêu, bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế ở dạng được dụng. Theo các phương án nhất định, bệnh cần được điều trị là bệnh tăng sinh. Theo một phương án cụ thể, bệnh là bệnh ung thư. Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của ít nhất một tác nhân trị liệu khác, ví dụ tác nhân chống ung thư nếu bệnh cần được điều

trị là bệnh ung thư. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là động vật có vú, tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp gây cảm ứng sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho tế bào đích tiếp xúc với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế với sự có mặt của tế bào T, cụ thể là tế bào T gây độc tế bào. Theo một khía cạnh khác, phương pháp gây cảm ứng sự phân giải của tế bào đích, cụ thể là tế bào khối u, ở cá thể được đề xuất. Theo một phương án này, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho cá thể một lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T để gây cảm ứng sự phân giải của tế bào đích. Theo một phương án, “Cá thể” là người.

Theo các phương án nhất định, bệnh cần được điều trị là bệnh tăng sinh, cụ thể là bệnh ung thư. Các ví dụ không giới hạn về các bệnh ung thư bao gồm ung thư bàng quang, ung thư não, ung thư đầu và cổ, ung thư tuyến tụy, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư buồng trứng, ung thư tử cung, ung thư cổ, ung thư màng trong dạ con, ung thư thực quản, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng ruột kết, ung thư trực tràng, ung thư dạ dày, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư máu, ung thư da, caxinom tế bào vảy, ung thư xương, và ung thư thận. Các rối loạn tăng sinh tế bào khác mà có thể được điều trị bằng cách sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các khối u nằm ở: bụng, xương, vú, hệ tiêu hóa, gan, tuyến tụy, màng bụng, tuyến nội tiết (tuyến thượng thận, tuyến cận giáp, tuyến yên, tinh hoàn, buồng trứng, tuyến ức, tuyến giáp), mắt, đầu và cổ, hệ thần kinh (trung ương và ngoại vi), hệ bạch huyết, khung xương chậu, da, mô mềm, lá lách, vùng ngực, và hệ niệu-sinh dục. Cũng được bao gồm là các tình trạng bệnh tiền ung thư hoặc các tổn thương và di căn ung thư. Theo các phương án nhất định, ung thư được chọn từ nhóm bao gồm ung thư thận, ung thư da, ung thư phổi, ung thư trực tràng ruột kết, ung thư vú, ung thư não, ung thư đầu và cổ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ biết rằng trong nhiều trường hợp phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể không đem lại chữa bệnh nhưng chỉ có thể tạo ra một phần tác dụng. Theo một số phương án, sự thay đổi sinh lý có một số tác dụng cũng được xem là có tác dụng điều trị bệnh. Như vậy, theo một số phương án, lượng phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T mà tạo ra sự thay đổi sinh lý được xem là

“lượng hữu hiệu” hoặc “lượng có tác dụng điều trị bệnh”. Đối tượng, bệnh nhân, hoặc cá thể cần điều trị thường là động vật có vú, cụ thể hơn là người.

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

Để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh, liều thích hợp của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân có tác dụng điều trị bệnh bổ sung khác) sẽ phụ thuộc vào loại bệnh cần điều trị, đường dùng, cân nặng của bệnh nhân, loại phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, mức độ nghiêm trọng và quá trình của bệnh, xem là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được sử dụng cho mục đích phòng ngừa hay điều trị bệnh, can thiệp điều trị trước đây hay hiện tại, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và phản ứng với phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T, và quyết định của bác sĩ điều trị. Bác sĩ chịu trách nhiệm đối với việc sử dụng trong bất cứ trường hợp nào, sẽ xác định nồng độ của (các) thành phần hoạt tính trong chế phẩm và (các) liều thích hợp cho từng đối tượng. Các lịch dùng liều khác nhau bao gồm nhưng không giới hạn ở việc dùng một lần hoặc nhiều lần theo các thời điểm khác nhau, dùng liều lớn, và truyền theo xung được dự tính trong bản mô tả này.

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được sử dụng một cách thích hợp cho bệnh nhân một lần hoặc qua nhiều lần điều trị. Phụ thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 15 mg/kg (ví dụ 0,1 mg/kg – 10 mg/kg) phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể là liều ứng cử ban đầu để sử dụng cho bệnh nhân, xem là, ví dụ, bằng cách sử dụng một hoặc nhiều lần riêng, hoặc bằng cách truyền liên tục. Một liều hằng ngày thông thường có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg hoặc nhiều hơn, phụ thuộc vào các yếu tố nêu trên. Để dùng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, phụ thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị thông thường sẽ được kéo dài cho đến khi xảy ra sự ức chế các triệu chứng bệnh mong muốn. Một liều minh họa của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 0,005 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg . Trong các ví dụ không giới hạn khác, liều cũng có thể bao gồm từ khoảng 1 microgam/kg cân nặng, khoảng 5 microgam/kg cân nặng, khoảng 10 microgam/kg cân nặng, khoảng 50 microgam/kg cân

nặng, khoảng 100 microgam/kg cân nặng, khoảng 200 microgam/kg cân nặng, khoảng 350 microgam/kg cân nặng, khoảng 500 microgam/kg cân nặng, khoảng 1 miligam/kg cân nặng, khoảng 5 miligam/kg cân nặng, khoảng 10 miligam/kg cân nặng, khoảng 50 miligam/kg cân nặng, khoảng 100 miligam/kg cân nặng, khoảng 200 miligam/kg cân nặng, khoảng 350 miligam/kg cân nặng, khoảng 500 miligam/kg cân nặng, đến khoảng 1000 mg/kg cân nặng hoặc nhiều hơn để sử dụng, và khoảng bất kỳ có thể thu được trong khoảng đó. Trong các ví dụ không giới hạn về khoảng có thể thu được từ các số được liệt kê trong bản mô tả này, khoảng nằm trong khoảng từ khoảng 5 mg/kg cân nặng đến khoảng 100 mg/kg cân nặng, khoảng 5 microgam/kg cân nặng đến khoảng 500 miligam/kg cân nặng, v.v., có thể được sử dụng, dựa vào các số được nêu trên. Như vậy, một hoặc nhiều liều nằm trong khoảng từ khoảng 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc sự kết hợp bất kỳ của nó) có thể được sử dụng cho bệnh nhân. Các liều này có thể được sử dụng gián đoạn, chẳng hạn hằng tuần hoặc cứ ba tuần một lần (ví dụ sao cho bệnh nhân nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc chẳng hạn khoảng sáu liều của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T). Liều tải nạp ban đầu cao hơn, tiếp theo là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được sử dụng. Tuy nhiên, các chế độ liều khác có thể hữu ích. Quá trình điều trị bệnh này được theo dõi một cách dễ dàng bằng các kỹ thuật và các thử nghiệm thông thường.

Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế thường sẽ được sử dụng với lượng hữu hiệu để đạt được mục đích dự định. Để sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh, các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa chúng, được sử dụng hoặc được dùng với lượng có tác dụng điều trị bệnh. Việc xác định lượng có tác dụng điều trị bệnh cũng được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ, đặc biệt là xét về phần mô tả chi tiết được đề cập trong bản mô tả.

Để dùng toàn thân, liều hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh có thể được ước tính ban đầu từ thử nghiệm *in vitro*, như những thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Một liều sau đó có thể được phối trộn trong các mẫu động vật để đạt được khoảng nồng độ tuần hoàn mà bao gồm IC₅₀ như được xác định trong môi trường nuôi cấy tế bào. Thông tin này có thể được sử dụng để xác định một cách chính xác hơn các liều hữu ích ở người.

Các liều ban đầu cũng có thể được ước tính từ các số liệu *in vivo*, chẳng hạn, các mô hình động vật, bằng cách sử dụng các công nghệ mà đã được biết rõ trong lĩnh vực.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể tối ưu một cách dễ dàng việc sử dụng cho người dựa vào các số liệu của động vật.

Lượng liều lượng và khoảng thời gian có thể được điều chỉnh riêng để tạo ra các mức huyết tương của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T mà đủ để giữ được hiệu quả điều trị bệnh. Những liều lượng cho bệnh nhân thông thường để dùng để tiêm nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 đến 50 mg/kg/ngày, thông thường nằm trong khoảng từ khoảng 0,5 đến 1 mg/kg/ngày. Mức huyết tương có hiệu quả điều trị bệnh có thể đạt được bằng cách áp dụng nhiều liều một ngày. Mức huyết tương có thể được đo, ví dụ, bằng HPLC.

Trong các trường hợp sử dụng cục bộ hoặc hấp thu chọn lọc, nồng độ cục bộ hiệu quả của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể không liên quan đến nồng độ huyết tương. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ có thể tối ưu hóa liều cục bộ có tác dụng điều trị bệnh mà không qua thử nghiệm.

Liều hữu hiệu có tác dụng điều trị bệnh của các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được mô tả ở đây nhìn chung sẽ đem lại tác dụng điều trị mà không gây ra độc tính đáng kể nào. Độ độc tính và tác dụng điều trị bệnh của phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có thể được xác định bằng các quy trình được phẩm tiêu chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào và các động vật thử nghiệm. Những thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu động vật có thể được sử dụng để xác định LD₅₀ (liều gây chết đến 50% dân cư) và ED₅₀ (liều có tác dụng điều trị bệnh trong 50% dân cư). Tỷ lệ liều giữa hiệu quả gây độc và điều trị bệnh là chỉ số trị liệu, mà có thể được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ giữa LD₅₀/ED₅₀. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T mà thể hiện các chỉ số trị liệu lớn được ưu tiên. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế thể hiện chỉ số trị liệu cao. Các số liệu thu được từ những thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu động vật có thể được sử dụng trong việc tạo công thức có khoảng liều thích hợp để sử dụng ở người. Liều này tốt hơn là nằm trong khoảng các nồng độ lưu thông mà bao gồm ED₅₀ có ít hoặc không có độc tính. Liều này có thể thay đổi trong khoảng này phụ thuộc vào các yếu tố, chẳng hạn, dạng liều được sử dụng, đường dùng được sử dụng, tình trạng bệnh của đối tượng, và các yếu tố tương tự. Chế phẩm chính xác, đường dùng và liều có thể được chọn theo từng bác sĩ khi xem xét tình trạng bệnh của bệnh nhân (xem, chẳng hạn, Fingl et al.,

1975, trong tài liệu: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Bác sĩ cho các bệnh nhân được điều trị bằng các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế sẽ biết làm thế nào và khi nào kết thúc, gián đoạn, hoặc điều chỉnh việc dùng do độc tố, loạn chức năng cơ quan, và tương tự. Ngược lại, bác sĩ cũng sẽ biết điều chỉnh việc điều trị đến mức cao hơn nếu phản ứng lâm sàng không thích hợp (không bao gồm độc tố). Tầm quan trọng của liều được sử dụng trong việc kiểm soát rối loạn quan tâm sẽ thay đổi theo mức độ nghiêm trọng của tình bệnh được điều trị, với đường dùng, và các yếu tố tương tự. Mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh này có thể, ví dụ, được đánh giá, một phần, bằng phương pháp đánh giá triệu chứng trước tiêu chuẩn. Ngoài ra, liều và có thể số liều cũng sẽ thay đổi theo độ tuổi, cân nặng, và phản ứng của từng bệnh nhân.

Các chất và cách điều trị khác

Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân khác trong việc trị liệu. Ví dụ, phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được bộc lộ ở đây có thể được đồng áp dụng với ít nhất một chất trị liệu khác. Thuật ngữ "chất trị liệu" bao gồm tác nhân bất kỳ được dùng để điều trị triệu chứng hoặc bệnh ở cá thể cần điều trị này. Chất trị liệu khác có thể bao gồm các thành phần hoạt tính bất kỳ thích hợp đối với chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn nếu là các thành phần với các hoạt tính bổ sung mà không có ảnh hưởng xấu đến nhau. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu khác là chất điều biến miễn dịch, chất kìm hãm tế bào, chất ức chế bám dính tế bào, chất gây độc tế bào, chất hoạt hóa gây chết tế bào theo chương trình, hoặc chất làm tăng độ nhạy của tế bào đối với chất kích thích gây chết tế bào theo chương trình. Theo phương án cụ thể, chất trị liệu khác là tác nhân kháng ung thư, ví dụ chất phá hủy vi ống, chất chống chuyển hóa, chất ức chế topoisomeraza, chất xen kẽ ADN, tác nhân alkyl hóa, trị liệu hormone, chất ức chế kinase, chất đối kháng thụ thể, chất hoạt hóa gây chết tế bào khối u theo chương trình, hoặc chất kháng chống hình thành mạch.

Các chất khác như vậy có mặt một cách thích hợp trong hỗn hợp với lượng hữu hiệu với mục đích được dự định. Lượng hữu hiệu của các chất khác này phụ thuộc vào lượng các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T được sử dụng, loại rồi

loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác nêu trên. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T thường được sử dụng ở liều lượng giống nhau và với đường dùng như được mô tả ở đây, hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được mô tả ở đây, hoặc ở liều lượng bất kỳ và bằng đường bất kỳ được xác định theo kinh nghiệm/lâm sàng là thích hợp.

Các liệu pháp kết hợp nêu trên bao gồm việc dùng kết hợp (khi hai hoặc nhiều tác nhân điều trị bệnh được bao gồm trong cùng một chế phẩm hoặc các chế phẩm riêng rẽ), và việc dùng riêng rẽ, trong trường hợp đó, việc dùng các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế có thể xảy ra trước, đồng thời, và/hoặc sau khi dùng tác nhân điều trị bệnh bổ sung và/hoặc chất bổ trợ. Các phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với trị liệu bằng chiếu xạ.

Vật phẩm

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, vật phẩm chứa nguyên liệu hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn được mô tả trên đây được đề xuất. Vật phẩm chứa vật chứa và nhãn dán hoặc tờ rời trong bao gói ở trên hoặc kết hợp với vật chứa. Vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, xi lanh, túi dung dịch để truyền IV, v.v.. Vật chứa có thể được làm từ nhiều vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc nhựa. Vật chứa chứa chế phẩm mà một mình hoặc được kết hợp với chế phẩm khác hữu hiệu để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh lý và có thể có cổng vào vô trùng (ví dụ, vật chứa có thể là túi dung dịch truyền trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút chặn xuyên qua được bởi kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm là phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế. Nhãn dán hoặc tờ rời trong bao gói chỉ ra rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý được chọn. Hơn nữa, vật phẩm có thể bao gồm (a) vật chứa thứ nhất có chế phẩm được chứa trong đó, trong đó chế phẩm này chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai có chế phẩm được chứa trong đó, trong đó chế phẩm này chứa chất gây độc tế bào khác hoặc tác nhân điều trị bệnh. Vật phẩm theo phương án này của sáng chế có thể còn bao gồm tờ rời trong bao gói chỉ ra rằng các chế phẩm này có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý cụ thể. Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm có thể còn bao gồm vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) chứa chất đệm được dùng, như nước kim khuẩn để tiêm (BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Vật phẩm này còn có thể bao gồm các vật liệu khác được mong muốn theo quan điểm thương

mại và người sử dụng, bao gồm các dung dịch đệm, chất pha loãng, chất lọc, kim, và xi lanh khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây là các ví dụ về phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Nên hiểu rằng các phương án khác nhau khác có thể được thử nghiệm, đưa ra phần mô tả tổng quát nêu trên.

Phương pháp chung

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

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

Giải trình tự ADN

Các trình tự ADN được xác định bằng kỹ thuật giải trình tự chuỗi kép.

Tổng hợp gen

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

Ví dụ 1

Điều chế các kháng thể đặc hiệu kép tế bào T (TCB) có và không có biến đổi điện tích (kháng CD20/kháng CD3)

Các phân tử dưới đây được điều chế trong ví dụ này, phần minh họa theo sơ đồ của nó được thể hiện trên Fig.2:

- A. “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” không biến đổi điện tích (trao đổi CH1/CL trong tác nhân gắn kết CD3) (Fig.2A, SEQ ID NO 14-17)
- B. “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” với các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, biến đổi điện tích trong các tác nhân gắn kết CD20) (Fig.2B, SEQ ID NO 18-21)
- C. “2+1 IgG CrossFab” với các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, biến đổi điện tích trong các tác nhân gắn kết CD20) (Fig.2C, SEQ ID NO 32, 19-21)
- D. “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” không biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3) (Fig.2D, SEQ ID NO 33, 15, 17, 21)
- E. “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” không biến đổi điện tích (trao đổi VH-CH1/VL-CL trong tác nhân gắn kết CD3) (Fig.2E, SEQ ID NO 34, 15, 17, 35)
- F. “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” với các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong các chất gắn kết CD20, các biến đổi điện tích trong tác nhân gắn kết CD3) (Fig.2F, SEQ ID NO 36-39)
- G. “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” với các biến đổi điện tích và đột biến DDKK trong vùng Fc (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, biến đổi điện tích trong các tác nhân gắn kết CD20) (Fig.2G, SEQ ID NO 40, 41, 20, 21)
- H. “1+1 CrossMab” với các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, biến đổi điện tích trong chất gắn kết CD20) (Fig.2H, SEQ ID NO 42, 43, 20, 21)
- I. “1+1 CrossMab” với các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, các biến đổi điện tích trong chất gắn kết CD20, chất gắn kết CD20 khác nhau) (Fig.2I, SEQ ID NO 43-45, 21)
- J. “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” với các biến đổi điện tích 213E, 123R (trao đổi VH/VL trong tác nhân gắn kết CD3, các biến đổi điện tích trong chất gắn kết CD20) (Fig.2J, SEQ ID NO 69-71, 21)
- K. “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” với các biến đổi điện tích (trao đổi VH/VL và các biến đổi điện tích trong tác nhân gắn kết CD3) (Fig.2K, SEQ ID NO 15, 17, 72, 73).

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tách dòng phụ trong khung bằng hoặc là chuỗi nặng hằng định hoặc chuỗi nhẹ hằng định được lồng trước vào vector biểu hiện thể nhận động vật có vú tương ứng. Sự biểu hiện protein được dẫn bằng gen khởi đầu MPSV và trình tự tín hiệu polyA tổng hợp có mặt ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, mỗi vector chứa trình tự EBV OriP.

Các phân tử được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm các tế bào HEK293-EBNA phát triển trong huyền phù với vector biểu hiện ở động vật có vú sử dụng polyetylenimin (PEI). Các tế bào đã được chuyển nhiễm bằng các vector biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:2:1:1 (A: “chuỗi nặng vector (VH-CH1-VH-CL-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VL-CL)” : “chuỗi nặng vector (VH-CH1-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VL-CH1)”; B, D, G, J, K: “chuỗi nặng vector (VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VL-CL)” : “chuỗi nặng vector (VH-CH1-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VH-CL)”; C: “chuỗi nặng vector (VL-CH1-VH-CH1-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VL-CL)” : “chuỗi nặng vector (VH-CH1-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VH-CL)”; E: “chuỗi nặng vector (VH-CH1-VL-CL-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VL-CL)” : “chuỗi nặng vector (VH-CH1-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VH-CH1)”; F: “chuỗi nặng vector (VL-CH1-VH-CH1-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VH-CL)” : “chuỗi nặng vector (VL-CH1-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VH-CH1)”) hoặc tỷ lệ 1:1:1:1 (H, I: “chuỗi nặng vector (VL-CH1-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VL-CL)” : “chuỗi nặng vector (VH-CH1-CH2-CH3)” : “chuỗi nhẹ vector (VH-CL)”).

Để chuyển nhiễm, các tế bào HEK293 EBNA đã được nuôi cấy trong huyền phù không huyết thanh trong môi trường nuôi cấy Excell chứa 6 mM L-glutamin và 250 mg/l G418. Để sản sinh trong các bình dạng ống quay dung tích 600 ml (thể tích hoạt động tối đa 400 ml) 600 triệu tế bào HEK293 EBNA được gieo mầm 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100 m/s^2 , và chất dịch nổi được thay thế bằng 20 ml môi trường CD CHO đã được làm ấm trước. Các vector biểu hiện được trộn trong 20 ml môi trường CD CHO đến lượng cuối cùng là 400 μg ADN. Sau khi bổ sung 1080 μl dung dịch PEI (2,7 $\mu\text{g/ml}$) hỗn hợp này được trộn xoáy mạnh trong 15 giây và sau đó được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó các tế bào được trộn với ADN/ dung dịch PEI, được chuyển vào bình quay dạng ống dung tích 600 ml và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường CO_2 5%. Sau khi ủ, bổ sung 360 ml môi trường Excell + 6 mM L-glutamin + 5 g/L Pepsoy + 1,0 mM VPA và các tế

bào đã được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, bổ sung Feed 1 7% (Lonza). Sau 7 ngày, dịch nổi nuôi cấy được thu gom để tinh chế bằng cách ly tâm trong khoảng thời gian từ 20 đến 30 phút ở tốc độ 36000 m/s^2 (máy ly tâm Sigma 8K), dung dịch này được lọc vô trùng (thiết bị lọc 0,22 mm) và bổ sung natri azit trong nồng độ cuối cùng là 0,01% khối lượng/thể tích. Dung dịch này được giữ ở nhiệt độ 4°C .

Nồng độ của các cấu trúc trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng ProteinA-HPLC. Cơ sở của việc tách là gắn kết của các phân tử chứa Fc trên ProteinA ở pH 8,0 và bước rửa giải từ độ pH=2,5. Có hai pha động. Các pha này là chất đệm Tris (10 mM) - glyxin (50 mM) - NaCl (100 mM), giống hệt nhau ngoại trừ việc chúng được điều chỉnh đến các độ pH khác nhau (8 và 2,5). Thân cột là cột được nạp trước Upchurch 2x20 mm có thể tích bên trong là ~63 μl được đóng gói với POROS 20A. 100 μl của mỗi mẫu được bơm vào nguyên liệu được cân bằng với tốc độ chảy là 0,5 ml/phút. Sau 0,67 phút, mẫu này được rửa giải bằng bước pH đến độ pH= 2,5. Việc định lượng được thực hiện bằng cách xác định sự hấp phụ ở bước sóng 280 nm và tính toán bằng cách sử dụng đường cong chuẩn với khoảng nồng độ của IgG1 ở người nằm trong khoảng từ 16 đến 166 mg/l.

Protein được tiết được tinh chế từ các dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực sử dụng sắc ký ái lực protein A, tiếp theo là bước sắc ký loại trừ theo kích cỡ.

Để sắc ký ái lực, dịch nổi được nạp lên trên cột HiTrap ProteinA HP (CV=5 mL, GE Healthcare) được cân bằng bằng 25 ml natri phosphat 20 mM, natri xitrat 20mM, pH 7,5. Protein không được liên kết được loại bỏ bằng cách rửa bằng ít nhất 10 thể tích cột natri phosphat 20 mM, natri xitrat 20mM, natri clorua 0,5 M, pH 7,5, tiếp theo là bước rửa bổ sung sử dụng 6 thể tích cột natri phosphat 10 mM, natri xitrat 20mM, natri clorua 0,5M, pH 5,45. Cột này sau đó được rửa bằng 20 ml MES 10 mM, natri clorua 100mM, pH = 5,0, và protein đích được rửa giải trong 6 thể tích cột natri xitrat 20mM, natri clorua 100mM, glyxin 100mM, độ pH 3,0. Dung dịch protein được trung hòa bằng cách bổ sung 1/10 của natri phosphat 0,5 M, pH 8,0. Protein đích được cô và được lọc trước khi nạp lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) được cân bằng bằng Histidin 20mM, natri clorua 140mM, Tween-20 0,01%, độ pH = 6,0. Phân tử A được tinh chế bằng bước sắc ký loại trừ theo kích cỡ điều chế (SEC) nữa để thu được lượng monome cuối cùng là 100%. Do đó, các phân đoạn có hàm lượng monome cao từ bước loại trừ theo kích cỡ đầu tiên được tập hợp, được cô và một lần nữa được nạp lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE

Healthcare). Không cần bước tinh chế thêm cho các phân tử khác (tùy thuộc vào profin sản phẩm phụ, tuy nhiên, thu gom các phân đoạn và do đó việc thu hồi sau khi sắc ký loại trừ theo kích cỡ đầu tiên là khác nhau đối với các phân tử này).

Độ tinh khiết và phân tử lượng của các phân tử được phân tích sau bước tinh chế đầu tiên (sắc ký ái lực protein A) bằng SDS-PAGE không có tác nhân khử và nhuộm màu bằng Coomassie (SimpleBlue™ SafeStain, Invitrogen). Hệ gen NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen, USA) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất (4-12% gel Tris-axetat hoặc 4-12% Bis-Tris).

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

Độ tinh khiết và phân tử lượng của các phân tử sau bước tinh chế cuối cùng được phân tích bằng cách phân tích CE-SDS có mặt và không có mặt của tác nhân khử. Hệ Caliper LabChip GXII (Caliper lifescience) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 2 µg mẫu được sử dụng để phân tích.

Hàm lượng chất kết tụ của các mẫu kháng thể được phân tích sử dụng cột loại trừ kích cỡ phân tích TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) trong 25 mM K_2HPO_4 , 125 mM NaCl, 200 mM L-arginin monohydroclorua, 0,02% (khối lượng/thể tích) NaN_3 , pH 6,7 đệm chạy ở nhiệt độ 25°C.

Tất cả các phân tử được tạo ra và được tinh chế theo cùng phương pháp (trừ phân tử A phải qua bước SEC bổ sung, như nêu trên).

Phân tử A thể hiện hàm lượng chất kết tụ cao sau khi sắc ký loại trừ theo kích cỡ điều chế đầu tiên. Hàm lượng của các chất kết tụ sau bước tinh chế này có thể không được xác định vì không có sự tách chuẩn nào của các tạp chất có phân tử lượng cao và đoạn monome. Để thu được 100% nguyên liệu monome, bước sắc ký loại trừ theo kích cỡ điều chế bổ sung là cần thiết. Phân tử B là 100% monome sau khi bước sắc ký loại trừ theo kích cỡ điều chế.

Nồng độ trong dịch nổi là cao hơn đối với phân tử A, nhưng hiệu suất cuối cùng bằng (do hàm lượng chất kết tụ cao) 2,3 lần thấp hơn so với phân tử B (Bảng 2).

Độ tinh khiết cuối cùng được thể hiện bằng cách phân tích CE-SDS đối với phân tử B là cao hơn đối với phân tử A (Bảng 3, Fig.3A và B). Fig.3M và 3N thể hiện phổ màu của bước tinh chế SEC (SEC điều chế), trong đó phân tử A có đỉnh rộng khi so với phân tử B, chỉ ra rằng chế phẩm của phân tử A được tải nạp trên SEC là không đồng nhất trong khi chế phẩm của phân tử B là dạng monome lớn.

Phân tử C có thể được thực hiện với độ chuẩn cao nhưng so với phân tử B việc thu hồi cuối cùng là thấp hơn do hàm lượng cao của các sản phẩm phụ mà có thể không được loại bỏ hoàn toàn bằng cách phương pháp sắc ký được áp dụng (Bảng 2; Bảng 3; Fig.3B và J, và Fig.3C và K). Như được thể hiện trên Fig.3B và 3K, phân tích SDS-PAGE sau bước tinh chế Protein A cho thấy không có sản phẩm phụ đối với phân tử B, trong khi chế phẩm của phân tử C chứa một số sản phẩm phụ dường như là ở phân tử lượng biểu kiến bằng 100 kDa.

Phân tử D khác với phân tử B chỉ ở sự không có mặt của các gốc tích điện trong các Fab kháng CD20. Phân tử này cũng có thể được thực hiện tạm thời với độ chuẩn cao nhưng như được đã được mô tả đối với phân tử C, chất lượng cuối cùng được thể hiện trên SEC phân tích (98% monome đối với phân tử D, so với 100% monome đối với phân tử B) và sự thu hồi là thấp hơn so với đối với phân tử B do hàm lượng cao của các sản phẩm phụ (Bảng 2; Bảng 3; Fig.3B và J và Fig.3D và L). Như được thể hiện trên Fig.3J và 3L, phân tích SDS-PAGE sau bước tinh chế Protein A cho thấy không có sản phẩm phụ đối với phân tử B, trong khi chế phẩm của phân tử D chứa một số sản phẩm phụ dường như là ở phân tử lượng biểu kiến bằng 66 kDa và 40 kDa. Fig.3N và 3O thể hiện phổ màu của bước tinh chế SEC (SEC điều chế) trong đó phân tử D có đỉnh rộng khi so với phân tử B, chỉ ra rằng chế phẩm của phân tử D được tải nạp trên SEC là không đồng nhất trong khi chế phẩm của phân tử B là dạng monome lớn.

Ngoài ra, độ chuẩn của việc sản sinh của phân tử E là cao nhưng sản phẩm cuối cùng vẫn chứa các tạp chất có phân tử lượng thấp khi được thể hiện bằng SFC phân tích và điện di mao mạch (Bảng 2; Bảng 3; Fig.3E).

Ngược với phân tử B, phân tử F có sự trao đổi VH-VL trên Fab của gốc gắn kết đích khối u trong khi các biến đổi điện tích đã được đưa vào trong Fab kháng CD3. Phân tử này có thể được thực hiện cũng với độ chuẩn cao, nhưng việc thu hồi cuối cùng là thấp do các

sản phẩm phụ. Đối với TCB kháng CD20/kháng CD3, dạng này với các biến đổi điện tích trong Fab kháng CD20 tốt hơn là liên quan đến sản xuất và tinh chế.

Phân tử G là phân tử với các biến đổi điện tích trong vùng Fc (“DD” = K392D; K409D trong một trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, “KK” = D356K; D399K trong vùng khác trong các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc (đánh số theo chỉ số EU), thay thế sự đột biến “khóa vào ổ”. Sự phát sinh các phân tử đặc hiệu kép được tăng cường bằng cách đưa hai gốc axit aspartic lên trên một gốc chuỗi nặng và hai gốc lysin trong chuỗi nặng thứ hai (Fig.2G). Phân tử này có thể được thực hiện với độ chuẩn cao nhưng sản phẩm cuối cùng vẫn có một số tạp chất có phân tử lượng cao và phân tử lượng thấp được thể hiện bằng SEC phân tích và điện di mao mạch (Bảng 2; Bảng 3) trong khi các sản phẩm phụ có thể được loại bỏ hoàn toàn đối với cùng phân tử mang sự đột biến “khóa vào ổ” (phân tử B).

Phân tử I, mà khác với phân tử H trong chất gắn kết CD20 của nó, thể hiện hàm lượng chất kết tụ cao hơn sau khi sắc ký loại trừ theo kích cỡ điều chế cuối cùng so với phân tử H. Độ tinh khiết cuối cùng được thể hiện bằng cách phân tích CE-SDS là cao hơn đối với phân tử H so với đối với phân tử I (Bảng 3; Fig.3H và I). Đồng thời việc thu hồi đối với phân tử H là cao hơn 40% so với phân tử I (Bảng 2). Kết quả này cho thấy rằng chất lượng của phân tử cũng phụ thuộc vào kháng thể được sử dụng trong dạng đặc hiệu kép tế bào T.

Việc sản xuất của phân tử J và phân tử K có độ chuẩn ban đầu tốt mà tạo ra sản lượng tốt. Tuy nhiên, việc phục hồi cuối cùng là khoảng 20% đối với cả hai phân tử là hợp lý dưới đây 48% đạt được với phân tử B (Bảng 2). Cả hai phân tử đều tương tự về chất lượng cuối cùng với >99% hàm lượng monome (Bảng 2). Độ tinh khiết trong CE-SDS không khur là tốt hơn đối với phân tử J (mà thiếu các biến đổi điện tích ở vị trí 124 của miền CL và vị trí 147 của miền CH1) với gần 99% so với phân tử K (có các biến đổi điện tích và sự trao đổi VL-VH trong tác nhân gắn kết CD3) với 90% (Bảng 3, Fig.3N và 3O). Phân tử J thể hiện một số kết tủa trong bước cô sau khi sắc ký ái lực. Phân tử K có các biến đổi điện tích trong CrossFab gắn kết CD3 hơn là Fabs gắn kết CD20. Điều này tác động đến chất lượng cuối cùng như được thể hiện bằng CE-SDS (Bảng 3, Fig.3O). Sự khác biệt về chất lượng có thể thấy rõ nhất sau bước tinh chế đầu tiên trên SDS-Page (Fig.3P, 3Q). Phân tử K chứa nhiều sản phẩm phụ hơn ở 150 kDa và 70 kDa (một nửa phân tử và cấu

trúc có khả năng mất chuỗi nhẹ) so với phân tử J. Cả hai phân tử có độ ổn định nhiệt như nhau mà tương tự với phân tử B (Bảng 4).

Đối với TCB kháng CD20/kháng CD3 kiểu “được đảo ngược” với các biến đổi điện tích trên Fab kháng CD20 (phân tử B) là dạng mà có thể được thực hiện với độ phức hồi và chất lượng cuối cùng cao nhất.

Bảng 2. Tóm tắt việc sản xuất và tinh chế các phân tử TCB kháng CD20/kháng CD3 có và không biến đổi điện tích.

Phân tử	Độ chuẩn (mg/l)	Phục hồi [%]	Hiệu suất (mg/l)	SEC phân tích (phân tử lượng cao/Monome/ phân tử lượng thấp) [%]	Độ tinh khiết thích hợp được xác định bằng LC-MS [%]
A	16,7	7,2	1,2	0/100/0 *	85-90 *
B	5,5	48,2	2,8	0/100/0	93
C	25	12,9	3,24	4/93/3	không xác định
D	55	9,8	5,42	2/98/0	không xác định
E	30,5	3,3	0,99	0/96,3/3,7	không xác định
F	57	11,8	6,43	3,4/96,6/0	không xác định
G	56	21	11,8	3,75/92,3/3,43	không xác định
H	29	9,2	2,66	2/98/0	không xác định
I	52,5	5,8	3,05	2,7/95,3/2	không xác định
J	77	18	17,4	0,7/99,3/0	không xác định
K	71,5	21,8	15,5	0/99,7/0,3	không xác định

* thành phẩm, sau hai công đoạn SEC

Bảng 3. Phân tích CE-SDS (không khử) của các phân tử TCB kháng CD20/kháng CD3 có và không biến đổi điện tích.

Phân tử	Đỉnh #	Kích thước [kDa]	Độ tinh khiết [%]
A	1	34,13	0,49
	2	55,10	0,58
	3	58,89	0,97
	4	152,30	1,76
	5	165,95	2,25
	6	177,64	7,75
	7	186,15	14,06
	8	194,17	18,37
	9	201,68	53,77
B	1	160,09	0,57
	2	180,70	1,62
	3	194,42	97,81
C	1	131,12	0,82
	2	141,45	3,45
	3	182,86	2,39
	4	192,1	13,5
	5	198,13	79,84
D	1	207,04	100

E	1	176,36	0,67
	2	196,54	14,36
	3	209,22	84,97
F	1	30,41	0,55
	2	65,04	1,33
	3	198,80	2,05
	4	203,10	7,94
	5	213,93	88,12
G	1	96,50	1,67
	2	208,46	96,77
	3	216,11	1,55
H	1	131,98	1,13
	2	140,64	1,96
	3	153,02	92,24
	4	161,24	4,67
I	1	55,75	1,88
	2	158,62	50,78
	3	178,6	46,14
	4	218,64	1,2
J	1	186,5	1,4

	2	198,2	98,6
K	1	164,7	4
	2	182,4	6
	3	200,1	90

Xác định phân tử lượng bằng cách phân tích LC-MS

Loại glycosyl hóa

Để xác nhận chế phẩm đồng nhất của các phân tử, dung dịch protein cuối cùng được phân tích bằng cách phân tích LC-MS. Để loại bỏ tính không đồng nhất được đưa vào bằng hydrat cacbon, các cấu trúc này được xử lý bằng PNGaseF. Cho mục đích này, độ pH của dung dịch protein được điều chỉnh đến pH 7,0 bằng cách bổ sung 2 μ l Tris 2 M vào 20 μ g protein có nồng độ bằng 0,5 mg/ml. Bổ sung 0,8 μ g PNGaseF và được ủ trong 12 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Phân tích LC-MS - Phát hiện trực tuyến

Phương pháp LC-MS được thực hiện trên Agilent HPLC 1200 kết hợp với máy đo phổ khối TOF 6441 (Agilent). Tách sắc ký được thực hiện trên cột Macherey Nagel Polystyren; RP1000-8 (cỡ hạt 8 μ m, 4,6 x 250 mm; cat. No. 719510). Dung môi rửa giải A là axetonitril 5% và axit formic 0,05% (thể tích/thể tích) trong nước, dung môi rửa giải B là axetonitril 95%, nước 5% và axit formic 0,05%. Tốc độ chảy là 1 ml/phút, việc tách được thực hiện ở nhiệt độ 40°C và với 6 μ g (15 μ l) mẫu protein thu được bằng cách xử lý được nêu trên.

Thời gian (phút)	%B
0,5	15
10	60
12,5	100

14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

Trong bốn phút đầu tiên, nước giải hấp được đưa vào chất thải để ngăn ngừa nhiễm bẩn muối của máy đo phổ khối. Nguồn ESI chạy với dòng khí khô ở tốc độ 12 l/phút, nhiệt độ là 350°C và áp suất phun là 60 psi. Phổ MS đạt được sử dụng điện áp mảnh là 380 V và khoảng khối nằm trong khoảng từ 700 đến 3200 m/z theo kiểu ion dương. Số liệu MS đạt được bằng phần mềm dụng cụ từ 4 đến 17 phút.

Chế phẩm của phân tử A có khoảng 10-15% phân tử có chuỗi nhẹ ghép cặp sai và các lượng nhỏ của chuỗi nhẹ liên kết hoặc tự do. Chế phẩm của phân tử B có các lượng nhỏ của các phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ CD3. Các tạp chất như chuỗi nhẹ tự do hoặc chuỗi nhẹ liên kết có thể không phát hiện được (Bảng 2).

Độ ổn định nhiệt bằng tán xạ ánh sáng tĩnh

Độ ổn định nhiệt được theo dõi bằng tán xạ ánh sáng tĩnh (SLS) và bằng cách đo huỳnh quang protein bên trong phản ứng với ứng suất nhiệt được áp dụng.

30 µg mẫu protein được lọc có nồng độ protein bằng 1 mg/ml được áp dụng thành hai phiên bản vào Optim 2 (Avacta Analytical Ltd; GB). Nhiệt độ rơi nằm trong khoảng từ 25 đến 85°C ở 0,1°C/phút, theo hướng kính và mật độ quét tổng được thu gom. Để xác định sự phát quang protein nội tại mẫu này được kích thích ở 295 nm và sự phát xạ được thu gom trong khoảng từ 266 đến 473 nm.

Độ ổn định nhiệt được xác định cho tất cả các phân tử, các kết quả được thể hiện trong Bảng 4. Nhiệt độ kết tụ (T_{Agg}) được xác định bằng cách quét ánh sáng động và nhiệt độ nóng chảy (T_M) được đo bằng huỳnh quang protein sau khi áp dụng gradien nhiệt có thể so sánh được cho tất cả các phân tử với T_{Agg} nằm trong khoảng từ 54 đến 58°C và T_M nằm trong khoảng từ 56 đến 60°C (Bảng 4).

Bảng 4. Độ ổn định nhiệt của các phân tử TCB kháng CD20/kháng CD3 có và không biến đổi điện tích.

Phân tử	T _{Kết tụ} [°C]	T _M [°C]
A	54,4	55,9
B	54,3	56,4
C	56	59
D	56	59
E	56	60
F	58	60
G	57	59
H	55	56
I	53	57
J	54	55
K	54	55

Gắn kết với CD3 và CD20 của các kháng thể TCB kháng CD3/kháng CD20

Việc gắn kết với CD3 của các kháng thể đặc hiệu kép tế bào T (TCB) kháng CD3/kháng CD20 có hoặc không có sự biến đổi điện tích (phân tử “A” và “B” ở trên) đã được xác định bằng cách sử dụng các tế bào Jurkat biểu hiện CD3 ở người. Việc gắn kết với CD20 được xác định bằng cách sử dụng các tế bào Z-138 biểu hiện CD20 ở người. Các tế bào dạng huyền phù được thu hoạch, được rửa một lần bằng PBS, và khả năng sống và mật độ tế bào được xác định bằng cách sử dụng Vicell. Các tế bào dạng huyền phù được tái huyền phù ở mật độ 2×10^6 tế bào/ml trong chất đệm FACS. 100 μ l huyền phù tế bào được gieo mầm vào trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ. Mỗi bước được thực hiện ở nhiệt độ 4°C. Các đĩa được ly tâm ở tốc độ 3600 m/s^2 trong 5 phút và dịch nổi được loại bỏ. Các dịch pha loãng kháng thể được điều chế trong PBS/BSA 0,1%. 30 μ l kháng thể TCB kháng CD3/kháng CD20 được pha loãng hoặc chất đệm FACS được bổ sung vào các lỗ và các tế bào được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi ủ, 120 μ l chất đệm FACS được bổ sung cho mỗi lỗ, đĩa này được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 3500 m/s^2 , và dịch nổi được loại bỏ. Bước rửa được lặp lại một lần. 30 μ l kháng thể thứ cấp được pha loãng trước được bổ sung cho mỗi lỗ, như đã chỉ trong đĩa thiết kế. Các đĩa này được ủ trong 30 phút nữa ở nhiệt độ 4°C. Sau khi ủ, 120 μ l chất đệm FACS được bổ sung cho mỗi lỗ, các đĩa này được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 3500 m/s^2 , và dịch nổi được loại bỏ. Bước rửa được lặp lại một lần.

cho tất cả các đĩa, mà là đĩa có tế bào Jurkat, mà được cố định trực tiếp sau bước rửa này. Các tế bào được cố định bằng cách sử dụng 100 μ l chất đệm BD Fixation cho mỗi lỗ (#BD Biosciences, 554655) ở nhiệt độ 4°C trong khoảng thời gian từ 20 đến 30 phút. Các tế bào được tái huyền phù trong 80 μ l/lỗ chất đệm FACS để đo FACS bằng cách sử dụng BD FACS CantoII.

Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trên Fig.4.

Phân giải tế bào khối u và sự hoạt hóa tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ khi tiêu diệt qua trung gian tế bào T tế bào đích khối u biểu hiện CD20 được gây cảm ứng bằng các kháng thể TCB kháng CD3/kháng CD20

Việc tiêu diệt các tế bào đích qua trung gian tế bào T và sự hoạt hóa của các tế bào T được gây cảm ứng bằng các kháng thể TCB kháng CD3/kháng CD20 có hoặc không có sự biến đổi điện tích (phân tử “A” và “B” ở trên) được đánh giá trên các tế bào khối u Z-138 và Nalm-6. Các PBMC ở người được dùng làm các chất tác động và tiêu diệt cũng như hoạt hóa tế bào T được phát hiện 22 giờ sau khi ủ bằng kháng thể đặc hiệu kép. Tóm lại, các tế bào đích được thu hoạch, được rửa, và được dàn trên đĩa ở mật độ ở 30 000 tế bào/lỗ sử dụng các đĩa đáy tròn có 96 lỗ. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (các PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque của máu sạch từ những người cho khỏe mạnh. Máu sạch được pha loãng bằng PBS vô trùng và được tạo lớp trên gradien Histopaque (Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (4500 m/s², 30 phút, nhiệt độ trong phòng), huyết tương ở trên pha trong chứa PBMC được gạn ra và các PBMC được chuyển vào trong ống falcon mới sau đó được nạp 50 ml PBS. Hỗn hợp này được ly tâm (4000 m/s², 10 phút, nhiệt độ trong phòng), dịch nổi được gạn ra và viên tròn PBMC được rửa hai lần bằng PBS vô trùng (các bước ly tâm 3500 m/s², 10 phút). Tập hợp PBMC tạo ra được đếm tự động (ViCell) và được giữ trong môi trường RPMI1640 chứa FCS 10% và L-alanyl-L-glutamin 1% (Biochrom, K0302) trong thiết bị ủ tế bào (37°C, 5% CO₂) cho đến khi sử dụng tiếp (không quá 24 giờ). Đối với thử nghiệm tiêu diệt, bổ sung các kháng thể ở nồng độ đã định (nằm trong khoảng từ 1000 pM đến 0,1 pM trong 3 phiên bản). Các PBMC được bổ sung vào tế bào đích ở tỷ lệ E:T cuối cùng là 6:1. Sau khi ủ, các đĩa được ly tâm ở tốc độ 4200 m/s² trong 4 phút và 50 μ l/lỗ được chuyển vào các đĩa đáy phẳng có 96 lỗ sạch để phát hiện LDH. Việc phát hiện LDH được thực hiện sử dụng kit phát hiện độc tố tế bào (Roche #11644793001) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tế bào còn lại được rửa bằng PBS chứa BSA 0,1%. Việc nhuộm màu bề mặt CD8 (CD8 kháng người APCCy7, Biolegend

#301016), CD4 (CD4 kháng người FITC, Biolegend # 300506), CD69 (CD69 kháng người BV421 Biolegend #310930) và CD25 (CD25 kháng người PECy7 Biolegend #302612) được thực hiện theo chỉ định của nhà cung cấp. Sau 30 phút ở 4°C, tế bào được rửa hai lần bằng 150 µl/lỗ PBS chứa BSA 0,1% và được cố định sử dụng 100 µl/lỗ PFA 2%. Phép đo được thực hiện bằng cách sử dụng BD FACS CantoII.

Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trên Fig.5, 6 và 7. Cả hai phân tử thể hiện hoạt tính có thể so sánh xét về phân giải tế bào khối u và sự hoạt hóa tế bào T.

Sự tiêu tế bào B và sự hoạt hóa tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ khi tiêu diệt tế bào B ở người khỏe mạnh qua trung gian tế bào T được gây cảm ứng bằng các kháng thể TCB kháng CD3/kháng CD20 trong dòng máu chung ở người

Dòng máu chung ở người từ người hiến khỏe mạnh đã được ủ với các kháng thể TCB kháng CD3/kháng CD20 có hoặc không có sự biến đổi điện tích (phân tử “A” và “B” ở trên) ở các nồng độ đã nêu (nằm trong khoảng từ 50000 pM đến 1 pM trong 3 phiên bản). Sau 22 giờ, máu được trộn lẫn và 35 µl được thu gom để nhuộm màu bằng 20 µl hỗn hợp kháng thể FACS chứa CD8 (CD8 kháng người APCCy7, Biolegend #301016), CD4 (CD4 kháng người FITC, Biolegend # 300506), CD69 (CD69 kháng người BV421 Biolegend #310930) và CD25 (CD25 kháng người PECy7, Biolegend #302612), CD22 (CD22 kháng người APC, Biolegend #302510) và CD45 (CD45 kháng người PerCPCy5.5, Biolegend #304028). Sau 15 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, máu được cố định bằng dung dịch FACS Lysing (BD, #349202) và được phân tích bằng bào kế chảy. Sự tiêu tế bào được tính dựa vào tỷ lệ của các số tế bào B và số tế bào T CD4⁺ thiết lập các mẫu chưa xử lý đến tiêu tế bào 0%.

Kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trên Fig.8 và 9. Cả hai phân tử thể hiện hoạt tính có thể so sánh xét về sự tiêu tế bào trong máu toàn phần và sự hoạt hóa tế bào T. Việc gắn kết của kháng thể TCB kháng CD3/kháng CD20 vào tế bào đích biểu hiện CD20 và CD3 ở người

Việc gắn kết của kháng thể TCB kháng CD3/kháng CD20 được thể hiện dưới dạng phân tử “B” ở trên đã được thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư mô bạch huyết tế bào B tế bào lớn lan tỏa biểu hiện CD20 ở người (DLBCL) (WSU DLCL2, 0,5-1 x 10⁶ các điểm gắn kết CD20) và dòng tế bào lympho T bất diệt biểu hiện CD3 (Jurkat). Tóm lại, tế bào được thu hoạch, được đếm, được kiểm tra về khả năng sống và được tái huyền phù ở 1,5 x

10^6 tế bào/ml trong chất đệm FACS (PBS BSA 0,1%). 100 μ l huyền phù tế bào (chứa $0,15 \times 10^6$ tế bào) được ủ trong đĩa đáy tròn có 96 lỗ 30 phút ở nhiệt độ 4°C với việc tăng nồng độ của CD20 TCB (50 pM - 200 nM), được rửa hai lần bằng PBS lạnh BSA 0,1%, được ủ lại trong 30 phút nữa ở 4°C với kháng thể thứ cấp đặc hiệu mảnh Fc γ của IgG ở dê kháng người của mảnh AffiniPure F(ab')₂ được liên hợp với PE loăng (Jackson Immuno Research Lab PE #109-116-170), được rửa hai lần bằng PBS lạnh BSA 0,1%, được cố định bằng cách bổ sung PFA 2% và được phân tích bằng FACS sử dụng FACS CantoII (phần mềm FACS Diva) không bao gồm tế bào chết từ việc phân tích bằng cổng FSC/SSC.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.10A (gắn kết với tế bào WSU DLCL2) và Fig.10B (gắn kết với tế bào Jurkat). Đường cong liên kết và các giá trị EC50 liên quan đến liên kết được tính toán bằng cách sử dụng GraphPadPrism5. Các giá trị EC50 là 0,98 nM (gắn kết hóa trị hai với tế bào WSU DLCL2 biểu hiện CD20) và khoảng 12,5 nM (gắn kết hóa trị một với tế bào Jurkat biểu hiện CD3).

Việc gắn kết của kháng thể TCB kháng CD3/kháng CD20 với tế bào đích biểu hiện CD20 và CD3 ở người và khỉ đầu chó

Tính phản ứng ngang của kháng thể TCB kháng CD3/kháng CD20 được thể hiện dưới dạng phân tử "B" ở trên được đánh giá bằng cách ước lượng gắn kết với tế bào B biểu hiện CD20 ở người và khỉ đầu chó và tế bào T CD4 và CD8 biểu hiện CD3. Tóm lại, máu ở người và khỉ đầu chó được heparin hóa từ người hiến khỏe mạnh được sử dụng để phân lập các PBMC bằng cách ly tâm theo tỷ trọng. Các PBMC được phân lập được đếm, được kiểm tra về khả năng sống và được tái huyền phù ở 4×10^6 tế bào/ml trong chất đệm FACS (100 μ l PBS BSA 0,1%). 100 μ l huyền phù tế bào (chứa $0,4 \times 10^6$ tế bào) được mạ vào đĩa đáy hình chữ U 96 lỗ và được ly tâm (4200 m/s^2 , 4 phút). Sau khi loại bỏ các dịch nổi, các PBMC được ủ trong 30 phút ở 4°C với việc tăng nồng độ của CD20 TCB-AlexaFluor488 (200 pM - 200 nM), được rửa hai lần bằng PBS lạnh BSA 0,1%, được ủ lại trong 30 phút nữa ở 4°C với các kháng thể phản ứng ngang ở người/khỉ đầu chó: kháng CD19 (trong nhà, dòng vô tính 8B8)-AlexaFluor647, kháng CD4 (BD, #552838, dòng vô tính L200)-PerCPCy5,5 và kháng CD8 (BD, #555367, dòng vô tính RPA-T8)-PE. Sau 30 phút, các PBMC được rửa hai lần bằng PBS lạnh BSA 0,1% và được xử lý bằng dung dịch FACS Lysing (BD, # 349202) tiếp theo là phân tích FACS sử dụng FACS CantoII (Software FACS Diva). Đường cong liên kết thu được sử dụng GraphPadPrism5.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.11A (gắn kết với tế bào B ở người và khi đầu chó), Fig.11B (gắn kết với tế bào T CD4 ở người và khi đầu chó) và Fig.11C (gắn kết với tế bào T CD8 ở người và khi đầu chó). Các giá trị EC50 liên quan đến gắn kết với tế bào B biểu hiện CD20, được tính sử dụng GraphPadPrism5, bằng 4,8 nM (tế bào B ở người) và 3,3 nM (tế bào B ở khi đầu chó).

Phân giải tế bào khối u qua trung gian bằng các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau

Phân giải tế bào khối u qua trung gian bằng các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau (phân tử “B”, “A” “C” và “H” được thể hiện ở trên) được đánh giá trên tế bào Z138 (ung thư mô bạch huyết tế bào áo, $0,06-0,23 \times 10^6$ điểm gắn kết CD20). Các PBMC ở người được dùng làm các chất tác động và sự phân giải khối u được phát hiện trong khoảng thời gian từ 21 đến 24 giờ ủ với các dạng kháng thể đặc hiệu kép khác nhau. Tóm lại, các tế bào đích được thu hoạch, được rửa, và được dàn trên đĩa ở mật độ ở 50 000 tế bào/lỗ sử dụng các đĩa đáy hình chữ U có 96 lỗ. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (các PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque của máu người khỏe mạnh. Máu sạch được pha loãng bằng PBS vô trùng và được tạo lớp trên gradien Histopaque (Sigma, #H8889). Sau khi ly tâm (4500 m/s^2 , 30 phút, nhiệt độ trong phòng, phanh w/o), huyết tương ở trên pha trong chứa PBMC được gạn ra và các PBMC được chuyển vào trong ống falcon mới sau đó được nạp 50 ml PBS. Hỗn hợp này được ly tâm (3500 m/s^2 , 10 phút, nhiệt độ trong phòng), dịch nổi được gạn ra và viên tròn PBMC được rửa bằng PBS vô trùng (3000 m/s^2 , 10 phút). Tập hợp PBMC tạo ra được đếm tự động (ViCell) và được bảo quản trong môi trường RPMI1640 chứa FCS 10% và L-alanyl-L-glutamin 1% (Biochrom, K0302) ở 37°C , 5% CO_2 trong thiết bị ủ tế bào cho đến khi sử dụng tiếp (không quá 24 giờ). Đối với thử nghiệm phân giải khối u, các kháng thể được bổ sung ở nồng độ đã định (nằm trong khoảng từ 0,1 pM đến 1 nM trong 3 phiên bản). Các PBMC được bổ sung vào tế bào đích theo tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 6:1. Phân giải tế bào khối u được đánh giá sau khoảng thời gian từ 21 đến 24 giờ ủ ở 37°C , 5% CO_2 bằng cách xác định số lượng của LDH giải phóng vào các dịch nổi tế bào bằng tế bào gây chết tế bào theo chương trình/tế bào hoại tử (kít phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Phân giải tối đa các tế bào đích (= 100%) đạt được bằng cách ủ tế bào đích với Triton X-100 1%. Sự phân giải tối đa (= 0%) đề cập đến tế bào đích được đồng ủ với tế bào tác động không có cấu trúc đặc hiệu kép.

Fig.12 thể hiện các dạng kháng thể CD20 TCB khác nhau gây cảm ứng việc phân giải đặc hiệu đích và mạnh của tế bào đích CD20⁺. Panen A thể hiện rằng “CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược” (phân tử “B” được thể hiện ở trên) thể hiện hoạt tính có thể so sánh được với “CD20 TCB_2+1_không điện tích, đảo ngược” (phân tử “A” được thể hiện ở trên) và cả hai kháng thể hiệu nghiệm hơn so với dạng “CD20 TCB_1+1_có các điện tích” (phân tử “H” được thể hiện ở trên). Panen B thể hiện rằng “CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược” (phân tử “B” được thể hiện ở trên) là hiệu nghiệm hơn so với dạng “CD20 TCB_2+1_có các điện tích, cổ điển” (phân tử “C” được thể hiện ở trên). Các giá trị EC50 liên quan đến các thử nghiệm tiêu diệt, được tính sử dụng GraphPadPrism5 được nêu trong Bảng 5.

Bảng 5. Giá trị EC50 (pM) của sự phân giải tế bào khối u qua trung gian bằng các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau được đánh giá bằng cách sử dụng tế bào đích khối u Z138 biểu hiện CD20.

Panen	Dạng kháng thể CD20	EC50 [pM]
A	CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược (phân tử B)	2,18
A	CD20 TCB_2+1_không điện tích, đảo ngược (phân tử A)	0,76
A	CD20 TCB_1+1_có các điện tích (phân tử H)	17,54
B	CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược (phân tử B)	0,96
B	CD20 TCB_2+1_có các điện tích, cổ điển (phân tử C)	43,34

Phân giải tế bào khối u và sự hoạt hóa tế bào T sau đó qua trung gian bằng các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau

Phân giải tế bào khối u qua trung gian bằng các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau (phân tử “B” và “H” được thể hiện ở trên) được đánh giá thêm trên tế bào Z138 (ung thư mô bạch huyết tế bào áo) sử dụng các PBMC ở người thu được từ ba người hiến khỏe mạnh khác nhau cũng như trên panen rộng hơn của các dòng DLBCL bao gồm các dòng tế bào OCI Ly-18 (0,06-0,2 x 10⁶ điểm gắn kết CD20), Ramos

($0,1-0,4 \times 10^6$ điểm gắn kết CD20), SU-DHL-5 ($0,13-0,21 \times 10^6$ điểm gắn kết CD20), SU-DHL-8 (các điểm gắn kết CD20 dưới giới hạn phát hiện của thử nghiệm), Toledo ($0,02 \times 10^6$ điểm gắn kết CD20) và U2932 ($0,09-0,4 \times 10^6$ điểm gắn kết CD20). Thu hoạch tế bào khối u, phân tách PBMC, và các điều kiện thử nghiệm có độ tương đồng với các điều kiện thử nghiệm được mô tả trong các ví dụ trước đây. Tỷ lệ E:T cho các thử nghiệm được thể hiện trong các hình vẽ Fig.13 A-C là 6:1, cho thử nghiệm được thể hiện trên Fig.13D nó là 3:1. Phân giải tế bào khối u được đánh giá sau 21 giờ ủ ở 37°C , CO_2 5% bằng cách xác định số lượng của LDH giải phóng vào các dịch nổi tế bào bằng tế bào gây chết tế bào theo chương trình/tế bào hoại tử (kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Để đánh giá sự hoạt hóa tế bào T xuất hiện khi phân giải tế bào khối u, các PBMC được chuyển vào đĩa đáy tròn có 96 lỗ, được ly tâm ở tốc độ 4000 m/s^2 trong 5 phút và được rửa hai lần bằng PBS chứa BSA 0,1%. Việc nhuộm màu bề mặt CD8 (CD8 kháng người APCCy7 Biolegend, #301016), CD4 (CD4 kháng người FITC, Biolegend #300506) và CD25 (CD25 kháng người PECy7 Biolegend #302612) được thực hiện theo chỉ định của nhà cung cấp. Tế bào được rửa hai lần bằng $150 \mu\text{l/lỗ}$ PBS chứa BSA 0,1% và được cố định bằng cách sử dụng PFA 2% hoặc dung dịch FACS Lysing (BD, # 349202). Các mẫu được phân tích ở BD FACS CantoII.

Fig.13 thể hiện rằng dạng kháng thể “CD20 TCB_2+1_ có các điện tích, đảo ngược” (phân tử “B” được thể hiện ở trên) là hiệu nghiệm hơn so với dạng kháng thể “CD20 TCB_1+1” (phân tử “H” được thể hiện ở trên) như được đánh giá bằng cách phát hiện của cả hai lần phân giải tế bào khối u (các panen A, D) và sự hoạt hóa tế bào T (Panen B, C) sử dụng các PBMC từ những người hiến khác nhau. Các giá trị EC_{50} liên quan đến sự phân giải khối u và sự hoạt hóa tế bào T của tế bào Z138 được nêu trong Bảng 6a. Các giá trị EC_{50} liên quan đến các thử nghiệm phân giải khối u của panen của các dòng tế bào DLBCL được nêu trong Bảng 6b. Các giá trị EC_{50} được tính toán bằng cách sử dụng GraphPadPrism5.

Bảng 6a. Giá trị EC_{50} (pM) của sự phân giải tế bào khối u và sự hoạt hóa tế bào T qua trung gian bởi các kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 sử dụng các tế bào khối u Z138 biểu hiện CD20.

Dạng kháng thể CD20	EC_{50} [pM] 24 giờ
---------------------	------------------------------

	(trung bình là 3 người hiến)
CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược (sự phân giải khối u) (phân tử B)	1,6
CD20 TCB_1+1 (sự phân giải khối u) (phân tử H)	751
CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược (sự hoạt hóa tế bào T CD8) (phân tử B)	2,2
CD20 TCB_1+1 (sự hoạt hóa tế bào T CD8) (phân tử H)	174,8
CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược (sự hoạt hóa tế bào T CD4) (phân tử B)	1,2
CD20 TCB_1+1 (sự hoạt hóa tế bào T CD4) (phân tử H)	122

Bảng 6b. Giá trị EC50 (pM) của sự phân giải khối u của panen của các dòng tế bào khối u DLBCL qua trung gian bởi các kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3.

EC50 [pM] 24 giờ phân giải khối u	CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược (phân tử B)	CD20 TCB_1+1 (phân tử H)
Ocly-18	0,3	250,4
Ramos	không xác định	không xác định
SU-DHL-5	1,2	69,7
SU-DHL-8	0,5	218,9
Toledo	không xác định	120,2
U2932	0,9	72,7

Sự tiêu tế bào B trong dòng máu chung ở người qua trung gian bằng các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau

Sự tiêu tế bào bình thường qua trung gian bằng các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau (phân tử “B” và “H” được thể hiện ở trên) và bằng obinutuzumab được đánh giá thêm bằng cách sử dụng máu người sạch từ những người tình nguyện khỏe mạnh. Tóm lại, máu sạch đã được thu gom trong xy lanh chứa heparin. Các phần phân ước máu (180 μ L/lỗ) được đặt trong các đĩa sâu có 96 lỗ, đã được bổ sung TCB hoặc các chất pha loãng kháng thể (10 μ L/lỗ + 10 μ L/lỗ PBS) và được ủ trong 24 giờ ở 37°C trong CO₂ 5% trong thiết bị ủ tế bào đã được làm ấm. Sau khi ủ, máu được trộn lẫn bằng cách hút lên và thả xuống trước khi 35 μ L phần phân ước máu được chuyển vào các đĩa đáy hình chữ U có 96 lỗ và được ủ với huỳnh quang kháng CD45 (APC, Biolegend, #304037), kháng CD4 (PerCPCy5,5, BD, #552838), kháng CD8 (APCCy7, Biolegend, #301016), kháng CD19 (PE, Biolegend, #302208), kháng CD25 (PECy7, Biolegend, #302612) và kháng CD69 (BV421, Biolegend, #310930) trong tổng số 55 μ L thể tích cho bào kế chảy. Sau 15 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng (trong bóng tối), bổ sung 180 μ L/lỗ của dung dịch phân giải FACS (BD Biosciences) để tiêu hồng cầu và để cố định tế bào trước bào kế chảy.

Fig.14 thể hiện rằng “CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược” (phân tử “B” ở trên) là hiệu nghiệm hơn trong việc làm tiêu tế bào B bình thường so với cả obinutuzumab (Gazyva) và “CD20 TCB_1+1” có các điện tích (phân tử “H” ở trên).

Bảng 7. Giá trị EC₅₀ (pM) của sự tiêu tế bào trong dòng máu chung bình thường ở người qua trung gian bởi các kháng thể đích CD20 khác nhau.

Các kháng thể đích CD20	EC ₅₀ [pM] 24 giờ
CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược (phân tử B)	13,2
Obinutuzumab (Gazyva®)	79,2
CD20 TCB_1+1 (phân tử H)	3753

Sự hoạt hóa của các tế bào T được đánh giá bằng cách định lượng cường độ tín hiệu xuôi dòng CD3 sử dụng thử nghiệm tế bào báo cáo Jurkat-NFAT

Dung lượng của các dạng kháng thể TCB kháng CD20/kháng CD3 khác nhau để gây cảm ứng liên kết ngang tế bào T và sau đó là sự hoạt hóa tế bào T được đánh giá bằng cách sử dụng các đồng môi trường nuôi cấy của tế bào đích khối u biểu hiện CD20 và tế bào báo cáo Jurkat-NFAT (đồng tế bào báo cáo bệnh bạch cầu dạng bạch huyết cấp tính ở người biểu hiện CD3 với gen khởi đầu NFAT, GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega #CS176501). Khi gắn kết đồng thời TCB kháng CD20/kháng CD3 vào kháng nguyên CD20 (được biểu hiện trên các tế bào khối u) và kháng nguyên CD3 (được biểu hiện trên tế bào báo cáo Jurkat-NFAT), gen khởi đầu NFAT được hoạt hóa và làm biểu hiện luciferaza đom đóm hoạt tính. Cường độ của tín hiệu phát quang (thu được khi bổ sung cơ chất luciferaza) tỷ lệ với cường độ của sự hoạt hóa và tín hiệu CD3. Tế bào báo cáo Jurkat-NFAT phát triển trong huyền phù và được nuôi cấy trong RPMI1640, 2g/l glucoza, 2 g/l NaHCO₃, FCS 10%, HEPES 25mM, L-glutamin 2 mM, 1 x NEAA, 1 x natri-pyruvat ở 0,1 – 0,5 tế bào mio cho mỗi ml, 200 µg cho mỗi ml hygromyxin. Cho thử nghiệm, tế bào đích khối u (Z138) được thu hoạch và khả năng sống sót được xác định bằng cách sử dụng ViCell. 50 µl/lỗ của các kháng thể hoặc môi trường được pha loãng (đối với các đối chứng) được bổ sung vào tế bào đích. 20 000 tế bào/lỗ được dàn trên đĩa vào trong đĩa 96 lỗ thành màu trắng, đáy phẳng (#655098, Greiner bio-one). Sau đó, tế bào báo cáo Jurkat-NFAT được thu hoạch và khả năng sống được đánh giá bằng cách sử dụng ViCell. Tế bào được tái huyền phù ở 2 tế bào mio/ml trong môi trường nuôi cấy tế bào không có hygromyxin B và bổ sung vào các tế bào khối u ở mức $0,1 \times 10^6$ tế bào/lỗ (50 µl/lỗ) để đạt được tỷ lệ E:T cuối cùng là 5:1 và thể tích cuối cùng là 100 µl cho mỗi lỗ. Tế bào được ủ trong 6 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ ẩm. Cuối thời gian ủ, bổ sung 100 µl/lỗ của dung dịch One-Glo (1:1 One-Glo và thể tích môi trường thử nghiệm cho mỗi lỗ) vào các lỗ và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Sự phát quang được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đọc WALLAC Victor3 ELISA (PerkinElmer2030), 5 giây/lỗ là thời gian phát hiện.

Fig.15 thể hiện rằng “CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược” (phân tử “B” ở trên) làm hoạt hóa tế bào T và dòng dưới phát tín hiệu của CD3 mạnh hơn so với “CD20 TCB_1+1” (phân tử “H” ở trên).

Bảng 8. Giá trị EC50 (pM) của sự hoạt hóa CD3 được phát hiện sử dụng tế bào báo cáo Jurkat-NFAT.

Dạng kháng thể CD20	EC50 [pM]
CD20 TCB_2+1_có các điện tích, đảo ngược (phân tử B)	28,98
CD20 TCB_1+1 (phân tử H)	1001

Liều đơn PK của TCB kháng CD20/kháng CD3 ở chuột nhắt NOG khỏe mạnh

Nghiên cứu dược động học liều đơn (SDPK) được thực hiện để đánh giá sự tiếp xúc của phân tử TCB kháng CD20/kháng CD3 “B” (sau đây được gọi là “CD20 TCB”) trong các nghiên cứu hiệu quả (Fig.16). Dùng liều lớn trong tĩnh mạch là 0,5 mg/kg được áp dụng vào các con chuột nhắt NOG và các mẫu máu được lấy ở các thời điểm được chọn để đánh giá dược động học. Thử nghiệm miễn dịch chung được sử dụng để đánh giá toàn bộ nồng độ của CD20 TCB. Khoảng định cỡ của đường cong tiêu chuẩn đối với CD20 TCB là nằm trong khoảng từ 0,78 đến 50 ng/ml, trong khi 15 ng/ml là giới hạn dưới xác định số lượng (LLOQ).

Sự suy giảm hai pha được quan sát thấy với chu kỳ bán hủy beta là 10 ngày (phân tích không có khoang) và sự thanh thải là 8 mL/ngày/kg (mô hình 2 khoang). Chu kỳ bán hủy và sự thanh thải là như được mong đợi như với IgG bình thường không đích (Bảng 9).

Phoenix v6.2 từ Pharsight Ltd được sử dụng để phân tích PK, tạo mô hình và kích thích.

Bảng 9. Các thông số dược động học khi dùng liều lớn trong tĩnh mạch là 0,5 mg/kg của CD20 TCB ở các con chuột nhắt NOG.

Chu kỳ bán hủy	10 ngày
Sự thanh thải	7,9 mL/ngày/kg
Cmax	9,4 ug/mL
AUC	1554 h*ug/mL

Hoạt tính tiêu tế bào B in vivo của TCB kháng CD20/kháng CD3

Hoạt tính tiêu tế bào B ngoại vi của CD20 TCB đã được thử nghiệm ở các con chuột nhắt NOD/Shi-scid/IL-2R γ^{null} (NOG) được nhân hóa đầy đủ.

Các con chuột nhắt NOG được nhân hóa đầy đủ ở 14 tuần tuổi, có mức sinh lý của tế bào B và T ở người tuần hoàn (Hayakawa J. et al. (2009), Stem Cells 27(1), 175–182),

đã được xử lý bằng tá dược lỏng ($n = 7$) hoặc bằng CD20 TCB ($n = 6$) ở liều là 0,5 mg/kg được sử dụng trong tĩnh mạch (i.v.) một lần trong một tuần. Như được thể hiện trên kiểu nghiên cứu trên Fig.17, các con chuột này được lấy máu để phân tích tế bào B và tế bào T một và ba ngày sau khi tiêm liều trị liệu đầu tiên (D1, D3), và ba ngày sau liều trị liệu thứ hai (D10), ở thời điểm này nghiên cứu được chấm dứt. Ở thời điểm muộn hơn, các lá lách cũng được thu hoạch để phân tích tế bào B và tế bào T. Các con chuột được sàng lọc 4 ngày trước bước tiêm trị liệu (D-4) làm tham chiếu cơ sở để đếm tế bào B và T tuần hoàn. Fig.18 thể hiện việc đếm tế bào B và T được phân tích bằng bào kế chảy ex vivo trong máu của các con chuột đã được xử lý bằng tá dược lỏng (panen bên trái) và CD20 TCB (panen bên phải) ở các thời điểm khác nhau. Các kết quả chứng tỏ rằng việc tuần hoàn tế bào B đã bị suy kiệt rất hiệu quả ngay một ngày sau khi tiêm CD20 TCB, và số còn lại không phát hiện được của chúng trong toàn bộ khoảng thời gian nghiên cứu. Ngược lại, đếm tế bào T tuần hoàn chỉ giảm tạm thời ở D1 sau khi tiêm trị liệu, đưa trở về mức ranh giới ở D3, và giữ ổn định trong toàn bộ khoảng thời gian nghiên cứu. Trạng thái hoạt hóa tế bào T cũng được phân tích trong máu của các con chuột đã được xử lý ở D3 và D10 sau khi tiêm trị liệu lần đầu, bằng bào kế chảy ex vivo sử dụng các gen đánh dấu bề mặt tế bào T khác nhau và gen đánh dấu tăng sinh Ki67 (Fig.19). Tế bào T từ các con chuột đã được xử lý bằng CD20 TCB thể hiện kiểu hình hoạt hóa ở D3 sau khi tiêm trị liệu (panen phía trên), với sự điều tiết tăng của các gen đánh dấu hoạt hóa CD25, 4-1BB, PD-1 và granzym-B (GZB) trong cả hai khoang tế bào T CD4 và CD8, so với tế bào T từ đối chứng tá dược lỏng. Tế bào T từ các con chuột đã được xử lý cũng biểu hiện mức cao của gen đánh dấu tăng sinh Ki67. Vào D10 sau khi tiêm trị liệu lần đầu, hầu hết gen đánh dấu hoạt hóa tế bào T đã trở về mức cơ sở ngoại trừ GZB và PD-1, mà vẫn được biểu hiện ở các mức cao hơn so với đối chứng tá dược lỏng.

Fig.20 thể hiện các kết quả phân tích tế bào B và tế bào T được tiến hành trên các lá lách của các con chuột đã được xử lý bằng tá dược lỏng và CD20 TCB vào thời điểm chấm dứt nghiên cứu (D10). Việc điều trị bằng CD20 TCB điều tiết sự tiêu tế bào B rất hiệu quả cả ở trong cơ quan dạng bạch huyết thứ cấp này (Fig.20A), trong khi các số đếm tế bào T thể hiện các mức có thể so sánh được với đối chứng tá dược lỏng (Fig.20B). Trạng thái hoạt hóa tế bào T (Fig.20C) là tương tự với trạng thái hoạt hóa được quan sát thấy trong máu, với sự biểu hiện cao hơn của GZB và PD-1 trong tế bào T ở lá lách của các con chuột đã được xử lý so với đối chứng tá dược lỏng.

Nhìn chung các kết quả này chứng tỏ rằng việc điều trị bằng CD20 TCB có thể điều tiết sự tiêu rất hiệu quả của tế bào B ngoại vi một ngày sau khi tiêm trị liệu, bằng các tế bào B duy trì không thể phát hiện được cho đến khi kết thúc nghiên cứu (ba ngày sau khi tiêm trị liệu lần thứ hai). Các tế bào B cũng bị tiêu một cách hiệu quả trong lá lách của các con chuột đã được xử lý. Hoạt tính tiêu tế bào B song song bởi sự hoạt hóa tế bào T chuyển tiếp trong máu của các động vật đã được xử lý, mà trở về mức cơ sở ba ngày sau khi tiêm trị liệu, ngoại trừ các gen đánh dấu hoạt hóa GZB và PD-1, mà giữ biểu hiện ở mức cao hơn so với các đối chứng không được xử lý.

Hoạt tính kháng khối u của TCB kháng CD20/kháng CD3 trong mô hình WSU-DLCL2

Hoạt tính kháng khối u của CD20 TCB đã được thử nghiệm ở các con chuột nhắt NOG mang dòng tế bào ung thư mô bạch huyết tế bào B lớn tan lỏa ở người (PBMCL). Tóm lại, các con chuột và được vận chuyển với tế bào đơn nhân ngoại vi ở người (PBMC). Tóm lại, các con chuột nhắt NOG cái được tiêm dưới da (s.c.) với $1,5 \times 10^6$ tế bào WSU-DLCL2 (nguồn gốc thu được từ the European Collection of Cell Culture). Khi thể tích khối u trung bình đạt đến 200 mm^3 , các con chuột được tiêm PBMC ở người trong màng bụng (10×10^6 tế bào cho mỗi con chuột) là nguồn tế bào T ở người. Hai ngày sau, các con chuột nhận trị liệu bằng CD20 TCB trong tĩnh mạch ở liều là $0,5 \text{ mg/kg}$ được áp dụng một lần một tuần. Như được mô tả trên Fig.21, CD20 TCB thể hiện hoạt tính kháng khối u hiệu nghiệm, quan sát thấy sự thoái lui khối u gần như hoàn toàn tại thời điểm chấm dứt nghiên cứu (ngày 34).

Ví dụ 2

Điều chế kháng thể đặc hiệu kép tế bào T “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” có và không biến đổi điện tích (kháng BCMA/kháng CD3)

Mình họa dạng sơ đồ của phân tử được điều chế trong ví dụ này được thể hiện trên Fig.22. Phân tử kháng BCMA/kháng CD3 “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” không biến đổi điện tích (được đề cập đến trong ví dụ này là “83A10-TCB”) bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO 22-25, phân tử kháng BCMA/kháng CD3 “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” với các biến đổi điện tích (được đề cập đến trong ví dụ này là “83A10-TCBcv”) bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO 26-29.

Để phát sinh các vectơ kháng thể đặc hiệu kép BCMAxCD3, phân tử đặc hiệu kép thu được từ IgG1 bao gồm ít nhất hai gốc gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với hai chất xác định kháng nguyên riêng biệt CD3 và BCMA. Các gốc gắn kết kháng

nguyên là các mảnh Fab bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi và vùng hằng định. Ít nhất một trong các mảnh Fab là mảnh “Crossfab”, trong đó VH và VL được trao đổi. Sự trao đổi của VH và VL trong mảnh Fab đảm bảo rằng các mảnh Fab có tính đặc hiệu khác nhau không có sự sắp xếp miền giống hệt nhau. Kiểu phân tử đặc hiệu kép có hóa trị một đối với CD3 và hóa trị hai đối với BCMA trong khi một mảnh Fab được dung hợp với đầu tận cùng N của CrossFab (2+1) bên trong. Phân tử đặc hiệu kép chứa phần Fc để cho phân tử có chu kỳ bán hủy lâu hơn. Các phân tử được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm các tế bào HEK293 EBNA phát triển trong huyền phù với vector biểu hiện ở động vật có vú bằng cách sử dụng polyetylenimin (PEI). Để điều chế cấu trúc 2+1 CrossFab-IgG, tế bào đã được chuyển nhiễm với các vector biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:2:1:1 (“Fc (khóa) vector” : “chuỗi nhẹ vector” : “chuỗi nhẹ vector CrossFab” : “chuỗi nặng vector-CrossFab”).

Đối với các kháng thể đặc hiệu kép, việc đưa vào thay thế/trao đổi trong một nhánh liên kết “Crossfab” làm giảm một cách rõ ràng các sản phẩm phụ mà việc điều chế hoàn toàn không có các sản phẩm phụ (được mô tả chi tiết trong WO2009/080252 và Schaefer, W. et al, PNAS, 108 (2011) 11187-11191). Như vậy, để làm giảm thêm các sản phẩm phụ do sự bắt cặp sai của chuỗi nhẹ kháng nguyên thứ nhất với chuỗi nặng sai kháng nguyên thứ hai và để làm cải thiện hiệu suất của kháng thể đặc hiệu kép, một phương pháp khác được áp dụng cho phân tử bằng cách đưa vào các phần tử thế của các axit amin tích điện có điện tích trái dấu ở những vị trí axit amin đặc hiệu trong các miền CH1 và CL trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ đầu tiên trong a) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K), arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng đầu tiên trong a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat); hoặc ii) trong miền cố định CL của chuỗi nhẹ thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 124 được thay thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) (theo một phương án được ưu tiên độc lập bằng lysin (K), arginin (R)), và trong đó trong miền cố định CH1 của chuỗi nặng thứ hai trong b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thay thế độc lập bằng axit glutamic (E), hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat).

Để sản xuất các kháng thể đặc hiệu kép, các kháng thể đặc hiệu kép được biểu hiện bằng cách đồng chuyển nhiễm tạm thời của các vector biểu hiện ở động vật có vú tương ứng trong các tế bào HEK293-EBNA, mà đã được nuôi cấy trong huyền phù, sử dụng polyetylenimin (PEI). Một ngày trước chuyển nhiễm, các tế bào HEK293-EBNA được gieo ở mức 1,5 tế bào sống Mio/ml trong môi trường Ex-Cell đã được bổ sung 6 mM L-Glutamin. Cho mỗi mL của thể tích thành phẩm, 2,0 tế bào sống Mio được ly tâm (5 phút ở tốc độ 2100 m/s²). Dịch nổi được hút và tế bào được tái huyền phù trong 100 µL môi trường CD CHO. ADN cho mỗi mL của thể tích thành phẩm được điều chế bằng cách trộn 1 µg ADN (tỷ lệ chuỗi nặng: chuỗi nặng được biến đổi: chuỗi nhẹ: chuỗi nhẹ được biến đổi = 1:1:2:1) trong 100 µL môi trường CD CHO. Sau khi bổ sung 0,27 µL dung dịch PEI (1 mg/mL), hỗn hợp này được trộn xoáy mạnh trong 15 giây và được để ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Sau 10 phút, tế bào được tái huyền phù và hỗn hợp ADN/PEI được đặt cùng nhau và sau đó được chuyển vào thiết bị chứa thích hợp mà được đặt trong thiết bị lắc (37°C, 5% CO₂). Sau thời gian ủ là 3 giờ, bổ sung 800 µL môi trường Ex-Cell đã được bổ sung 6 mM L-Glutamin, 1,25 mM axit valproic và 12,5% Pepsoy (50 g/L), cho mỗi mL của thể tích thành phẩm. Sau 24 giờ, bổ sung 70 µL Feed (SF40, Lonza) cho mỗi mL của thể tích thành phẩm. Sau 7 ngày, hoặc khi khả năng sống của tế bào bằng hoặc thấp hơn 70%, các tế bào được tách ra khỏi dịch nổi bằng cách ly tâm và lọc vô trùng. Các kháng thể được tinh chế bằng bước ái lực và một hoặc hai bước đánh bóng, là sắc ký trao đổi cation và sắc ký loại trừ kích thước. Khi được yêu cầu, bước đánh bóng bổ sung được sử dụng.

Đối với bước ái lực, dịch nổi được nạp lên trên cột protein A (HiTrap Protein A FF, 5 mL, GE Healthcare) được cân bằng bằng 6 CV natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, độ pH 7,5. Sau bước rửa với cùng chất đệm, kháng thể này được rửa giải từ cột bằng bước rửa giải với natri phosphat 20mM, natri clorua 100mM, Glyxin 100mM, độ pH 3,0. Các đoạn có kháng thể mong muốn được trung hòa ngay lập tức bằng Natri Phosphat 0,5M, độ pH 8,0 (1:10), được tập hợp và cô bằng cách ly tâm. Chất cô đặc được lọc vô trùng và được xử lý thêm bằng sắc ký trao đổi cation và/hoặc sắc ký loại trừ kích thước.

Đối với bước sắc ký trao đổi cation, protein đậm đặc được pha loãng bằng tỷ lệ 1:10 với chất đệm rửa giải được dùng cho bước ái lực và được nạp lên trên cột trao đổi cation (Poros 50 HS, Applied Biosystems). Sau hai bước rửa với chất đệm cân bằng và chất đệm rửa một cách tương ứng, natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, TRIS 20mM, độ pH =

5,0 và natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, TRIS 20mM, natri clorua 100mM, độ pH = 5,0, protein này được rửa giải bằng gradien sử dụng natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, TRIS 20mM, natri clorua 100mM, độ pH = 8,5. Các đoạn chứa kháng thể mong muốn được tập hợp, được cô bằng cách ly tâm, lọc vô trùng và được xử lý thêm bước loại trừ kích cỡ.

Đối với bước loại trừ kích cỡ, protein đậm đặc được phun trong cột XK16/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare), và Histidin 20mM, Natri Clorua 140mM, độ pH = 6,0 có hoặc không có Tween20 làm chất đệm phối trộn. Các đoạn chứa các monome được tập hợp, được cô bằng cách ly tâm và lọc vô trùng vào lọ vô trùng.

Việc xác định nồng độ kháng thể được thực hiện bằng cách đo khả năng hấp thụ ở 280nm, sử dụng giá trị hấp thụ lý thuyết của dung dịch 0,1% của kháng thể. Giá trị này dựa trên trình tự axit amin và được tính bằng phần mềm GPMAW (số liệu Lighthouse).

Độ tinh khiết và hàm lượng monome của chế phẩm protein cuối cùng được xác định bằng CE-SDS (hệ thống Caliper LabChip GXII (Caliper Life Sciences)) một cách tương ứng HPLC (TSKgel G3000 SW XL cột loại trừ kích cỡ phân tích (Tosoh)) trong kali phosphat 25mM, Natri clorua 125mM, L-arginin monohydroclorua 200 mM, Natri azit 0,02% (khối lượng/thể tích), chất đệm có độ pH = 6,7.

Để kiểm chứng phân tử lượng của chế phẩm protein cuối cùng và xác nhận chế phẩm đồng nhất chứa các phân tử dung dịch protein cuối cùng, kỹ thuật sắc ký lỏng-đo phổ khối (LC-MS) được sử dụng. Bước loại glycosyl hóa được thực hiện đầu tiên. Để loại bỏ tính không đồng nhất được đưa vào bằng hydrat cacbon, các cấu trúc này được xử lý bằng PNGaseF (ProZyme). Do đó, độ pH của dung dịch protein được điều chỉnh đến độ pH = 7,0 bằng cách bổ sung 2µl Tris 2M vào 20µg protein có nồng độ bằng 0,5 mg/ml. 0,8µg PNGaseF được bổ sung và được ủ trong 12 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, việc phát hiện trực tuyến LC-MS được thực hiện. Phương pháp LC-MS được thực hiện trên Agilent HPLC 1200 kết hợp với máy đo phổ khối TOF 6441 (Agilent). Việc tách sắc ký được thực hiện trên cột Macherey Nagel Polystyren; RP1000-8 (cỡ hạt 8µm, 4,6 x 250mm; cat. số 719510). Dung môi rửa giải A là axetonitril 5% và axit formic 0,05% (thể tích/thể tích) trong nước, dung môi rửa giải B là axetonitril 95%, nước 5% và axit formic 0,05%. Tốc độ chảy là 1ml/phút, việc tách được thực hiện ở nhiệt độ 40°C và 6µg (15µl) mẫu protein thu được nhờ quy trình xử lý như nêu trên.

Thời gian (phút)	%B
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

Trong 4 phút đầu tiên, nước giải hấp được đưa vào khoang phế liệu để bảo vệ máy đo phổ khối không bị nhiễm bẩn muối. Nguồn ESI chạy với dòng khí khô ở tốc độ 12 l/phút, nhiệt độ là 350°C và áp suất phun là 60psi. Phổ MS đạt được bằng cách sử dụng điện áp mảnh bằng 380V và khoảng khối nằm trong khoảng từ 700 đến 3200 m/z sử dụng theo kiểu ion dương. Số liệu MS đạt được bằng phần mềm dụng cụ trong thời gian từ 4 đến 17 phút.

Fig.23 thể hiện biểu đồ CE-SDS (không khử) của chế phẩm protein cuối cùng sau các phương pháp tinh chế khác nhau đối với kháng thể 83A10-TCB và 83A10-TCBcv. Bước tinh chế bằng sắc ký ái lực protein A (PA) và sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC) được áp dụng cho kháng thể 83A10-TCB dẫn đến độ tinh khiết <30% và bằng 82,8% hàm lượng monome (A). Khi các bước tinh chế bổ sung bao gồm bước sắc ký trao đổi cation (cIEX) và bước sắc ký loại trừ kích cỡ cuối cùng (re-SEC) được áp dụng vào chế phẩm protein cuối cùng trong (A), độ tinh khiết được làm tăng đến 93,4% nhưng hàm lượng monome vẫn giữ nguyên và hiệu suất được làm giảm đáng kể xuống 0,42mg/L. Tuy nhiên, khi các biến đổi điện tích cụ thể được áp dụng vào 83A10 kháng BCMA Fab CL-CH1, cụ thể là kháng thể 83A10-TCBcv, profin sản xuất/tinh chế ưu việt của phân tử TCB, như được chứng minh bởi độ tinh khiết bằng 95,3%, hàm lượng monome bằng 100% và hiệu suất lên đến 3,3mg/L, có thể dễ quan sát được ngay cả khi các bước tinh chế PA + cIEX + SEC

được áp dụng (C) so với (B) với profin sản xuất/tinh chế thể hiện hiệu suất thấp hơn 7,9 lần và hàm lượng monome thấp hơn 17,2% bất kể bao gồm bước tinh chế re-SEC bổ sung.

Quy trình sản xuất đối đầu vận hành để so sánh profin sản xuất/tinh chế kháng thể 83A10-TCB so với 83A10-TCBcv sau đó được thực hiện để đánh giá thêm ưu điểm của biến đổi điện tích CL-CH1 được áp dụng cho kháng thể. Như được mô tả trên Fig.24, các đặc tính của kháng thể 83A10-TCB và 83A10-TCBcv được đo kể sát nhau và được so sánh sau mỗi bước tinh chế 1) chỉ sắc ký ái lực PA (A, B), 2) sắc ký ái lực PA sau đó đến SEC (C, D) và 3) sắc ký ái lực PA sau đó đến SEC sau đó đến cIEX và re-SEC (E, F). Biểu đồ CE-SDS (không khử) của dung dịch protein cuối cùng sau các phương pháp tinh chế tương ứng cho kháng thể 83A10-TCB và 83A10-TCBcv được thể hiện trên Fig.24. Như được thể hiện trong các hình vẽ Fig.24A và 24B, các cải thiện với việc áp dụng biến thể tích điện vào kháng thể TCB dễ được quan sát sau khi chỉ tinh chế bằng sắc ký ái lực PA. Trong nghiên cứu đối đầu, bước tinh chế sắc ký ái lực PA được áp dụng vào kháng thể 83A10-TCB dẫn đến độ tinh khiết bằng 61,3%, hiệu suất bằng 26,2 mg/L và hàm lượng monome bằng 63,7% (24A). Để so sánh, khi kháng thể 83A10-TCBcv được tinh chế bằng sắc ký ái lực PA, tất cả các tính chất được cải thiện với độ tinh khiết tốt hơn là 81,0%, hiệu suất tốt hơn là 51,5 mg/L và 68,2% hàm lượng monome (24B). Khi bước tinh chế SEC bổ sung được áp dụng vào chế phẩm protein cuối cùng như được thấy trên các hình vẽ Fig.24A và 24B, 83A10-TCB đạt được độ tinh khiết bằng 69,5%, hiệu suất bằng 14,1 mg/L và hàm lượng monome 74,7% so với 83A10-TCBcv có độ tinh khiết cải thiện và hàm lượng monome lên đến 91,0% và 83,9% một cách tương ứng, và hiệu suất bằng 10,3 mg/L. Thậm chí hiệu suất đối với 83A10-TCBcv ít hơn một chút (tức là ít hơn 27%) so với hiệu suất đối với 83A10-TCB trong thử nghiệm cụ thể này, phần trăm phân tử hiệu chỉnh tốt hơn nhiều đối với 83A10-TCBcv so với 83A10-TCB, một cách tương ứng, 90% so với 40-60%, như được đo bằng LC-MS. Trong so sánh đối đầu thứ ba, chế phẩm protein cuối cùng 83A10-TCB và 83A10-TCBcv từ các hình vẽ Fig.24C và 24D được tập hợp với khoảng 1L (đương lượng thể tích) của các chế phẩm protein cuối cùng tương ứng từ một mẻ tinh chế khác (cùng quy trình sản xuất) chỉ sau bước tinh chế sắc ký ái lực PA. Chế phẩm protein đã được tập hợp sau đó được tinh chế thêm bằng phương pháp tinh chế cIEX và SEC. Như được mô tả trên các hình vẽ Fig.24E và 24F, việc cải thiện profin sản xuất/tinh chế của kháng thể TCB có các biến thể tích điện được quan sát nhất quán khi so với kháng thể TCB không có biến thể tích điện. Sau một vài bước của phương pháp tinh chế (tức là

PA +/- SEC + cIEX + SEC) được sử dụng để tinh chế kháng thể 83A10-TCB, chỉ đạt được độ tinh khiết bằng 43,1% và 98,3% hàm lượng monome có thể đạt được nhưng có hại cho hiệu suất khi giảm xuống đến 0,43mg/L. Phần trăm phân tử hiệu chỉnh như được đo bằng LC-MS vẫn kém là 60-70%. Cuối cùng, chất lượng của chế phẩm protein cuối cùng là không chấp nhận được để sử dụng in vitro. Đối lập hoàn toàn, khi các bước tinh chế giống nhau với cùng một niên biểu được áp dụng vào kháng thể 83A10-TCBcv, đạt được độ tinh khiết 96,2% và 98,9% hàm lượng monome cũng như 95% phân tử hiệu chỉnh như được đo bằng LC-MS. Tuy nhiên, hiệu suất cũng giảm đi nhiều xuống 0,64 mg/L sau bước tinh chế cIEX. Các kết quả cho thấy rằng, độ tinh khiết tốt hơn, hàm lượng monome cao hơn, phần trăm phân tử hiệu chỉnh cao hơn và hiệu suất tốt hơn có thể đạt được với kháng thể 83A10-TCBcv chỉ sau hai bước tinh chế tiêu chuẩn tức là sắc ký ái lực PA và SEC (Fig.24D) trong khi các tính chất này có thể không đạt được với 83A10-TCB ngay cả khi áp dụng các bước tinh chế bổ sung (Fig.24E).

Bảng 10 tóm tắt các đặc tính của 83A10-TCB so với 83A10-TCVcv sau bước tinh chế PA. Bảng 11 tóm tắt các tính chất của 83A10-TCB so với 83A10-TCVcv sau bước tinh chế PA và SEC. Bảng 12 tóm tắt các tính chất của 83A10-TCB so với 83A10-TCVcv sau bước tinh chế PA và SEC cộng với PA một mình sau đó là bước tinh chế cIEX và re-SEC. Đối với Bảng 10 đến 12, các giá trị được bôi đậm là tính chất ưu việt khi được so sánh giữa 83A10-TCB với 83A10-TCVcv. Với một ngoại lệ mà có thể không được đại diện, tất cả các thông số và giá trị sản xuất/tinh chế thu được từ 3 thử nghiệm so sánh đôi đều là ưu việt đối với 83A10-TCBcv khi so với 83A10-TCB. Toàn bộ kết quả rõ ràng chỉ ra rằng, các ưu điểm trong đặc điểm sản xuất/tinh chế có thể đạt được với việc áp dụng các biến đổi điện tích CL-CH1 vào kháng thể TCB và chỉ cần hai bước tinh chế (tức là sắc ký ái lực PA và SEC) để dễ dàng có được chế phẩm protein chất lượng cao có các tính chất có khả năng phát triển rất tốt.

Bảng 10. Profin sản xuất/tinh chế của các kháng thể đặc hiệu kép đối với tế bào T kháng BCMA/kháng CD3 sau bước tinh chế sắc ký ái lực protein A.

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Độ tinh khiết (%)	61,3	81,0
Hiệu suất (mg/L)	26,2	51,5

Lượng (mg)	24,3	50,2
Monome (%)	63,7	68,2
Phân tử hiệu chỉnh bằng LC-MS (%)	không xác định	không xác định

Bảng 11. Profin sản xuất/tinh chế của các kháng thể đặc hiệu kép đối với tế bào T kháng BCMA/kháng CD3 sau bước tinh chế sắc ký ái lực protein A và sắc ký loại trừ kích thước.

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Độ tinh khiết (%)	69,5	91,0
Hiệu suất (mg/L)	14,1	10,3
Lượng (mg)	13,1	10,0
Monome (%)	74,7	83,9
Phân tử hiệu chỉnh bằng LC-MS (%)	40-60	90

Bảng 12. Profin sản xuất/tinh chế của các kháng thể đặc hiệu kép đối với tế bào T kháng BCMA/kháng CD3 sau các bước tinh chế 1.a) sắc ký ái lực protein A và sắc ký loại trừ kích thước và 1.b) chỉ sắc ký ái lực protein A được kết hợp với nhau sau đó đến 2) sắc ký trao đổi cation và 3) cuối cùng là sắc ký loại trừ kích thước.

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Độ tinh khiết (%)	43,1	96,2
Hiệu suất (mg/L)	0,43	0,64
Lượng (mg)	0,73	1,27
Monome (%)	98,3	98,9
Phân tử hiệu chỉnh bằng LC-MS (%)	60-70%	>95%

Việc gắn kết của các kháng thể đặc hiệu kép tế bào T kháng BCMA/kháng CD3 đối với dòng tế bào đa u tủy dương tính với BCMA (bào kế chấy)

Kháng thể TCB kháng BCMA/kháng CD3 (83A10-TCB, 13A4-TCBcv) được phân tích bằng bào kế chảy để gắn kết với BCMA người trên tế bào NCI-H929 biểu hiện BCMA (ATCC® CRL-9068™). MKN45 (đòng tế bào carcinom tuyến dạ dày ở người không biểu hiện BCMA) được sử dụng làm đối chứng âm. Tóm lại, các tế bào đã được nuôi cấy được thu hoạch, được đếm và khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng ViCell. Tế bào có thể sống được sau đó được điều chỉnh đến 2×10^6 tế bào trong mỗi ml trong chất đệm nhuộm màu FACS chứa BSA (BD Biosciences). 100µl huyền phù tế bào này được phân ước thêm trong mỗi lỗ vào đĩa có 96 lỗ đáy tròn và được ủ với 30µl kháng thể kháng BCMA hoặc đối chứng IgG tương ứng trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Tất cả các kháng thể TCB kháng BCMA/kháng CD3 (và đối chứng TCB) được chuẩn độ và được phân tích ở nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 1 – 300 nM. Các tế bào này sau đó được ly tâm (5 phút, 3500 m/s²), được rửa bằng chất đệm nhuộm màu FACS 120µl/lỗ (BD Biosciences), được tái huyền phù và được ủ trong 30 phút nữa ở nhiệt độ 4°C với mảnh F(ab')₂ AffiniPure tiếp hợp với PR tiếp hợp với chất có huỳnh quang, mảnh Fc của dê kháng IgG người đặc hiệu (Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). Các tế bào này sau đó được rửa hai lần bằng chất đệm nhuộm màu (BD Biosciences), được cố định bằng cách sử dụng 100ul chất đệm BD Fixation cho mỗi lỗ (#BD Biosciences, 554655) ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút, được tái huyền phù trong 120µl chất đệm FACS và được phân tích bằng cách sử dụng BD FACS CantoII. Như được mô tả trên Fig.25, cường độ huỳnh quang trung bình của kháng thể TCB kháng BCMA/kháng CD3 được vẽ biểu đồ theo hàm nồng độ kháng thể; (A) 83A10-TCB trên tế bào H929 và tế bào MKN45, (B) 83A10-TCBcv trên tế bào H929 và tế bào MKN45. Khi được áp dụng, EC50 được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm Prism GraphPad (LaJolla, CA, USA) và giá trị EC50 chỉ nồng độ kháng thể được yêu cầu để đạt 50% độ gắn kết tối đa để gắn kết 83A10-TCB và 83A10-TCBcv với tế bào H929 được tóm tắt trong Bảng 13. Fig.25C thể hiện rằng 83A10-TCB và 83A10-TCBcv gắn kết với tế bào H929 theo cách phụ thuộc vào nồng độ và với hoạt lực tương tự. Các kết quả này được mong đợi do phân tử 83A10-TCB và 83A10-TCBcv cùng có trình tự CDR giống hệt nhau trên miền biến đổi VL và VH tương ứng. Kháng thể đối chứng DP47-TCB không gắn kết với tế bào u tủy H929 dương tính với BCMA như được đo nhờ thiếu sự gia tăng cường độ huỳnh quang trung bình. Trong thử nghiệm so sánh đôi đầu thứ hai, 83A10-TCB và 83A10-TCBcv được đánh giá về khả năng gắn kết với tế bào H929 dương tính với BCMA và thiếu khả năng gắn kết với tế bào MKN45 âm tính với BCMA/CD3. Như được

mô tả trên Fig.25D, 83A10-TCB và 83A10-TCBcv gắn kết với tế bào H929 dương tính với BCMA theo cách phụ thuộc vào nồng độ và với hoạt lực tương tự. Giá trị EC50 về khả năng gắn kết của 83A10-TCB và 83A10-TCBcv với tế bào H929 trong thử nghiệm thứ hai này được tóm tắt trong Bảng 14.

Bảng 13. Giá trị EC50 về khả năng gắn kết của kháng thể TCB kháng BCMA/kháng CD3 với tế bào H929 (thử nghiệm 1).

Phân tử TCB kháng BCMA/kháng CD3	EC50 (nM)	EC50 (µg/ml)
83A10-TCB	9,8	1,9
83A10-TCBcv	14,5	2,8

Bảng 14. Giá trị EC50 về khả năng gắn kết của kháng thể TCB kháng BCMA/kháng CD3 với tế bào H929 (thử nghiệm 2).

Phân tử TCB kháng BCMA/kháng CD3	EC50 (nM)	EC50 (µg/ml)
83A10-TCB	16,9	3,25
83A10-TCBcv	14,5	2,8

Tính gây độc tế bào của tế bào T được định hướng lại của tế bào u tủy H929 biểu hiện BCMA ở mức độ cao được gây cảm ứng bằng các kháng thể đặc hiệu kép đối với tế bào T kháng BCMA/kháng CD3 (thử nghiệm giải phóng LDH)

Kháng thể TCB kháng BCMA/kháng CD3 cũng được phân tích về khả năng của chúng trong việc cảm ứng sự chết tế bào theo chương trình qua trung gian tế bào T trong tế bào u tủy biểu hiện BCMA ở mức độ cao khi liên kết ngang cấu trúc này thông qua việc gắn kết của các gốc gắn kết kháng nguyên với BCMA trên tế bào. Tóm lại, tế bào đích đa u tủy H929 biểu hiện BCMA người được thu hoạch bằng chất đệm hòa tan tế bào, được rửa và được tái huyền phù trong RPMI đã được bổ sung huyết thanh bào thai bò 10% (Invitrogen). Khoảng 30000 tế bào trong mỗi lỗ được dàn trên đĩa trong đĩa có 96 lỗ đáy tròn và phân pha loãng tương ứng của cấu trúc kháng thể được bổ sung đến nồng độ cuối

cùng mong muốn (trong 3 phiên bản); nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,1pM đến 10nM. Đối với việc so sánh thích hợp, tất cả các cấu trúc TCB và đối chứng được điều chỉnh đến cùng một nồng độ mol. Toàn bộ tế bào T ở người (tế bào tác động) được bổ sung vào các lỗ để đạt được tỷ lệ tế bào tác động : đích (E:T) cuối cùng bằng 5:1. Khi PBMC người được dùng làm tế bào tác động, tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 10:1 được sử dụng. Nhóm đối chứng âm chỉ được đại diện bởi tế bào tác động hoặc tế bào đích. Để làm đối chứng dương cho sự hoạt hóa của tế bào T pan của người, 1µg/ml PHA-M (Sigma #L8902) được sử dụng. Để chuẩn hóa, mức độ phân giải tối đa của tế bào đích H929 MM (= 100%) được xác định bằng cách ủ các tế bào đích bằng nồng độ cuối cùng của Triton X-100 1%, cảm ứng gây chết tế bào. Mức độ phân giải tối thiểu (= 0%) được đại diện bởi tế bào đích được cùng ủ chỉ với tế bào tác động, tức là không có kháng thể đặc hiệu kép tế bào T bất kỳ. Sau 20-24 giờ ủ ở 37°C, 5% CO₂, mức độ giải phóng LDH từ tế bào đích u tủy chết theo chương trình/chết hoại vào dịch nổi trên bề mặt sau đó được xác định bằng bộ kit phát hiện LDH (Roche Applied Science), theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Phần trăm giải phóng LDH được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ của các kháng thể đặc hiệu kép đối với tế bào T kháng BCMA/kháng CD3 trong đường cong đáp ứng nồng độ. Khi được áp dụng, các giá trị EC50 được đo bằng cách sử dụng phần mềm Prism (GraphPad) và được xác định dưới dạng nồng độ kháng thể TCB mà thu được 50% mức độ giải phóng LDH tối đa. Như được thể hiện trên Fig.26, kháng thể TCB kháng BCMA/kháng CD3 ((A,B) 83A10-TCB, (C,D) 83A10-TCBcv) cảm ứng việc tiêu diệt phụ thuộc vào nồng độ của tế bào u tủy H929 dương tính với BCMA như được đo bằng sự giải phóng LDH. Việc tiêu diệt tế bào H929 là đặc hiệu do kháng thể đối chứng DP47-TCB không gắn kết với tế bào đích dương tính với BCMA không kích thích sự giải phóng LDH, thậm chí ở nồng độ cao nhất là 1nM (A). Thậm chí các giá trị EC50 không thể đo được với việc sử dụng phần mềm thống kê Prism (GraphPad) đối với 83A10-TCB (A, B) và 83A10-TCBcv (C, Thử nghiệm 1), phạm vi giá trị EC50 có thể được ước tính khoảng chừng đến hoạt lực khoảng picomol thấp đối với cả phân tử TCB tích điện và không tích điện. Trong thử nghiệm thứ hai, tác dụng của 83A10-TCBcv được đánh giá trong thử nghiệm tiêu diệt tế bào T được định hướng lại và giá trị EC50 có thể được xác định đến 1,5pM. Các tác giả sáng chế có thể không loại trừ rằng giá trị EC50 thấp hơn một chút (hoạt lực tốt hơn một chút) có thể là do độ khả biến hiến máu. Tuy nhiên, phạm vi hoạt lực để tiêu diệt tế bào H929 nằm hoàn toàn trong khoảng picomol thấp. Toàn bộ các kết quả gợi ý rằng 83A10-TCB (không có biến thể tích điện) so với 83A10-TCBcv

(có biến thể tích điện) cho thấy các tính chất sinh học tương tự trong thử nghiệm dựa trên tế bào.

Bảng 15. Giá trị EC50 và các ước tính đối với việc tiêu diệt tế bào T được định hướng lại của tế bào H929 được gây cảm ứng bằng kháng thể TCB kháng BCMA/kháng CD3.

Phân tử TCB kháng BCMA/kháng CD3	EC50 (pM)	EC50 (µg/ml)
83A10-TCB (thử nghiệm 1)	Khoảng pM thấp (khoảng <20)	Một đơn vị số
83A10-TCB (thử nghiệm 2)	Khoảng pM thấp (khoảng <20)	Một đơn vị số
83A10-TCBcv (thử nghiệm 1)	Khoảng pM thấp (khoảng <20)	Một đơn vị số
83A10-TCBcv (thử nghiệm 2)	1,5	0,3

Ví dụ 3

Điều chế kháng thể đặc hiệu kép tế bào T “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” có các biến đổi điện tích (kháng Her2/kháng CD3) và kháng thể đặc hiệu kép tế bào T “2+1 IgG CrossFab” có các biến đổi điện tích (kháng Her3/kháng CD3)

Việc minh họa sơ lược phân tử được điều chế trong ví dụ này được thể hiện trên Fig.27. Phân tử kháng Her2/kháng CD3 “2+1 IgG CrossFab, đảo ngược” có các biến đổi điện tích (được đề cập đến trong ví dụ này là “TCB Her2”) bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO 21, 52, 53 và 54. Phân tử kháng Her3/kháng CD3 “2+1 IgG Crossfab” có các biến đổi điện tích (được đề cập đến trong ví dụ này là “TCB Her3”) bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO 21, 55, 56 và 57.

Phân tử được điều chế, tinh chế và phân tích như được mô tả trong Ví dụ 1 ở trên (với một bước điều chế SEC).

Cả hai phân tử có thể được tinh chế với chất lượng cuối cùng cao được thể hiện bằng sắc ký loại trừ kích thước phân tích và CE-SDS (Bảng 16, 17). Mặc dù việc thu hồi TCB Her2 trong quá trình điều chế này thấp hơn so với TCB Her3, protein gần như tinh khiết sau hai bước tinh chế (Protein A và SEC). Phân tích CE-SDS thể hiện chỉ 1,18% tạp

chất phân tử lượng thấp ở khoảng 164 kDa (Bảng 17). Các loại được phát hiện ở 187,28 kDa tương ứng với phân tử đích mà không glycosyl hóa liên kết với N trên miền Fc (các loài này thường được phát hiện bởi CE-SDS đối với IgG₁ người sau khi sản sinh trong tế bào nhân chuẩn).

TCB Her3 có thể được tinh chế với độ thu hồi tốt. Chất lượng cuối cùng là ưu việt đối với TCB Her2 so với hàm lượng monome cuối cùng. Tương tự, CE-SDS thể hiện 100% protein đích, giả sử đỉnh được phát hiện ở 192,05 kDa tương ứng với loại Fc không được glycosyl hóa.

Đối với cả hai chế phẩm không có tạp chất phân tử lượng thấp liên quan đến sản phẩm như các chuỗi nhẹ tự do (phân tử lượng được mong đợi ở 25 kDa), chuỗi nhẹ được dime hóa do nó có thể xuất hiện bằng cách chỉ đưa trao đổi CH1-CL trên một chuỗi nhẹ (phân tử lượng được mong đợi ở 50 kDa) hoặc phân tử có chuỗi nhẹ thiếu liên kết hoặc chuỗi nhẹ không phải cùng hóa trị (phân tử lượng được mong đợi ở 125 kDa, 150 kDa hoặc 175 kDa) được phát hiện bằng CE-SDS hoặc sắc ký loại trừ kích thước phân tích.

Bảng 16. Tóm tắt việc sản xuất và tinh chế phân tử TCB kháng Her2/kháng CD3 và kháng Her3/kháng CD3 có các biến đổi điện tích.

Phân tử	Độ chuẩn [mg/l]	Thu hồi [%]	Hiệu suất [mg/l]	SEC phân tích (phân tử lượng cao/Monome/phân tử lượng thấp) [%]
TCB Her2	45	1,8	1	3,3/96,7/0
TCB Her3	72	12,7	11,42	0/100/0

Bảng 17. Phân tích CE-SDS (không khử) của phân tử TCB kháng Her2/kháng CD3 và kháng Her3/kháng CD3 có các biến đổi điện tích.

Phân tử	Đỉnh #	Kích thước [kDa]	Độ tinh khiết [%]
TCB Her2	1	163,99	1,18
	2	187,28	1,30
	3	200,81	97,52

TCB Her3	1	192,05	19,36
	2	198,57	80,64

Khả năng gắn kết của TCB Her2 và TCB Her3 với tế bào

Các tế bào dạng huyền phù Jurkat được thu hoạch, rửa bằng chất đệm FACS (PBS + BSA 0,1%) một lần và khả năng sống được xác định bằng ViCell.

Các tế bào khối u KPL-4 bám dính (đã được cung cấp bởi J. Kurebayashi, Kawasaki Medical School, Nhật Bản) được thu hoạch với chất đệm hòa tan tế bào (Gibco Invitrogen) và được rửa bằng chất đệm FACS một lần, trước khi khả năng sống được xác định bằng ViCell.

0,2 triệu tế bào được dàn trên đĩa trong mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ đáy tròn và các đĩa này được ly tâm trong 4 phút ở tốc độ 4000m/s^2 . Sau đó, $25\mu\text{l}$ /lỗ phân pha loãng TCB trong chất đệm FACS được bổ sung vào các tế bào này. Các tế bào được ủ trong 30 phút trong tủ lạnh. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần bằng $150\mu\text{l}$ chất đệm FACS cho mỗi lỗ.

$25\mu\text{l}$ kháng thể thứ cấp được pha loãng thích hợp (mảnh AffiniPure F(ab')_2 được tiếp hợp FITC, mảnh IgG, F(ab')_2 của dê kháng người đặc hiệu, Jackson ImmunoResearch) được bổ sung cho mỗi lỗ và các đĩa này được nhuộm trong 30 phút nữa ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối.

Các đĩa này được rửa hai lần bằng $150\mu\text{l}$ chất đệm FACS trong mỗi lỗ và được tái huyền phù trong $150\mu\text{l}$ chất đệm FACS. Việc phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng BD FACS CantoII, được trang bị phần mềm FACS Diva. Giá trị huỳnh quang trung bình (MFI) được vẽ biểu đồ dựa vào nồng độ của phân tử TCB.

Như được thể hiện trên Fig.29, cả hai TCB cho thấy khả năng gắn kết tốt phụ thuộc vào nồng độ với các kháng nguyên đích tương ứng của chúng trên tế bào.

Sự hoạt hóa của tế bào tác động T CD8^+ của người, sau khi phân giải qua trung gian tế bào T các tế bào khối u ở người, được gây cảm ứng bằng TCB Her3

Các tế bào tác động T CD8^+ của thử nghiệm phân giải tế bào khối u cổ điển (như được mô tả dưới đây) với TCB Her3 bằng cách sử dụng tỷ lệ tế bào tác động với đích (E:T) bằng 10:1 và thời gian ủ 48 giờ được đánh giá về phần trăm tế bào dương tính với CD69.

Tóm lại, sau khi ủ, các PBMC được chuyển vào đĩa đáy tròn có 96 lỗ, được ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2 trong 5 phút và được rửa hai lần bằng PBS chứa BSA 0,1%. Việc nhuộm màu bề mặt CD8 (Biolegend #300908) và CD69 (BioLegend #310904) được thực hiện theo chỉ định của nhà cung cấp. Tế bào được rửa hai lần bằng $150 \mu\text{l}$ /lỗ PBS chứa BSA 0,1% và được cố định trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng $100 \mu\text{l}$ /lỗ PFA 1%. Sau khi ly tâm, các mẫu được tái huyền phù trong $200 \mu\text{l}$ /lỗ PBS BSA 0,1% và được phân tích ở FACS CantoII (phần mềm FACS Diva).

Như được thể hiện trên Fig.30, TCB Her3 kích thích liên kết ngang của các tế bào T và các tế bào khối u (KPL-4) thông qua các góc hướng đích tương ứng của nó và cảm ứng sự hoạt hóa của các tế bào T theo cách phụ thuộc vào nồng độ.

Thử nghiệm hoạt hóa Jurkat-NFAT

Khả năng của TCB Her2 và TCB Her3 để kích thích liên kết ngang tế bào T và sau đó là việc hoạt hóa tế bào T, được đánh giá bằng cách sử dụng các đồng môi trường nuôi cấy của tế bào đích dương tính với kháng nguyên khối u (KPL-4) và tế bào báo cáo Jurkat-NFAT (đồng tế bào báo cáo bệnh bạch cầu dạng bạch huyết cấp tính ở người biểu hiện CD3 với gen khởi đầu NFAT, GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, Promega #CS176501). Khi gắn kết đồng thời phân tử TCB với Her2 ở người, một cách tương ứng Her3 ở người, kháng nguyên (được biểu hiện trên các tế bào khối u) và kháng nguyên CD3 (được biểu hiện trên tế bào báo cáo Jurkat-NFAT), gen khởi đầu NFAT được hoạt hóa và làm biểu hiện luciferaza đom đóm hoạt tính. Cường độ của tín hiệu phát quang (thu được khi bổ sung cơ chất luciferaza) tỷ lệ với cường độ của sự hoạt hóa và tín hiệu CD3.

Đối với thử nghiệm này, các tế bào khối u KPL-4 người được thu hoạch với chất đệm hòa tan tế bào (Gibco Invitrogen) và khả năng sống được xác định bằng cách sử dụng ViCell. 20000 tế bào/lỗ được dàn trên đĩa vào trong đĩa 96 lỗ thành màu trắng, đáy phẳng (Greiner bio-one) và TCB được pha loãng hoặc môi trường (đối với các đối chứng) được bổ sung. Sau đó, các tế bào báo cáo Jurkat-NFAT được thu hoạch và khả năng sống được đánh giá bằng cách sử dụng ViCell. Các tế bào được tái huyền phù trong môi trường nuôi cấy tế bào và được bổ sung vào các tế bào khối u để đạt được tỷ lệ E:T cuối cùng là 2,5:1 (đối với TCB Her2) hoặc 5:1 (đối với TCB Her3) như đã chỉ định, và thể tích cuối cùng là $100 \mu\text{l}$ cho mỗi lỗ. Tế bào được ủ trong 5 giờ ở 37°C trong thiết bị ủ ấm. Khi kết thúc thời gian ủ, $100 \mu\text{l}$ /lỗ dung dịch One-Glo (Promega, #E6120) (1:1 One-Glo và thể tích môi

trường thử nghiệm cho mỗi lỗ) được bổ sung vào các lỗ và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Sự phát quang được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đọc WALLAC Victor3 ELISA (PerkinElmer2030), 5 giây/lỗ là thời gian phát hiện.

Như được mô tả trên Fig.31, cả hai phân tử TCB đều kích thích liên kết ngang tế bào T thông qua CD3 và sau đó là sự hoạt hóa tế bào T. TCB Her3 có hiệu lực lên tế bào KPL-4 nhiều hơn một chút, có thể được giải thích bởi nồng độ Her3 cao hơn so với Her2 trên các tế bào đích này.

Phân giải tế bào khối u được gây cảm ứng bằng TCB Her2 và TCB Her3

Việc phân giải tế bào khối u của tế bào đích khối u biểu hiện Her2- hoặc Her3 được gây cảm ứng bằng phân tử TCB tương ứng được đánh giá, sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (PBMC) làm chất tác động, ở tỷ lệ E:T bằng 10:1. Việc phân giải tế bào khối u được xác định bằng cách đo LDH được giải phóng vào dịch nổi trên bề mặt sau 24 giờ và 48 giờ khi ủ với các TCB, như đã được chỉ định.

Các PBMC ở người được phân lập từ máu sạch hoặc từ lớp đệm. Tóm lại, máu được pha loãng 2:1 (máu sạch) hoặc 3:1 (lớp đệm) bằng PBS. Khoảng 30ml hỗn hợp máu/PBS được đặt trên 15ml Histopaque (Sigma) và được ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 4500 m/s^2 không hãm lại ở nhiệt độ trong phòng. Các tế bào lympho được gom bằng ống pipet 10ml vào ống 50ml chứa PBS. Các ống này được làm đầy lên đến 50ml PBS và được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 350 g. Dịch nổi trên bề mặt được gạn ra, viên được tái huyền phù trong 50ml PBS và được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 3000 m/s^2 . Bước rửa được lặp lại một lần. Các tế bào được tái huyền phù trong RPMI chứa FCS 10% và GlutaMax 1% (Life Technologies) và được bảo quản ở 37°C , 5% CO_2 trong tủ ủ cho đến khi bắt đầu thử nghiệm (không lâu hơn 24 giờ).

Các tế bào đích được thu hoạch với Trypsin/EDTA, được rửa, và được dàn trên đĩa ở mật độ là 30000 tế bào/lỗ bằng cách sử dụng đĩa 96 lỗ đáy phẳng. Các tế bào được để kết dính qua đêm trong thiết bị ủ ấm. Vào ngày thử nghiệm, các đĩa thử nghiệm được ly tâm ở tốc độ 3500 m/s^2 trong 5 phút và môi trường được hút ra. 100 μl trong mỗi lỗ môi trường thử nghiệm được bổ sung.

Các TCB được bổ sung ở các nồng độ đã nêu (nằm trong khoảng từ 0,001pM – 1nM đối với TCB Her3, và 0,01pM – 100nM đối với TCB Her2, trong 3 phiên bản). Các PBMC được bổ sung vào tế bào đích ở tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 10:1. Việc tiêu diệt tế bào đích

được đánh giá sau 24 giờ và 48 giờ ủ bằng cách xác định số lượng của LDH (lactat dehydrogenaza) giải phóng vào các dịch nổi tế bào bằng tế bào gây chết tế bào theo chương trình/tế bào hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Thu được các tế bào đích phân giải tối đa (= 100%) bằng cách ủ tế bào đích với Triton X-100 1%. Mức phân giải tối thiểu (= 0%) đề cập đến tế bào đích được đồng ủ với tế bào tác động mà không có kháng thể đặc hiệu kép. Các giá trị EC50 được tính toán bằng cách sử dụng GraphPadPrism5.

Trong một thử nghiệm khác, mức độ phân giải tế bào khối u được xác định bằng hoạt tính Caspaza 3/7 sau 6,5 giờ bằng cách đo sự phát quang trong bộ đọc vi đĩa (thời gian đọc 5 giây cho mỗi lỗ).

Để xác định hoạt tính caspaza 3/7, tế bào đích KPL-4-caspaza-3/7 GloSensor (tế bào KPL-4 được chuyển nhiễm ổn định với plasmit GloSensor) được thu hoạch như được mô tả ở trên. Sau một lần rửa bằng PBS, nồng độ này được điều chỉnh đến $0,3 \times 10^6$ tế bào/ml trong môi trường thử nghiệm (RPMI1640, FCS 2%, GlutaMax 1%) và được trộn với chất phản ứng GloSensor 2% thể tích/thể tích (Promega). 100 μ l (= 30000 tế bào) huyền phù tế bào đích này được chuyển vào mỗi lỗ của đĩa 96 đáy phẳng có vách màu trắng.

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được điều chế bằng cách ly tâm mật độ Histopaque của chế phẩm tế bào lympho được làm giàu (lớp đệm) thu được từ người cho khỏe mạnh, như được mô tả ở trên. Thử nghiệm phân giải tế bào khối u được thực hiện chủ yếu như được mô tả ở trên.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.32C và Fig.33 minh họa rằng phân tử TCB Her3 cảm ứng hoạt lực và sự chết tế bào theo chương trình phụ thuộc vào nồng độ và sự phân giải các tế bào khối u KPL-4.

Điều này cũng giống như với TCB Her2 được thể hiện trên Fig.32A và B và cho thấy sự phân giải phụ thuộc đáng kể vào nồng độ của các tế bào khối u theo thời gian. Từ đó, EC50 tiêu diệt dường như phụ thuộc vào mức độ biểu hiện của Her2 trên tế bào đích tương ứng. Mức độ biểu hiện càng cao thì việc tiêu diệt tế bào khối u bởi TCB Her2 càng tốt hơn.

Ví dụ 4

Điều chế các kháng thể đặc hiệu kép tế bào T “(Fab)₂-CrossFab” có và không có biến đổi điện tích (kháng MCSP/kháng CD3)

Việc minh họa sơ lược phân tử được điều chế trong ví dụ này được thể hiện trên Fig.34. Phân tử “(Fab)₂-CrossFab” kháng MCSP/kháng CD3 có các biến đổi điện tích trong tác nhân liên kết MCSP (được đề cập đến là “(Fab)₂-XFab-LC007cv” trong ví dụ này) bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO 58, 59 và 60. Phân tử “(Fab)₂-CrossFab” kháng MCSP/kháng CD3 không biến đổi điện tích (được đề cập đến là “(Fab)₂-XFab” trong ví dụ này) bao gồm các trình tự axit amin tương ứng mà không có các biến đổi điện tích.

Phân tử này được điều chế, được tinh chế và được phân tích chủ yếu như được mô tả trong Ví dụ 1 ở trên, với các mô phỏng sau.

Để sản xuất các phân tử này, các tế bào HEK293-EBNA đã được chuyển nhiễm với các vector biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:2:1 (“chuỗi nặng vector” : “chuỗi nhẹ vector Fab kháng MCSP” : “chuỗi nhẹ vector Fab kháng CD3”).

Nồng độ của cấu trúc trong môi trường nuôi cấy được xác định bằng ProteinA-HPLC, dựa trên việc gắn kết các phần của miền CH1 với ProteinA ở pH=8,0 và bước rửa giải từ pH=2,5 như được mô tả trong Ví dụ 1.

Các protein được tiết ra được tinh chế từ các dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực bằng cách sử dụng sắc ký ái lực gắn kết với CH1, tiếp theo là bước sắc ký loại trừ theo kích cỡ.

Để sắc ký ái lực, dịch nổi được nạp lên trên cột HiTrap KappaSelect (CV=5 mL, GE Healthcare) được cân bằng bằng 5ml Tris 50mM, Glyxin 100mM, NaCl 150mM pH = 8,0. Protein không được liên kết được loại bỏ bằng cách rửa bằng ít nhất 10 thể tích cột Tris 50mM, glyxin 100mM, NaCl 150mM pH = 8,0. Protein đích được rửa giải trong 10 thể tích cột gradien đến Tris 50mM, glyxin 100mM, NaCl 150mM pH = 2,0. Dung dịch protein được trung hòa bằng cách bổ sung 1/40 Tris 2M pH = 8,0. Protein đích được cô và được lọc trước khi được nạp trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) được cân bằng bằng Histidin 20mM, Natri Clorua 140mM, Tween-20 0,01%, độ pH = 6,0.

Cả hai phân tử được sản xuất và được tinh chế theo cùng một phương pháp so với phân tử không biến đổi điện tích (“(Fab)₂-XFab”), độ chuẩn của phân tử có các điện tích thấp hơn 10 lần. Tuy nhiên, việc thu hồi cuối cùng là cao hơn khoảng hai lần cao hơn đối

với phân tử có các biến đổi điện tích trong hai Fab kháng MCSP (“(Fab)2-XFab-LC007cv”) (Bảng 18). Phân tử (Fab)2-XFab-LC007cv có thể được tinh chế đến hàm lượng monome cuối cùng bằng 95,8% được thể hiện bằng sắc ký loại trừ kích thước và độ tinh khiết cuối cùng được chứng minh bởi phép phân tích CE-SDS là 94,33%.

Bảng 18. Tóm tắt việc sản xuất và tinh chế phân tử TCB kháng MCSP/kháng CD3 có và không có biến đổi điện tích.

Phân tử	Độ chuẩn [mg/l]	Phục hồi [%]	Hiệu suất [mg/l]	SEC phân tích (phân tử lượng cao/Monome/phân tử lượng thấp) [%]
(Fab)2-XFab	25	6,24	7,8	0/100/0
(Fab)2-XFab-LC007cv	2,32	10,5	0,24	3,2/95,8/1

Bảng 19. Phân tích CE-SDS (không khử) của phân tử TCB kháng MCSP/kháng CD3 có các biến đổi điện tích.

Phân tử	Đỉnh #	Kích thước [kDa]	Độ tinh khiết [%]
(Fab)2-XFab-LC007cv	1	162,67	94,33
	2	170,59	5,67

Việc gắn kết tế bào của các kháng thể đặc hiệu kép tế bào T “(Fab)₂-CrossFab” có và không biến đổi điện tích (kháng MCSP/kháng CD3)

Các tế bào dạng huyền phù Jurkat-NFAT được thu hoạch, được rửa bằng chất đệm FACS (PBS + BSA 0,1%) một lần và khả năng sống được xác định bằng ViCell.

Các tế bào khối u MV-3 bám dính được thu hoạch với chất đệm hòa tan tế bào (Gibco Invitrogen) và được rửa bằng chất đệm FACS một lần, trước khi khả năng sống được xác định bằng ViCell.

0,2 triệu tế bào được dàn trên đĩa trong mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ đáy tròn và các đĩa này được ly tâm trong 4 phút ở tốc độ 4000 m/s². Sau đó, 25µl trong mỗi lỗ của các chất pha loãng kháng thể sơ cấp trong chất đệm FACS được bổ sung vào tế bào. Các tế bào

được ủ trong 30 phút trong tủ lạnh. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần bằng 150µl chất đệm FACS cho mỗi lỗ.

25µl kháng thể thứ cấp đã được pha loãng (mảnh AffiniPure F(ab')₂ được tiếp hợp FITC, mảnh F(ab')₂ của dê kháng IgG người đặc hiệu, Jackson ImmunoResearch) được bổ sung cho mỗi lỗ và các đĩa này được nhuộm trong 30 phút nữa ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối.

Các đĩa này được rửa hai lần bằng 150µl chất đệm FACS trong mỗi lỗ và được tái huyền phù trong 150µl chất đệm FACS. Việc phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng BD FACS CantoII, được trang bị phần mềm FACS Diva. Giá trị huỳnh quang trung bình (MFI) được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ của phân tử TCB MCSP.

Như được thể hiện trên Fig.36, phân tử (Fab)₂-XFab-LC007cv cho thấy khả năng gắn kết phụ thuộc vào nồng độ với MCSP ở người trên MV-3 và với CD3 ở người trên tế bào Jurkat. Phân tử (Fab)₂-XFab không biến đổi điện tích cho thấy khả năng gắn kết tương ứng với MCSP ở người như (Fab)₂-XFab-LC007cv (khả năng gắn kết EC₅₀ 2,3nM đối với (Fab)₂-XFab-LC007cv so với EC₅₀ 1,5nM đối với (Fab)₂-XFab).

Phân giải tế bào khối u qua trung gian bởi các kháng thể đặc hiệu kép có tế bào T “(Fab)₂-CrossFab” có và không biến đổi điện tích (kháng MCSP/kháng CD3)

Sự phân giải tế bào khối u của tế bào đích khối u MV-3 biểu hiện MCSP được gây cảm ứng bằng phân tử MCSP TCB sử dụng các PBMC ở người làm chất tác động, ở tỷ lệ E:T bằng 10:1. Khả năng phân giải tế bào khối u được xác định bằng cách đo LDH được giải phóng vào dịch nổi trên bề mặt sau 24 giờ và 48 giờ khi ủ với các TCB.

Tóm lại, các tế bào đích được thu hoạch với Trypsin/EDTA, được rửa, và được dàn trên đĩa ở mật độ ở 25000 tế bào/lỗ bằng cách sử dụng đĩa 96 lỗ đáy phẳng. Các tế bào được để bám dính qua đêm trong thiết bị ủ ẩm. Vào ngày thử nghiệm, các đĩa thử nghiệm được ly tâm ở tốc độ 3500 m/s² trong 5 phút và môi trường được hút ra. 100µl trong mỗi lỗ của môi trường thử nghiệm được bổ sung.

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được phân lập từ máu sạch. Tóm lại, máu được pha loãng 2:1 bằng PBS. Khoảng 30ml hỗn hợp máu/PBS được đặt trên 15ml Histopaque (Sigma) và được ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 4500 m/s² không hãm lại. Các tế bào lympho được gom bằng ống 10ml vào ống 50ml chứa PBS. Các ống được làm đầy

lên đến 50ml bằng PBS và được ly tâm 10 phút ở tốc độ 3500 m/s^2 . Dịch nổi trên bề mặt được gạn ra, viên được tái huyền phù trong 50ml PBS và được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 3000 m/s^2 . Bước rửa được lặp lại một lần. Các tế bào được tái huyền phù trong RPMI chứa FCS 10% và GlutaMax 1% (Life Technologies) và được bảo quản ở 37°C , 5% CO_2 trong tủ ủ cho đến khi bắt đầu thử nghiệm (không lâu hơn 24 giờ).

Đối với thử nghiệm tiêu diệt, phân tử TCB được bổ sung ở các nồng độ đã nêu (nằm trong khoảng từ 0,04pM đến 10nM trong 3 phiên bản). Các PBMC được bổ sung vào tế bào đích ở tỷ lệ E:T cuối cùng bằng 10:1. Việc tiêu diệt tế bào đích được đánh giá sau 24 giờ và 48 giờ ủ bằng cách xác định số lượng của LDH (lactat dehydrogenaza) giải phóng vào các dịch nổi tế bào bằng tế bào gây chết tế bào theo chương trình/tế bào hoại tử (bộ kit phát hiện LDH, Roche Applied Science, #11 644 793 001). Các tế bào đích phân giải tối đa (= 100%) đạt được bằng cách ủ tế bào đích với Triton X-100 1%. Mức phân giải tối thiểu (= 0%) đề cập đến tế bào đích được đồng ủ với tế bào tác động mà không có kháng thể đặc hiệu kép. Các giá trị EC_{50} được tính toán bằng cách sử dụng GraphPadPrism5.

Như được mô tả trên Fig.37, cả hai phân tử cho thấy sự phân giải phụ thuộc vào nồng độ của tế bào đích biểu hiện hMCSP. Hoạt lực của phân tử (Fab)2-XFab-LC007cv (EC_{50} 2,8pM sau 24 giờ, và 8,6pM sau 48 giờ) tương ứng với hoạt lực của phân tử (Fab)2-XFab không biến đổi điện tích (EC_{50} 5,9pM sau 24 giờ, và 4,8pM sau 48 giờ).

Mặc dù sáng chế đã được mô tả ở một chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ nhằm mục đích giúp hiểu rõ, các phần mô tả và ví dụ không nên được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Phần mô tả tất cả các patent và tài liệu khoa học trích dẫn ở đây được kết hợp toàn bộ một cách rõ ràng để tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T bao gồm:

- a) phân tử Fab thứ nhất gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất;
- b) phân tử Fab thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó các miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ Fab và chuỗi nặng Fab được thay thế cho nhau;
- c) phân tử Fab thứ ba gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và
- d) miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và thứ hai có khả năng liên kết ổn định;

trong đó kháng nguyên thứ nhất là kháng nguyên tế bào đích và kháng nguyên thứ hai là kháng nguyên hoạt hóa tế bào T, cụ thể là CD3, cụ thể hơn là epsilon CD3;

trong đó phân tử Fab thứ ba trong c) giống hệt với phân tử Fab thứ nhất trong a);

trong đó miền cố định CL của phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) axit amin ở vị trí 124 được thay thế bằng lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat) và axit amin ở vị trí 123 được thay thế bằng arginin (R) hoặc lysin (K) (đánh số theo hệ thống đánh số Kabat), và trong đó miền cố định CH1 của phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) axit amin ở vị trí 147 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo chỉ số đánh số Kabat EU) và axit amin ở vị trí 213 được thay thế bằng axit glutamic (E) (đánh số theo chỉ số đánh số Kabat EU); và trong đó miền Fc là miền Fc của IgG, và trong đó

trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra đoạn khóa trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất mà có thể nằm trong hốc trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó phần nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai trong đó phần nhô ra trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất có thể được định vị; và

trong đó:

(i) phân tử Fab thứ nhất trong a) được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ hai trong b), và phân tử

Fab thứ hai trong b) và phân tử Fab thứ ba trong c) mỗi phân tử được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong số các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc trong d), hoặc

(ii) phân tử Fab thứ hai trong b) được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của chuỗi nặng Fab của phân tử Fab thứ nhất trong a), và phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) mỗi phân tử được dung hợp ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng Fab với đầu tận cùng N của một trong số các cấu trúc siêu phân tử của miền Fc trong d).

2. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 1, trong đó kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là CD3 và phân tử Fab này gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T bao gồm vùng xác định bổ thể chuỗi nặng (CDR) 1 của SEQ ID NO: 4, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 5, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 8, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 9, và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 10.

3. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng nguyên hoạt hóa tế bào T là CD3 và phân tử Fab này gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7.

4. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng nguyên tế bào đích là CD20 và phân tử Fab này gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng xác định bổ thể (CDR) 1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 46, CDR 2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 47, CDR 3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 48, CDR 1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 49, CDR 2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 50 và CDR 3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 51.

5. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng nguyên tế bào đích CD20 và phân tử Fab này gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99%

hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

6. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó phân tử Fab thứ nhất trong a) và phân tử Fab thứ ba trong c) mỗi phân tử bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31.

7. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó phân tử Fab thứ hai trong b) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7.

8. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó miền Fc là miền Fc của IgG₁ hoặc IgG₄.

9. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó miền Fc là miền Fc ở người.

10. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó gốc axit amin đã nêu có thể tích chuỗi bên lớn hơn được chọn từ nhóm bao gồm arginin (R), phenylalanin (F), tyrosin (Y), và tryptophan (W), và gốc axit amin đã nêu có thể tích chuỗi bên nhỏ hơn được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), serin (S), threonin (T), và valin (V).

11. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V), và tùy ý trong cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc và ngoài ra gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc serin (T366S) và gốc leuxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

12. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó trong cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc ngoài ra, gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein (S354C) hoặc gốc axit glutamic ở

vị trí 356 được thay thế bằng gốc xystein (E356C), và trong cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc và ngoài ra gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

13. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin S354C và T366W, và cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc bao gồm sự thay thế axit amin Y349C, T366S, L368A và Y407V (đánh số theo chỉ số đánh số Kabat EU).

14. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó miền Fc thể hiện ái lực gắn kết giảm với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động giảm, so với miền Fc của IgG₁ tự nhiên.

15. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó miền Fc bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin mà làm giảm gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động.

16. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó một hoặc nhiều thay thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ nhóm gồm L234, L235, và P329 (đánh số theo chỉ số đánh số Kabat EU).

17. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó mỗi cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bao gồm ba thay thế axit amin mà làm giảm khả năng gắn kết với thụ thể Fc hoạt hóa và/hoặc chức năng tác động, trong đó thay thế axit amin đã nêu là L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số đánh số Kabat EU).

18. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 17, trong đó thụ thể Fc là thụ thể Fcγ.

19. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 18, trong đó chức năng tác động là độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

20. Phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phân tử này bao gồm ít nhất một chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của

SEQ ID NO: 18, ít nhất một chuỗi nặng có độ tương đồng trình tự khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, ít nhất một chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, và ít nhất một chuỗi nhẹ có độ tương đồng trình tự khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21.

21. Polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20.
22. Vector, cụ thể là vector biểu hiện, bao gồm (các) polynucleotit theo điểm 21.
23. Tế bào chủ bao gồm (các) polynucleotit theo điểm 21 hoặc (các) vector theo điểm 22.
24. Phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên hoạt hóa tế bào T và kháng nguyên tế bào đích, phương pháp này bao gồm các bước a) nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 23 trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T và b) thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T.
25. Dược phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoạt hóa tế bào T theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20 và chất mang dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> PHÂN TỬ GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN ĐẶC KIỂU KÉP HOẠT HÓA TẾ BÀO T,
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN NÀY

<130> P32209

<150> EP 14179764.7

<151> 2014-08-04

<150> EP 15170866.6

<151> 2015-06-05

<160> 73

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

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

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195 200 205

<210> 2
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

<400> 2

Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
 20 25 30
 Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45
 Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
 50 55 60
 Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
 65 70 75 80
 Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
 85 90 95
 Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
 100 105 110
 Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
 115 120 125
 Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
 130 135 140
 Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
 145 150 155 160
 Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
 165 170 175
 Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
 180 185 190
 Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195

<210> 3
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD3 VH

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD3 HCDR1

<400> 4

Thr Tyr Ala Met Asn
 1 5

<210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD3 HCDR2

<400> 5

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD3 HCDR3

<400> 6

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 7

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD3 VL

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD3 LCDR1

<400> 8

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD3 LCDR2

<400> 9

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD3 LCDR3

<400> 10

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> linker

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tác nhân liên kết

<400> 12

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 225
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

 Pro
 225

 <210> 14
 <211> 690
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CD20 VH-CH1-CD3 VH-CL-Fc (knob, P329G LALA)

 <400> 14
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 245 250 255
 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
 260 265 270
 Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
 275 280 285
 Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 290 295 300
 Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 305 310 315 320
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
 325 330 335
 Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 340 345 350
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
 355 360 365
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
 370 375 380

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 385 390 395 400
 Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 405 410 415
 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 420 425 430
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
 435 440 445
 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
 450 455 460
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 465 470 475 480
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 485 490 495
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 500 505 510
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 515 520 525
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 530 535 540
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 545 550 555 560
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
 565 570 575
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 580 585 590
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 595 600 605
 Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 610 615 620
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 625 630 635 640
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 645 650 655
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 660 665 670
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 675 680 685
 Ser Pro
 690

<210> 15
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD20 VH-CH1-Fc (ỏ, P329G LALA)

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD3 VL-CH1

<400> 16

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

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

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
 100 105 110
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 115 120 125
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 195 200 205
 Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210

 <210> 17
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CD20 VL-CL

 <400> 17
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 672
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD20 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (khóa, P329G LALA)

<400> 18

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu
 225 230 235 240
 Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly
 245 250 255
 Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
 260 265 270
 Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
 275 280 285
 Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
 290 295 300
 Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly
 325 330 335
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 340 345 350
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 355 360 365
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 370 375 380
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 385 390 395 400

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 405 410 415
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 420 425 430
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 435 440 445
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 450 455 460
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 465 470 475 480
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 485 490 495
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 500 505 510
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 515 520 525
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 530 535 540
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 545 550 555 560
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 565 570 575
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 580 585 590
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 595 600 605
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 610 615 620
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 625 630 635 640
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 645 650 655
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 660 665 670

<210> 19
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD20 VH-CH1(EF)-Fc (ở, P329G LALA)

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
 355 360 365
 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 <210> 20
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CD20 VL-CL(RK)
 <400> 20
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
 115 120 125
 Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 232

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD3 VH-CL

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

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

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

180 185 190
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 22
 <211> 687
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> BCMA VH-CH1-CD3 VH-CL-Fc (khóa, P329G LALA)
 <400> 22
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 245 250 255
 Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 260 265 270
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 275 280 285
 Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 290 295 300
 Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 305 310 315 320
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 325 330 335
 Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 340 345 350
 Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 355 360 365
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 370 375 380
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 385 390 395 400
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 405 410 415
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 420 425 430
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 435 440 445
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys
 450 455 460
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 465 470 475 480
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 485 490 495
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 500 505 510
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 515 520 525
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

		530					535					540							
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu				
545					550					555					560				
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys				
				565					570					575					
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr				
			580					585					590						
Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp				
		595					600					605							
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu				
	610					615					620								
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu				
625					630					635					640				
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys				
				645					650					655					
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu				
			660					665					670						
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro					
		675					680						685						

```
<210> 23
<211> 444
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> BCMA VH-CH1-Fc (Ổ, P329G LALA)

<400> 23
```

Glu 1	Val	Gln	Leu	Leu 5	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly 10	Leu	Val	Gln	Pro	Gly 15	Gly
Ser	Leu	Arg	Leu 20	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser 30	Ser	Tyr
Ala	Met	Ser 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Val
Ser	Ala 50	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly 55	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr 60	Ala	Asp	Ser	Val
Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile 70	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser 75	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr 80
Leu	Gln	Met	Asn 85	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
Ala	Lys	Val	Leu 100	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr 105	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr 110	Leu	Val

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

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

<210> 24
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD3 VL-CH1

<400> 24

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
 100 105 110
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 115 120 125
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 195 200 205
 Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 25
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> BCMA VL-CL

<400> 25

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 Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 26

<211> 669

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> BCMA VH-CH1(E E)-CD3 VL-CH1-Fc (khóa, P329G LALA)

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu
 225 230 235 240
 Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr
 245 250 255
 Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro
 260 265 270
 Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 275 280 285
 Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala
 290 295 300
 Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys
 305 310 315 320
 Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 325 330 335

Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 340 345 350
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 370 375 380
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 385 390 395 400
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 405 410 415
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 420 425 430
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 435 440 445
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 450 455 460
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 465 470 475 480
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 485 490 495
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 500 505 510
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 515 520 525
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 530 535 540
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 545 550 555 560
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 565 570 575
 Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 580 585 590
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 595 600 605
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 610 615 620
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 625 630 635 640
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 645 650 655

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 660 665

<210> 27
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> BCMA VH-CH1(EE)-Fc (ổ, P329G LALA)

<400> 27

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

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

 <210> 28
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CD3 VH-CL

 <400> 28
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
 115 120 125
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 130 135 140
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

 <210> 29
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> BCMA VL-CL(RK)

 <400> 29
 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 Tyr Pro Pro
 85 90 95

Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 30
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD20 VH

<400> 30

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31
 <211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD20 VL

<400> 31

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val
 115

<210> 32

<211> 672

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD3 VL-CH1-CD20 VH-CH1(EF)-Fc(khóa, P329G LALA)

<400> 32

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
 100 105 110
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 115 120 125
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 195 200 205
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 225 230 235 240
 Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr
 245 250 255
 Ser Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 260 265 270
 Met Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys
 275 280 285
 Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala
 290 295 300
 Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 305 310 315 320
 Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln
 325 330 335
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 340 345 350
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 355 360 365
 Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 370 375 380
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 385 390 395 400
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 405 410 415

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 420 425 430
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 435 440 445
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 450 455 460
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 465 470 475 480
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 485 490 495
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 500 505 510
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 515 520 525
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 530 535 540
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 545 550 555 560
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 565 570 575
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 580 585 590
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 595 600 605
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 610 615 620
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 625 630 635 640
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 645 650 655
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 660 665 670

 <210> 33
 <211> 672
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CD20 VH-CH1-CD3 VL-CH1-Fc(khóa, P329G LALA)

 <400> 33
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu
 225 230 235 240
 Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly
 245 250 255
 Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
 260 265 270
 Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
 275 280 285
 Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
 290 295 300
 Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly
 325 330 335

Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 340 345 350
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 355 360 365
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 370 375 380
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 385 390 395 400
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 405 410 415
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 420 425 430
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 435 440 445
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 450 455 460
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 465 470 475 480
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 485 490 495
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 500 505 510
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 515 520 525
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 530 535 540
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 545 550 555 560
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 565 570 575
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 580 585 590
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 595 600 605
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 610 615 620
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 625 630 635 640
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 645 650 655

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 660 665 670
 <210> 34
 <211> 676
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CD20 VH-CH1 CD3 VL-CL-Fc(khóa, P329G LALA)
 <400> 34
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu
 225 230 235 240
 Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly
 245 250 255

Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
 260 265 270
 Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
 275 280 285
 Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
 290 295 300
 Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly
 325 330 335
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 340 345 350
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 355 360 365
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 370 375 380
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 385 390 395 400
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 405 410 415
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 420 425 430
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 435 440 445
 Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 450 455 460
 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 465 470 475 480
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 485 490 495
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 500 505 510
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 515 520 525
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 530 535 540
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
 545 550 555 560
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 565 570 575

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
580 585 590

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
595 600 605

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
610 615 620

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
625 630 635 640

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
645 650 655

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
660 665 670

Ser Leu Ser Pro
675

<210> 35
<211> 228
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD3 VH-CH1

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys
 225

<210> 36
 <211> 681
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD20 VL-CH1-CD3 VH-CH1(EE)-Fc(khóa, P329G LALA)

<400> 36

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 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 Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 225 230 235 240
 Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 245 250 255
 Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 260 265 270
 Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
 275 280 285
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 290 295 300
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 305 310 315 320
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
 325 330 335
 Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 340 345 350
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 355 360 365
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp
 370 375 380
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 385 390 395 400
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 420 425 430
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 435 440 445
 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 450 455 460
 Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 465 470 475 480
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 485 490 495
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 500 505 510

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 515 520 525
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 530 535 540
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 545 550 555 560
 Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 565 570 575
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 580 585 590
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 595 600 605
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 610 615 620
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 625 630 635 640
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 645 650 655
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 660 665 670
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 675 680

 <210> 37
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CD20 VL-CH1-Fc(ổ, P329G LALA)

 <400> 37
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 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 Ala Ala 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 Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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
 435 440

<210> 38
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD3 VL-CL(KK)

<400> 38

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 100 105 110
 Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Lys Lys Leu
 115 120 125
 Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 165 170 175
 Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 180 185 190
 Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 195 200 205
 Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 39
 <211> 226

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD20 VH-CL

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 130 135 140
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 145 150 155 160
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 165 170 175
 Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 180 185 190
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 195 200 205
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 210 215 220
 Glu Cys
 225

<210> 40

<211> 672

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD20 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc(DD, P329G LALA)

<400> 40

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu
 225 230 235 240
 Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly
 245 250 255
 Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
 260 265 270
 Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
 275 280 285
 Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
 290 295 300
 Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
 305 310 315 320

Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly
 325 330 335
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 340 345 350
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 355 360 365
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 370 375 380
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 385 390 395 400
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 405 410 415
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 420 425 430
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 435 440 445
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 450 455 460
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 465 470 475 480
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 485 490 495
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 500 505 510
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 515 520 525
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 530 535 540
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 545 550 555 560
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 565 570 575
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 580 585 590
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 595 600 605
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val
 610 615 620
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp
 625 630 635 640

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
645 650 655

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
660 665 670

<210> 41
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD20 VH-CH1(EE)-Fc(KK, P329G LALA)

<400> 41

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 42
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CD20 VH-CH1(E E)-Fc(ổ, N297G)

 <400> 42

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
 355 360 365
 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

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

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

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

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

<210> 43

<211> 439

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD3 VL-CH1-Fc(khóa, N297G)

<400> 43

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

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

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

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

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285
 Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 290 295 300
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 305 310 315 320
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 325 330 335
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
 340 345 350
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435

<210> 44
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD20 VH-CH1(EE)-Fc(Ổ, N297G)

<400> 44

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 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys 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 Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

Ser Pro
450

<210> 45
<211> 213
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD20 VL-CL(RK)

<400> 45

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 Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln 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 Arg Lys 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> 46
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD20 HCDR1

<400> 46

Tyr Ser Trp Ile Asn
 1 5

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

<220>
 <223> CD20 HCDR2

<400> 47

Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD20 HCDR3

<400> 48

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr
 1 5 10

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

<220>

<223> CD20 LCDR1

<400> 49

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD20 LCDR2

<400> 50

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser
 1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD20 LCDR3

<400> 51

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 52

<211> 673

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Her2 VH-CH1(EF)-CD3 VL-CH1-Fc(khóa, P329G LALA)

<400> 52

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 Glu 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 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln
 225 230 235 240
 Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys
 245 250 255
 Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val
 260 265 270
 Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn
 275 280 285
 Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly
 290 295 300
 Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala
 305 310 315 320
 Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly
 325 330 335
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 340 345 350
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 355 360 365
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 370 375 380

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 385 390 395 400
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 405 410 415
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 420 425 430
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 435 440 445
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 450 455 460
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 465 470 475 480
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 485 490 495
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 500 505 510
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 515 520 525
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 530 535 540
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 545 550 555 560
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 565 570 575
 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 580 585 590
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 595 600 605
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 610 615 620
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 625 630 635 640
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 645 650 655
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 660 665 670

Pro

<210> 53
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Her2 VH-CH1 (EE)-Fc (Đ, P329G LALA)

<400> 53

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 Glu 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 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 54

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Her2 VL-CL(RK)

<400> 54

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 Arg Lys 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> 55

<211> 673

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD3 VL-CH1-Her3 VH-CH1(EE)- Fc(khóa, P329G LALA)

<400> 55

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

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

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

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

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

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

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

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

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

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

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 195 200 205
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 225 230 235 240
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Ser
 245 250 255
 Ser Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 260 265 270
 Met Gly Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Ser Pro Ser Tyr Asn Gln Lys
 275 280 285
 Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala
 290 295 300
 Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 305 310 315 320
 Cys Ala Arg His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr Trp Gly
 325 330 335
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 340 345 350
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 355 360 365
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 370 375 380
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 385 390 395 400
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 405 410 415
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 420 425 430
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 435 440 445
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 450 455 460
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 465 470 475 480
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 485 490 495

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 500 505 510
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 515 520 525
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 530 535 540
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 545 550 555 560
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 565 570 575
 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 580 585 590
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 595 600 605
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 610 615 620
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 625 630 635 640
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 645 650 655
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 660 665 670
 Pro

 <210> 56
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Her3 VH-CH1(E E)-Fc(Ổ, P329G LALA)

 <400> 56
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Ser Pro Ser Tyr Asn Gln Lys Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr 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 Glu 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 Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

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

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

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

<210> 57

<211> 220

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Her3 VL-CL

<400> 57

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 58
 <211> 664
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MCSP VH-CH1 (EE)-MCSP VH-CH1 (EE)-CD3 VL-CH1

<400> 58

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr
 130 135 140
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu
 195 200 205
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 210 215 220
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 225 230 235 240
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 245 250 255
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 260 265 270

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro
 275 280 285
 Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 290 295 300
 Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 305 310 315 320
 Tyr Cys Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 325 330 335
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 340 345 350
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu
 355 360 365
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 370 375 380
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 385 390 395 400
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 405 410 415
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 420 425 430
 Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 435 440 445
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 450 455 460
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
 465 470 475 480
 Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 485 490 495
 Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 500 505 510
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 515 520 525
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn
 530 535 540
 Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
 545 550 555 560
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 565 570 575
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 580 585 590

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
595 600 605

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
610 615 620

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
625 630 635 640

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
645 650 655

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
660

<210> 59
<211> 229
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD3 VH-CL

<400> 59

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 Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys 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

Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 225

<210> 60
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MCSP VL-CL(RK)

<400> 60

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys 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> 61
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Her2 VH

<400> 61

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
 115 120

<210> 62
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Her2 VL

<400> 62

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

39315

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
100 105

<210>	63
<211>	120
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Her3 VH

<400> 63

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Ser Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

```
<210> 64
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Her3 VL

<400> 64

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 65
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MCSP VH

<400> 65

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 66
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MCSP VL

<400> 66

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 67
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD3 HCDR2

<400> 67

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 68
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD3 LCDR1

<400> 68

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10

<210> 69
 <211> 672
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CD20 VH-CH1(E)-CD3 VL-CH1-Fc(khóa, P329G LALA)

<400> 69
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu
 225 230 235 240
 Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly
 245 250 255
 Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
 260 265 270

Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
 275 280 285
 Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
 290 295 300
 Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly
 325 330 335
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 340 345 350
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 355 360 365
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 370 375 380
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 385 390 395 400
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 405 410 415
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 420 425 430
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 435 440 445
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 450 455 460
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 465 470 475 480
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 485 490 495
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 500 505 510
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 515 520 525
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 530 535 540
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 545 550 555 560
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 565 570 575
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 580 585 590

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
595 600 605

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
610 615 620

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
625 630 635 640

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
645 650 655

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
660 665 670

<210> 70

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD20 VH-CH1(E)-Fc(Ồ, P329G LALA)

<400> 70

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
 355 360 365
 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

 <210> 71
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CD20 VL-CL(R)

 <400> 71
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

 <210> 72
 <211> 672
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> CD20 VH-CH1-CD3 VL-CH1(E E)-Fc(khóa, P329G LALA)

 <400> 72

 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu
 225 230 235 240
 Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly
 245 250 255
 Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln
 260 265 270
 Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys
 275 280 285
 Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly
 290 295 300
 Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly
 325 330 335
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 340 345 350
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 355 360 365
 Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 370 375 380

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 385 390 395 400
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 405 410 415
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 420 425 430
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 435 440 445
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 450 455 460
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 465 470 475 480
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 485 490 495
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 500 505 510
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 515 520 525
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 530 535 540
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
 545 550 555 560
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 565 570 575
 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 580 585 590
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 595 600 605
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 610 615 620
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 625 630 635 640
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 645 650 655
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 660 665 670

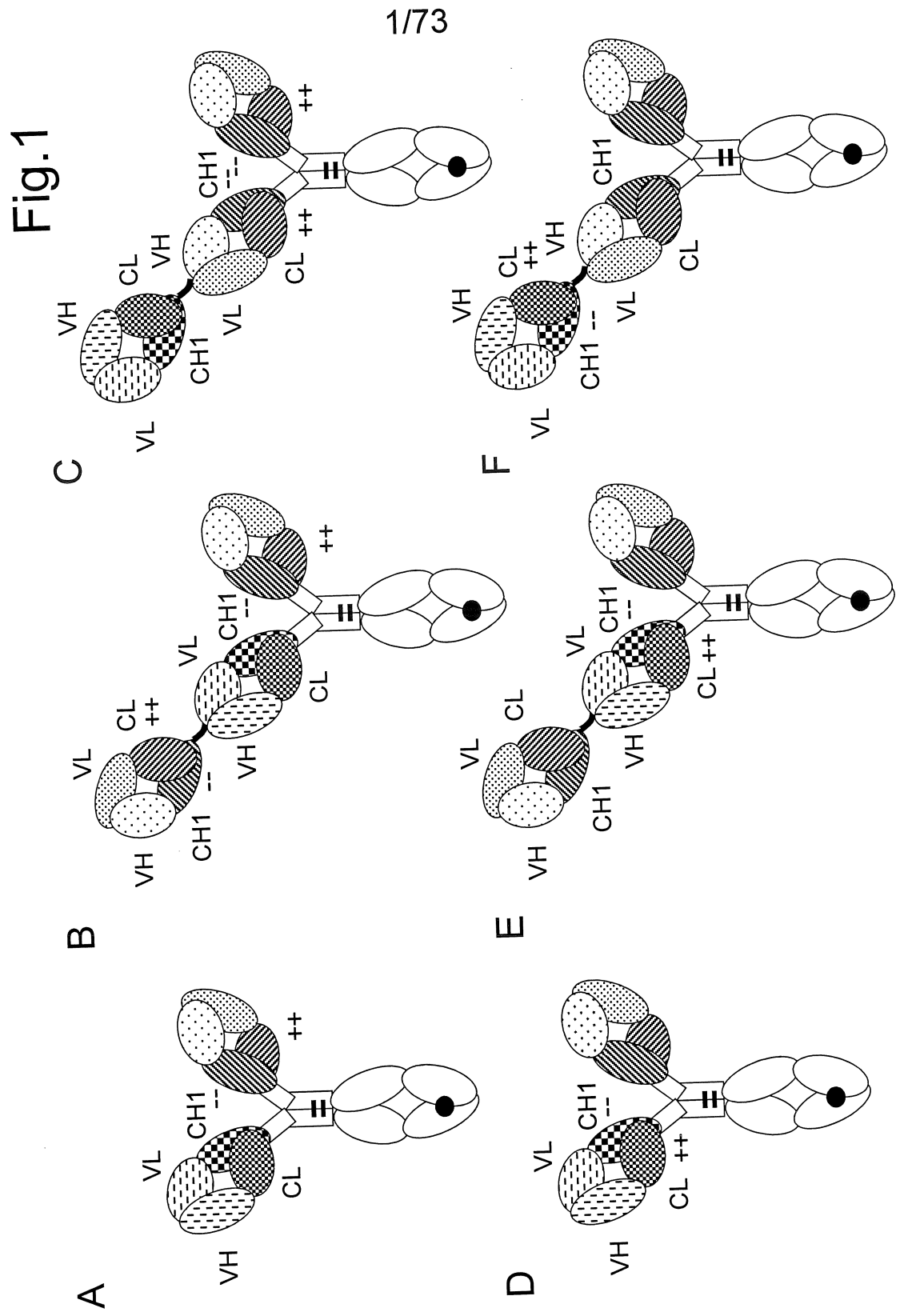
<210> 73
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

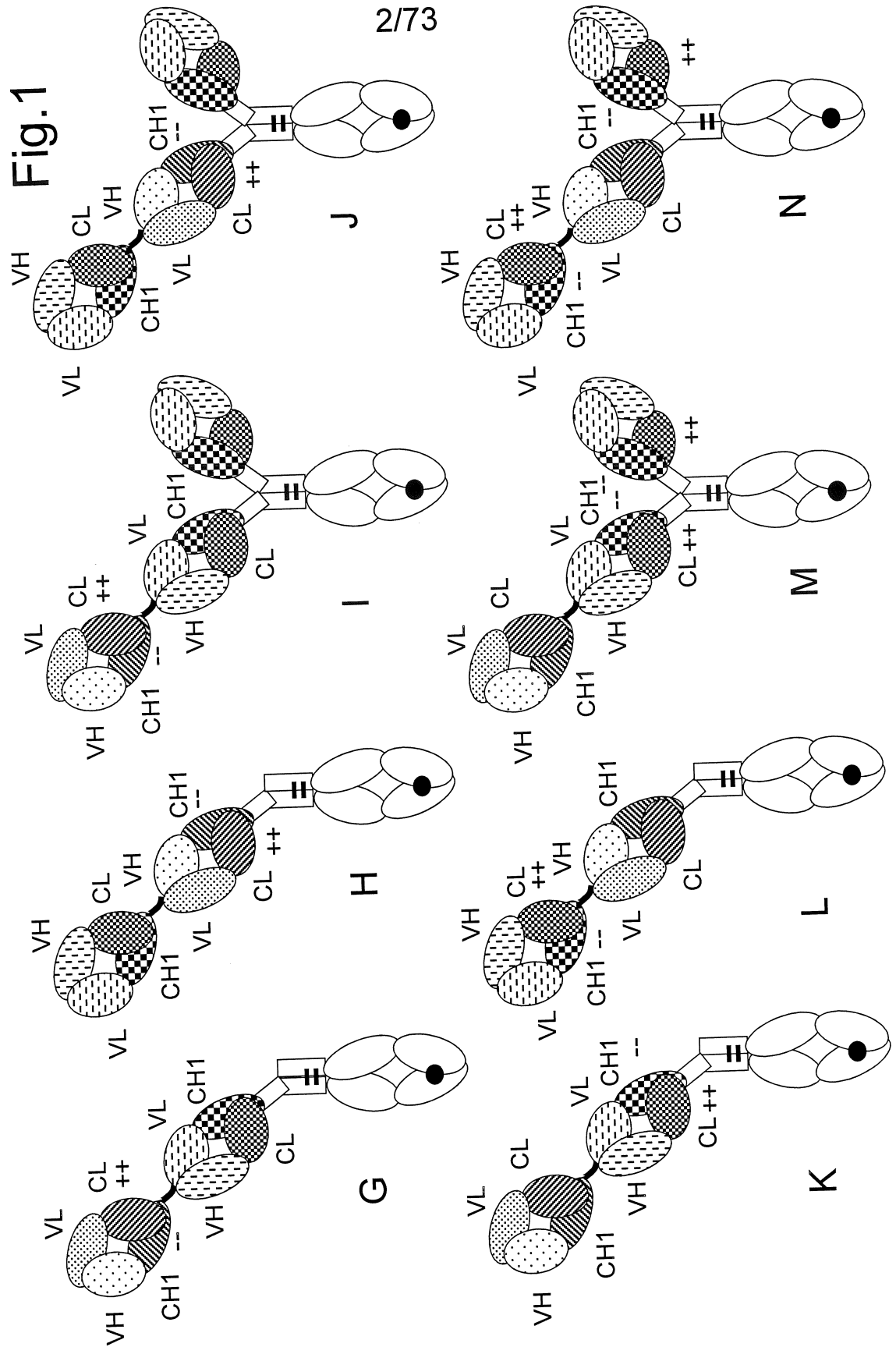
<220>

<223> CD3 VH-CL(RK)

<400> 73

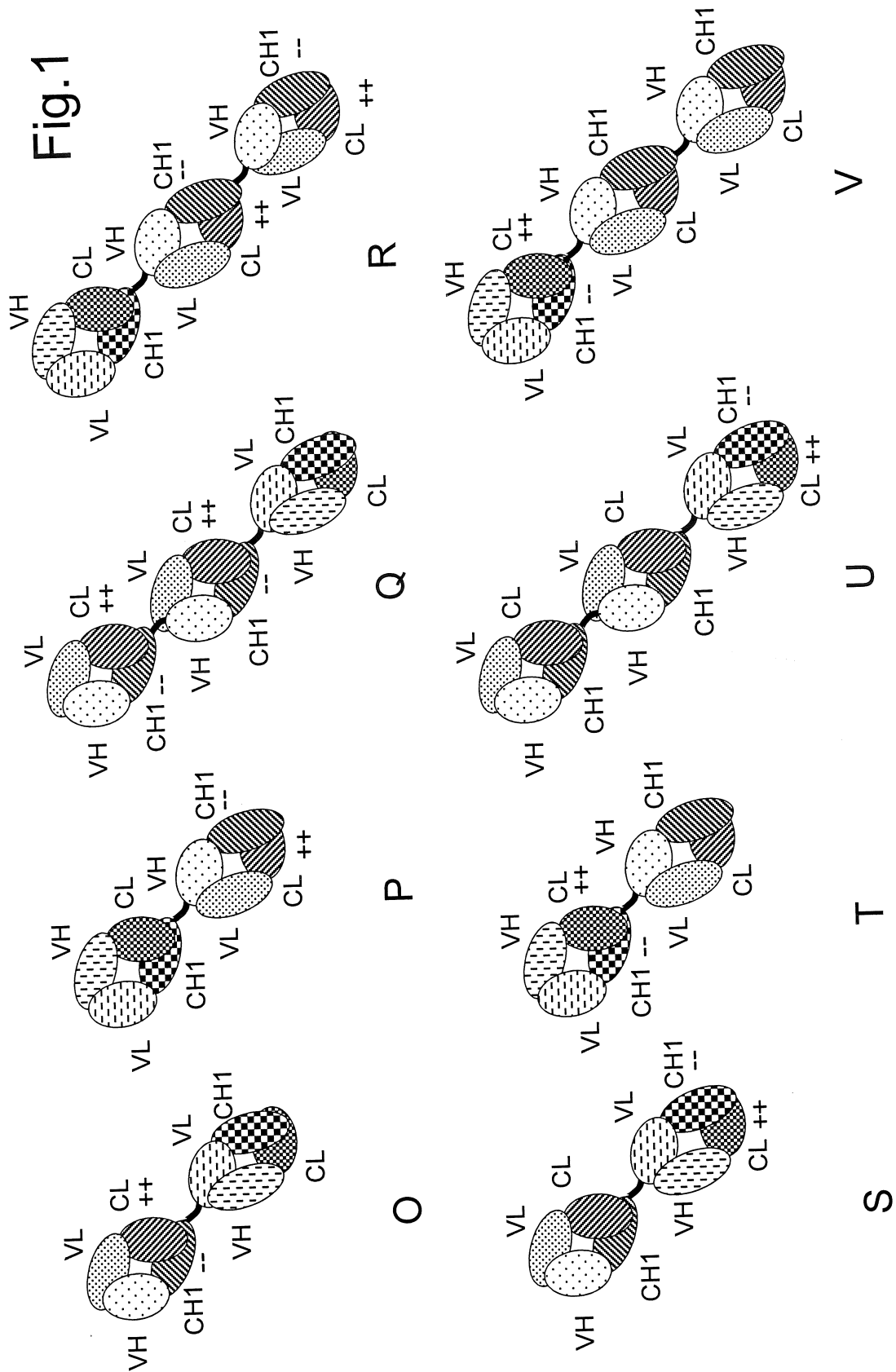
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
 115 120 125
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
 130 135 140
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230





3/73

Fig.1



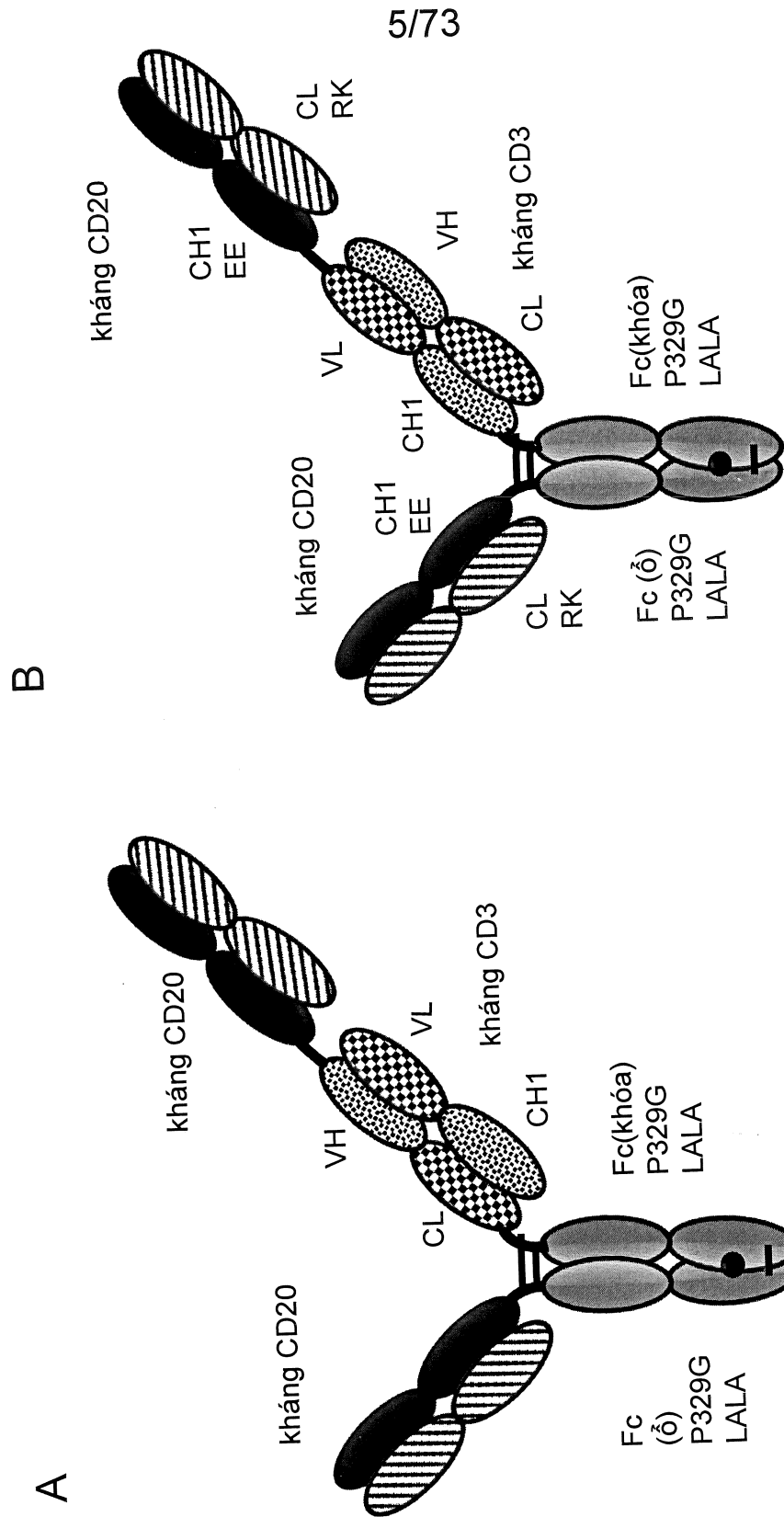


Fig.2

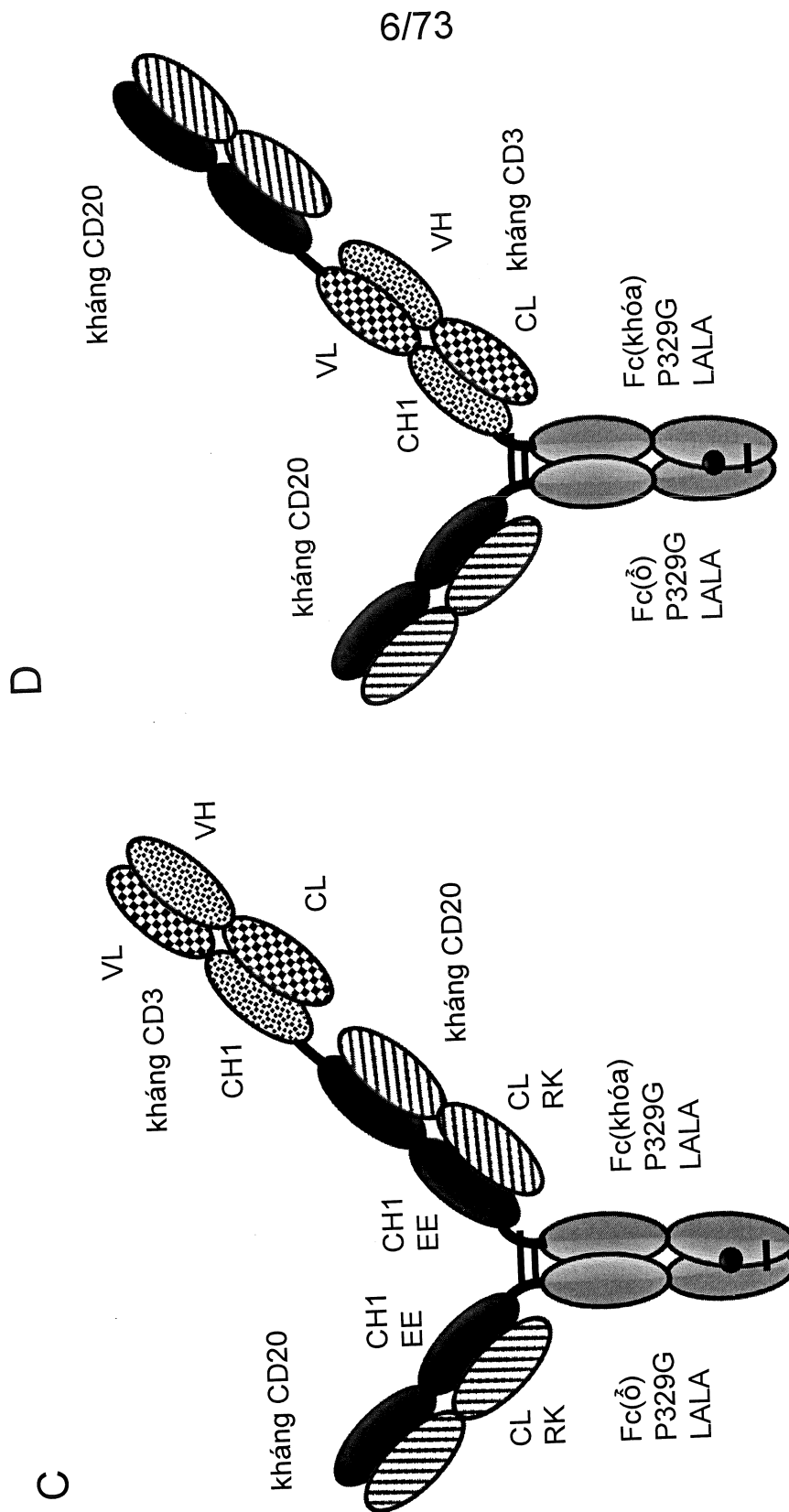


Fig.2

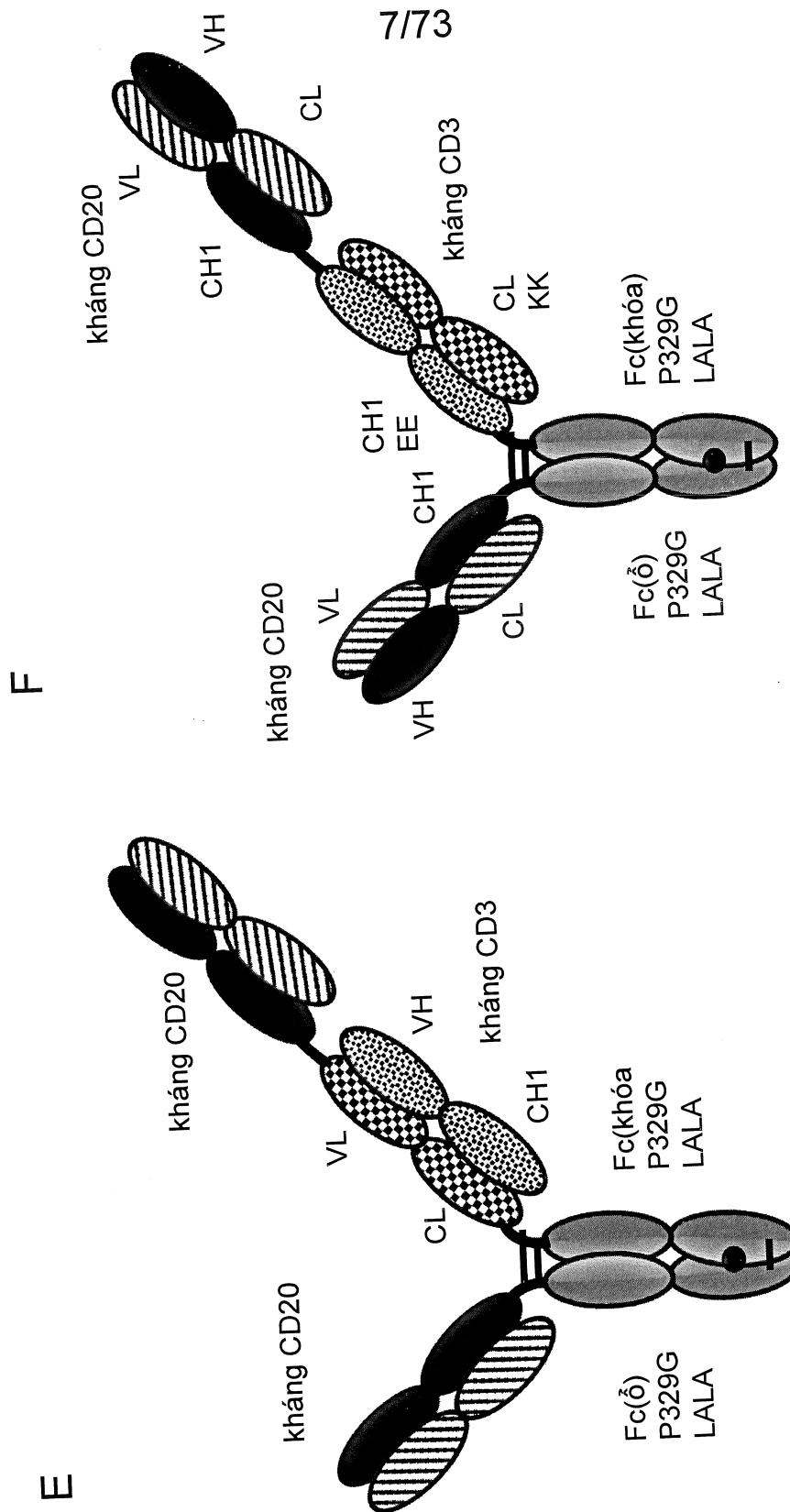


Fig.2

8/73

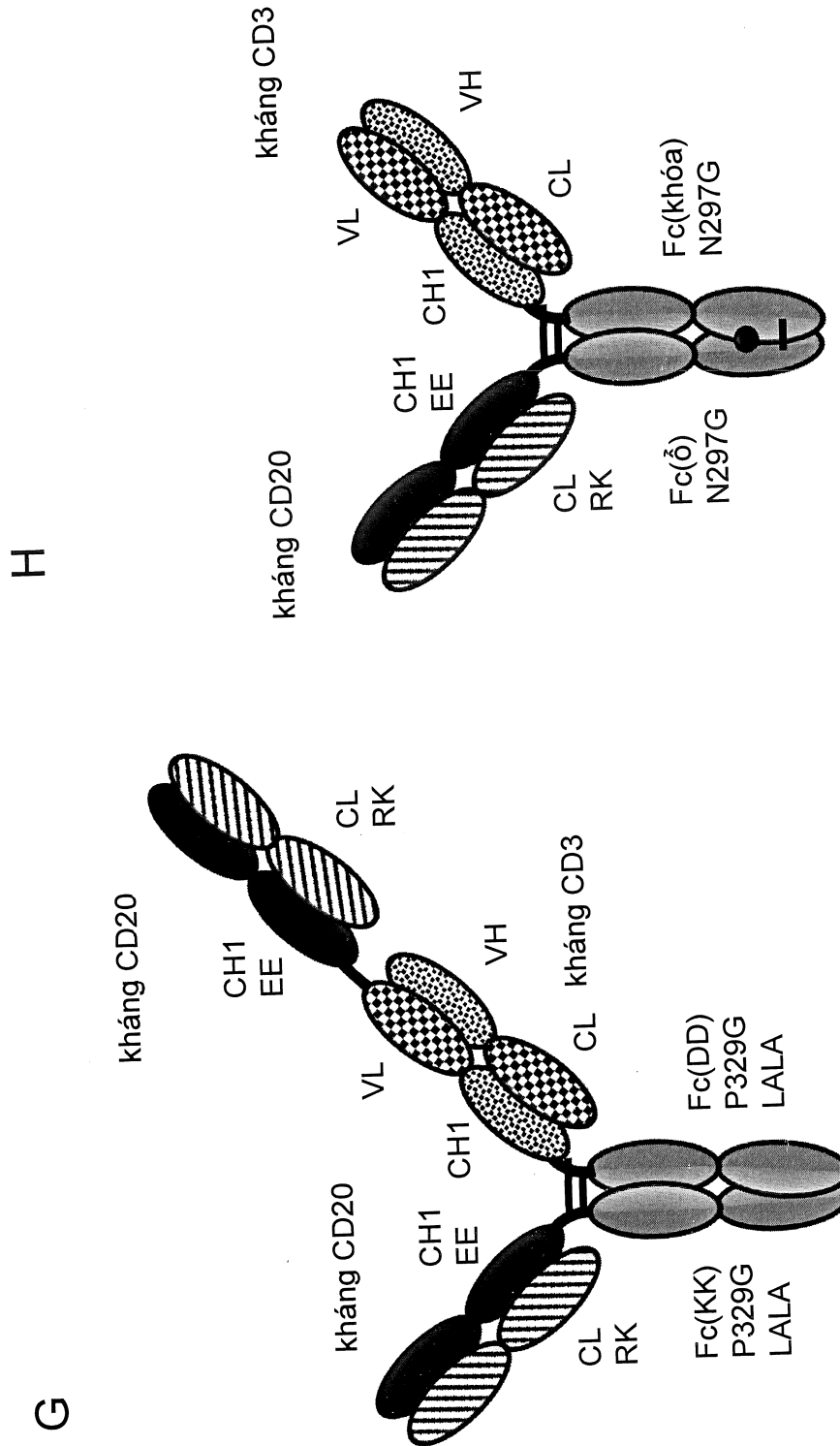


Fig.2

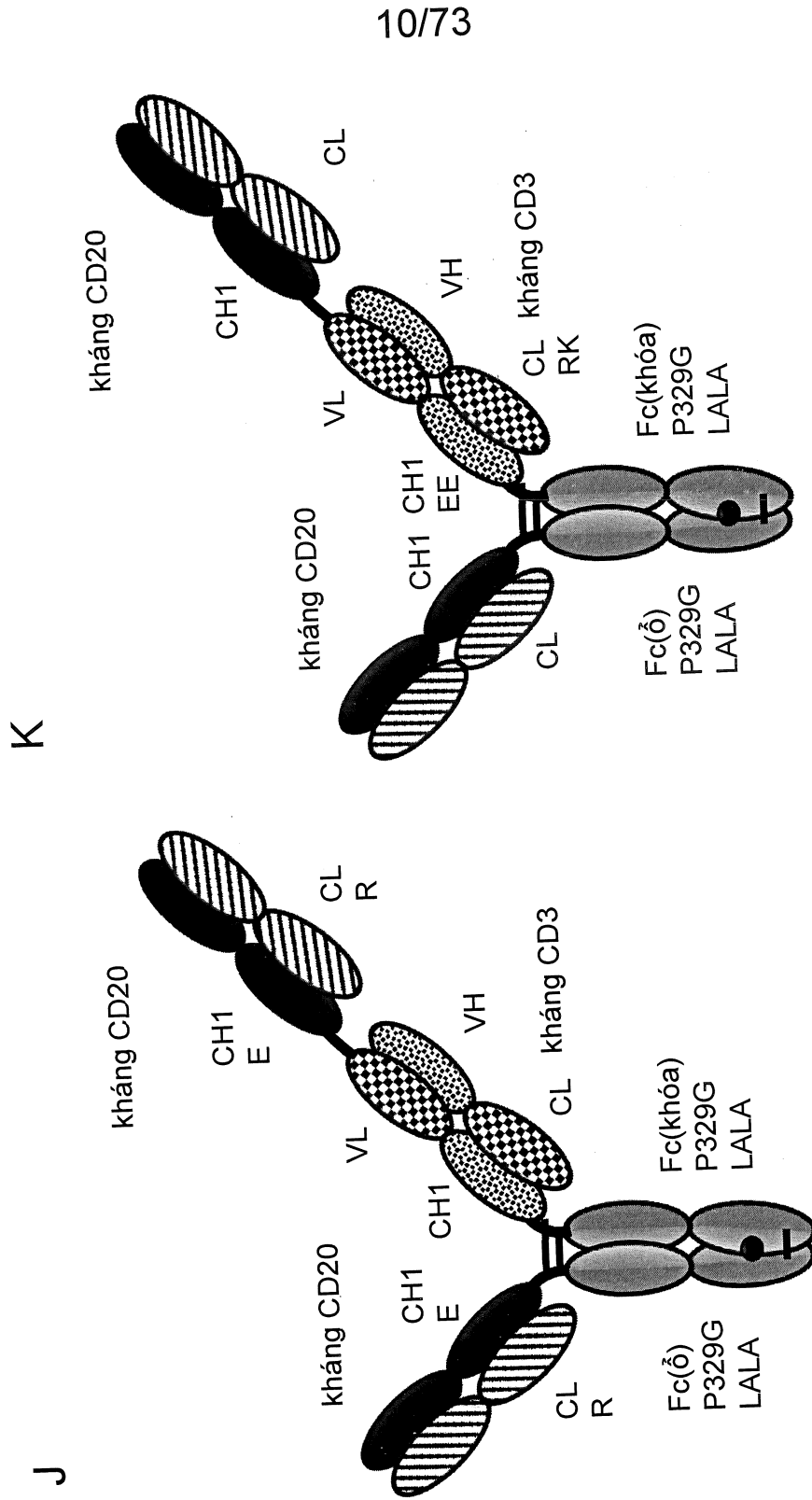


Fig.2

11/73

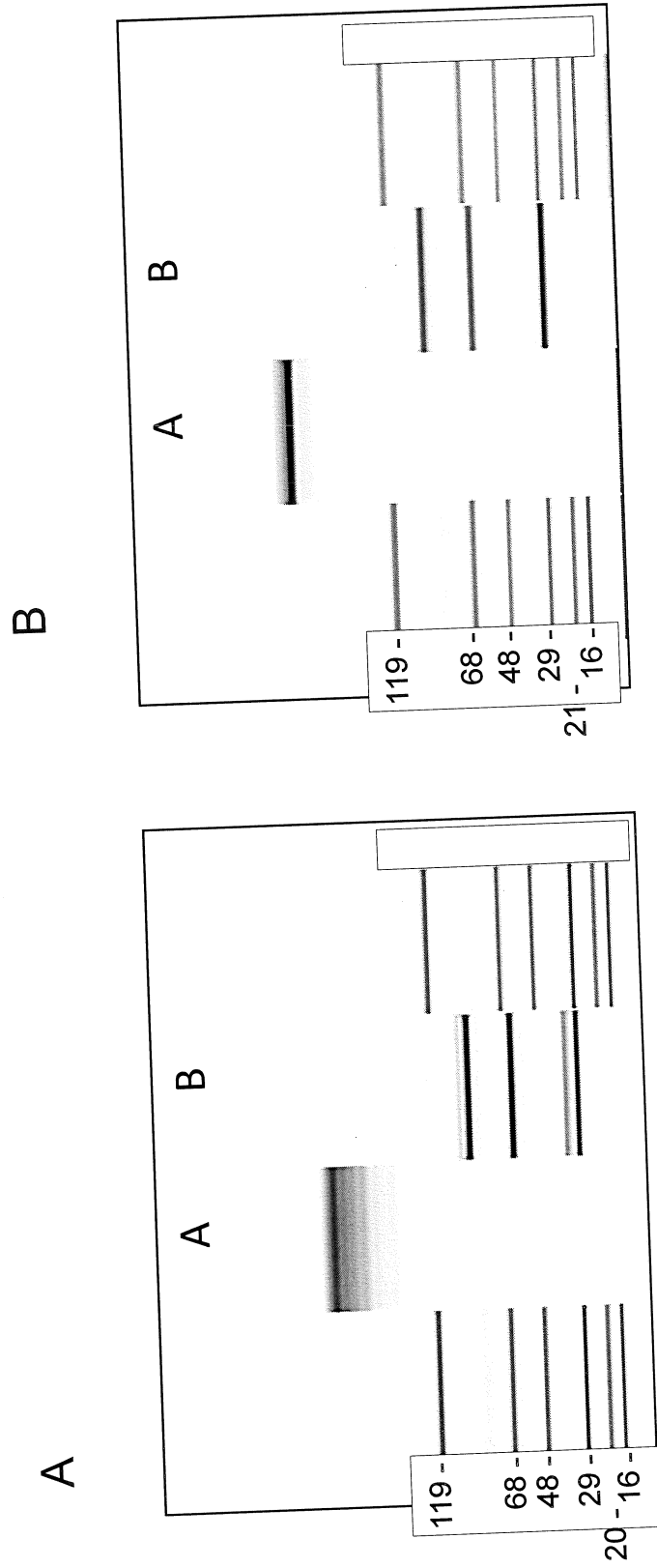


Fig.3

12/73

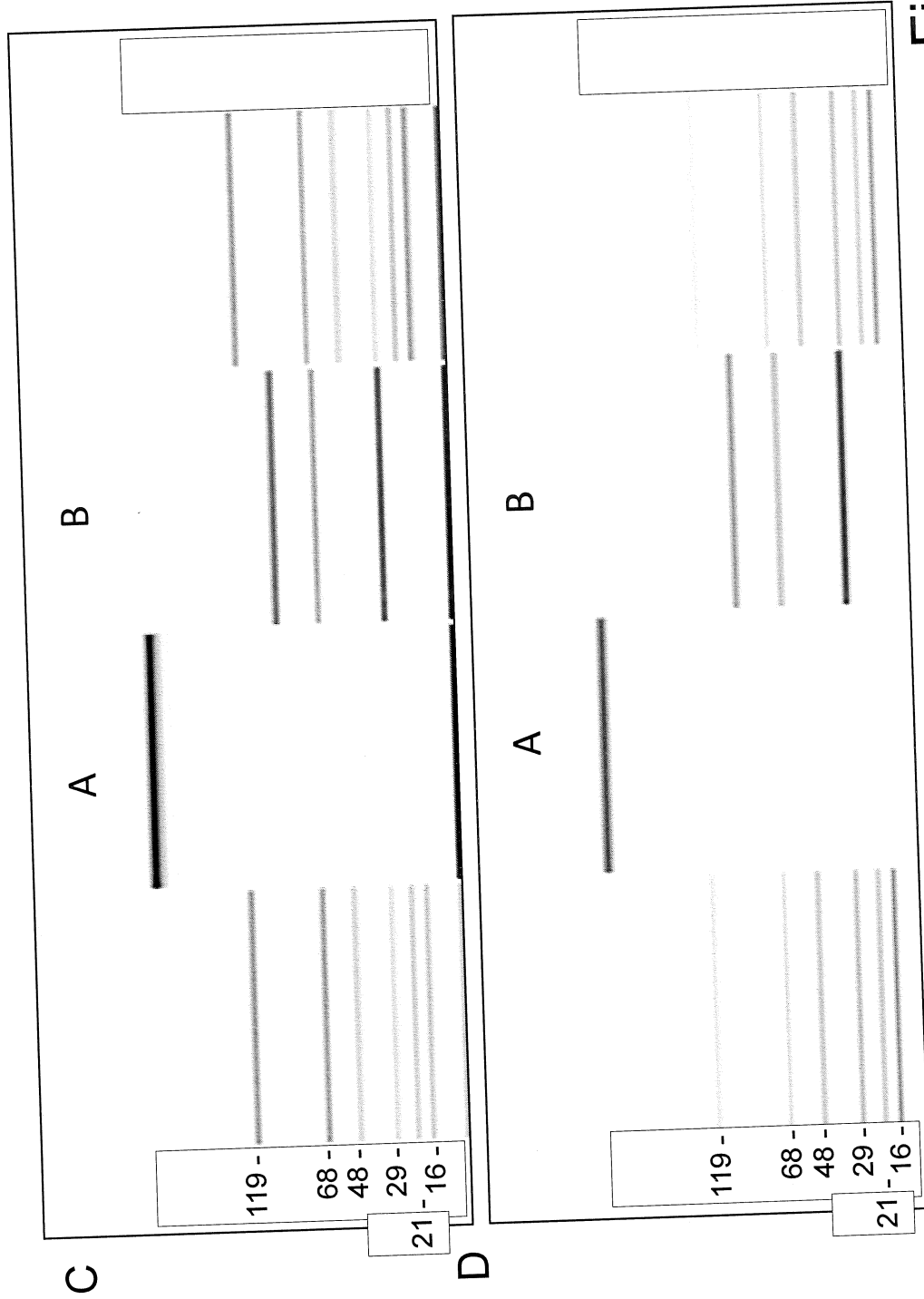


Fig.3

13/73

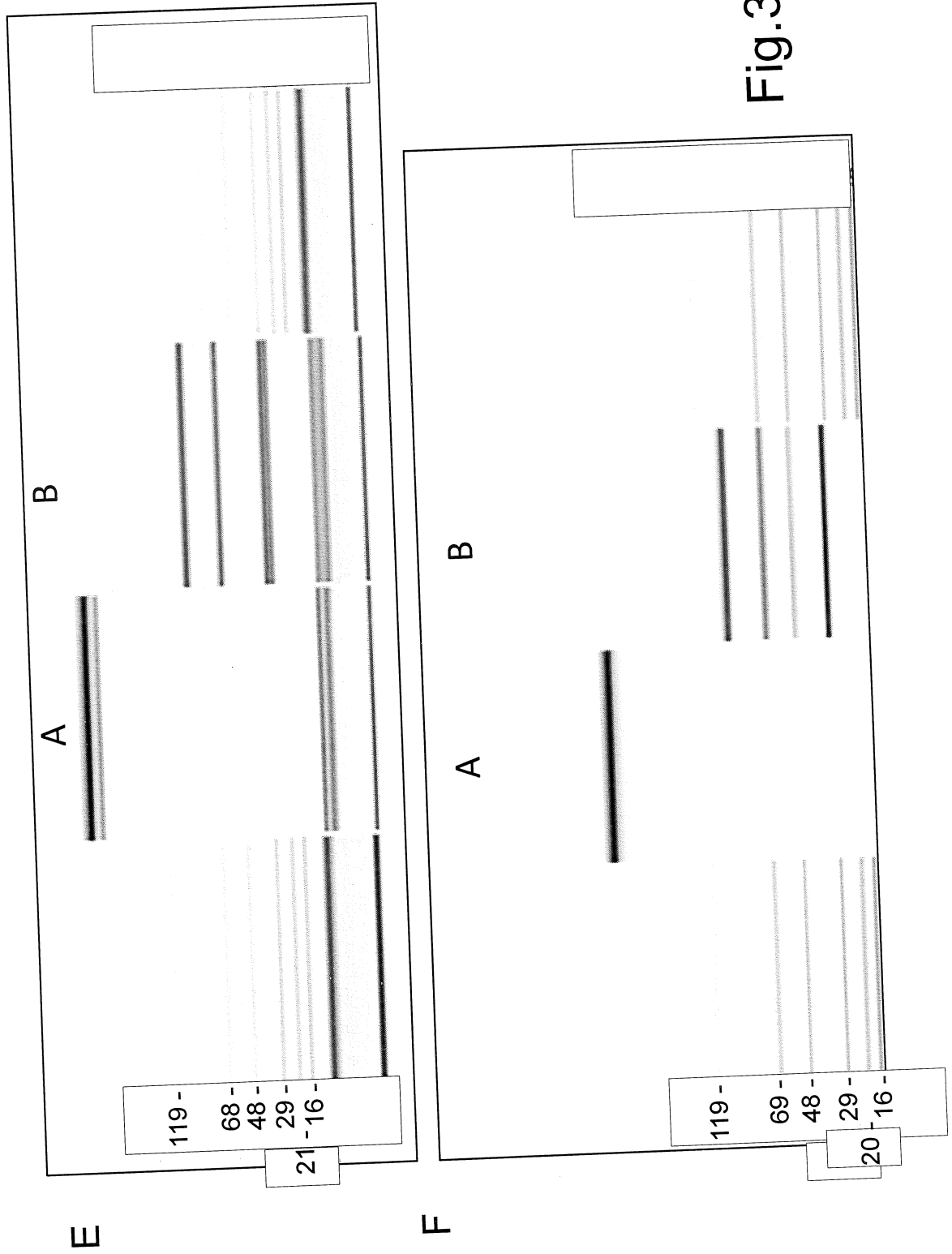


Fig. 3

14/73

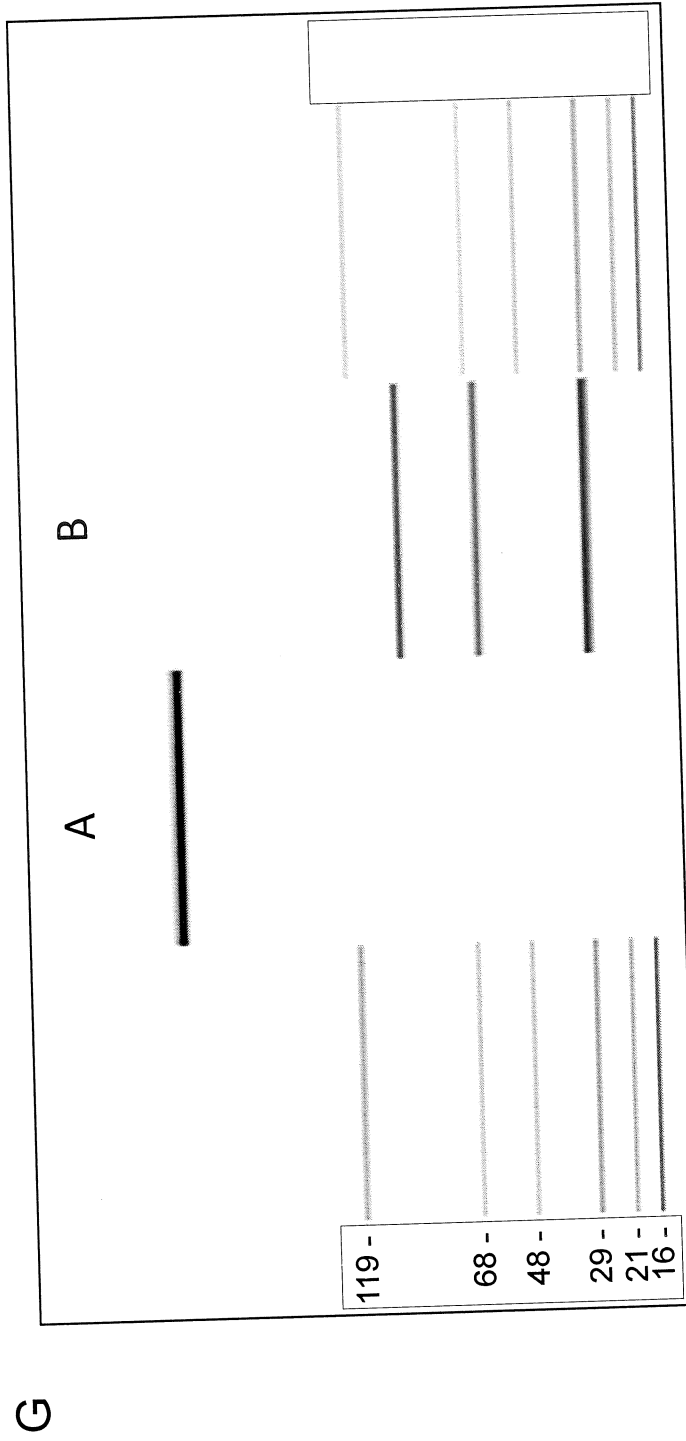


Fig.3

15/73

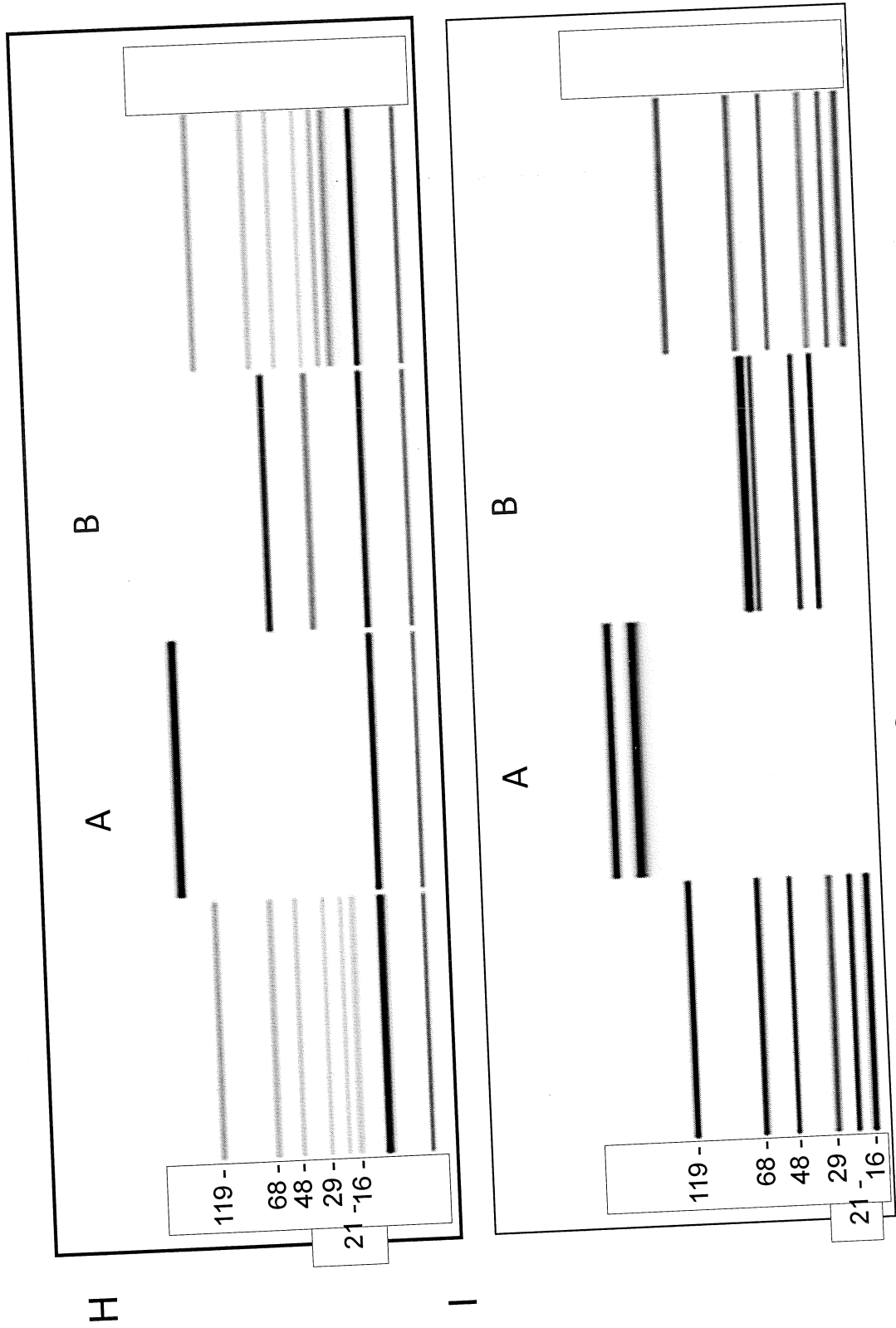


Fig.3

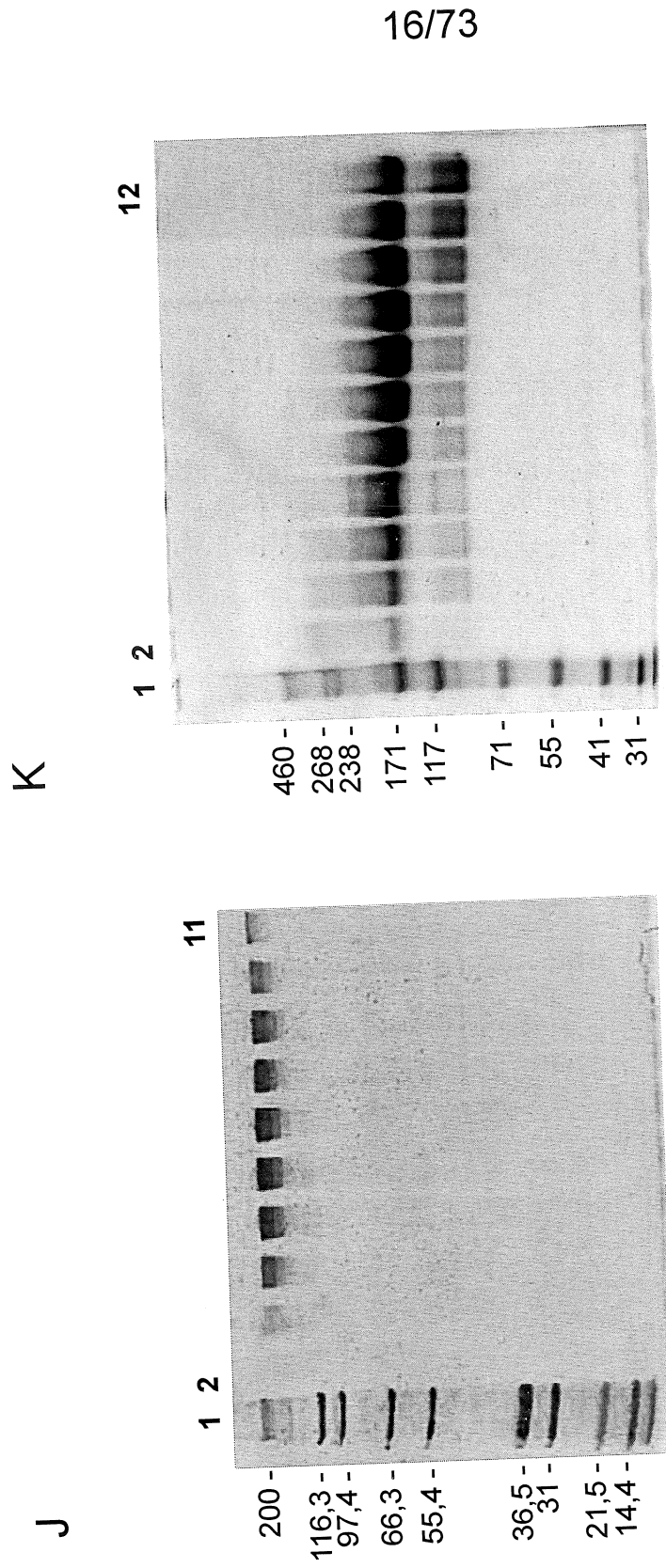


Fig.3

17/73

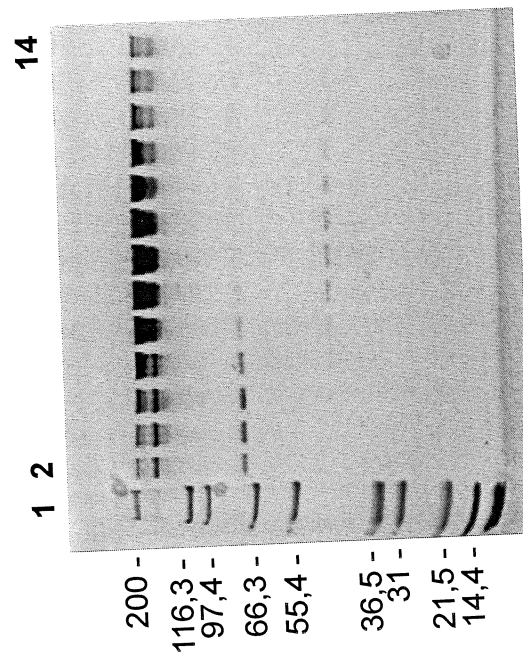


Fig.3

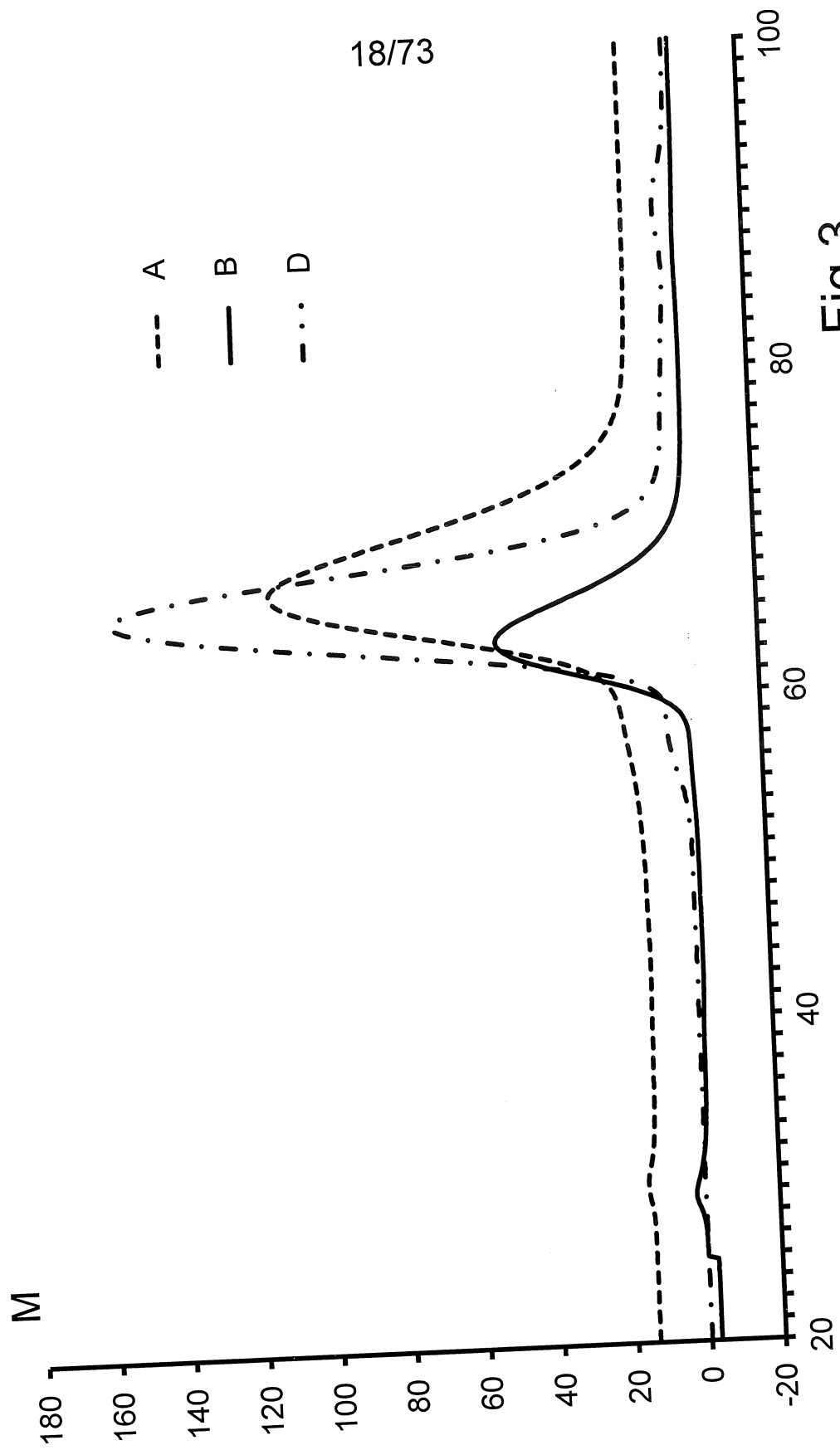


Fig.3

19/73

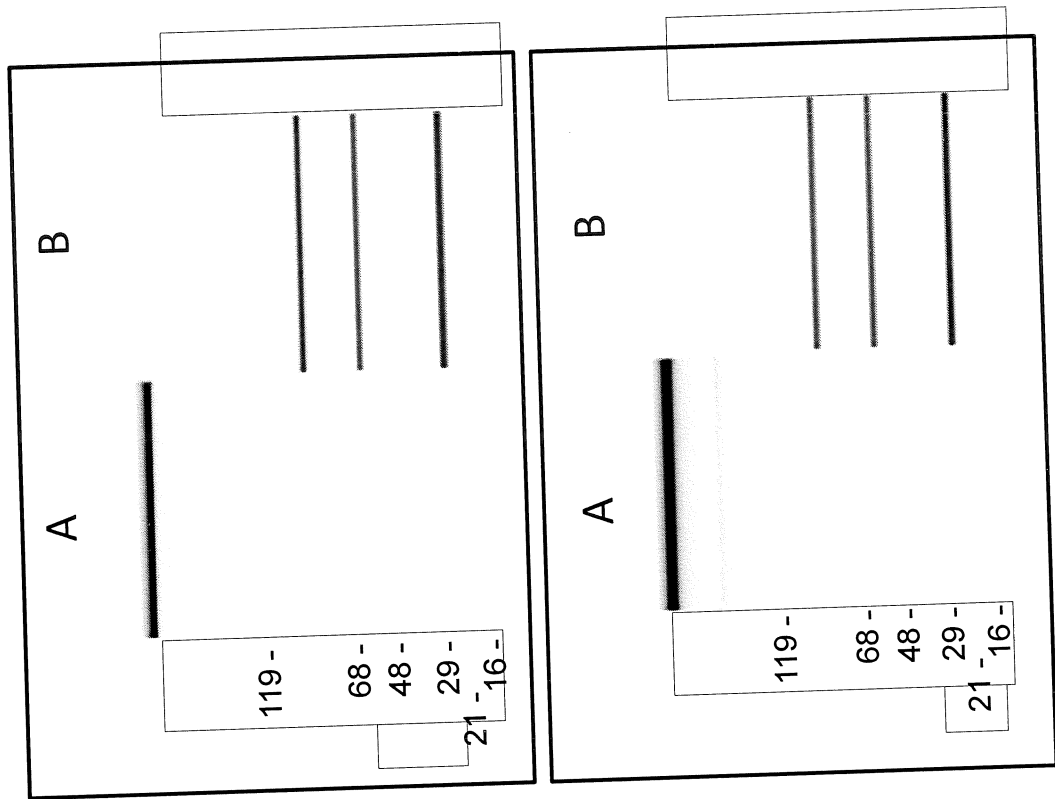


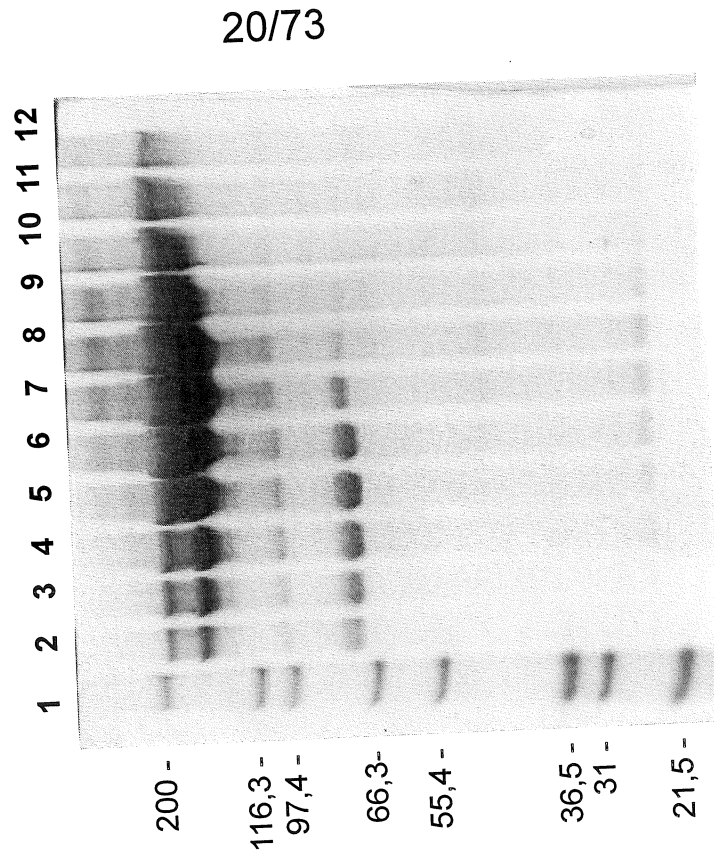
Fig.3

N

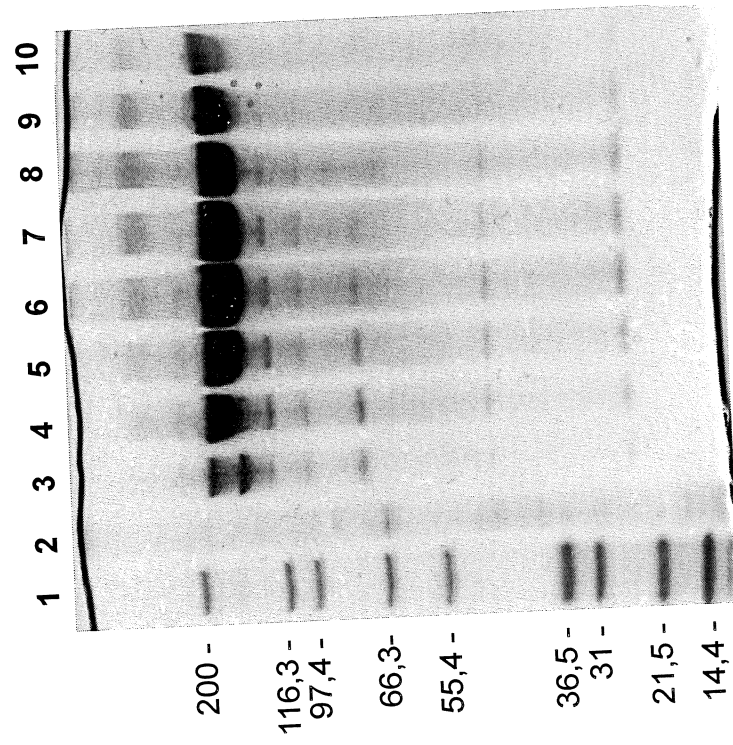
O

Fig.3

Q



P



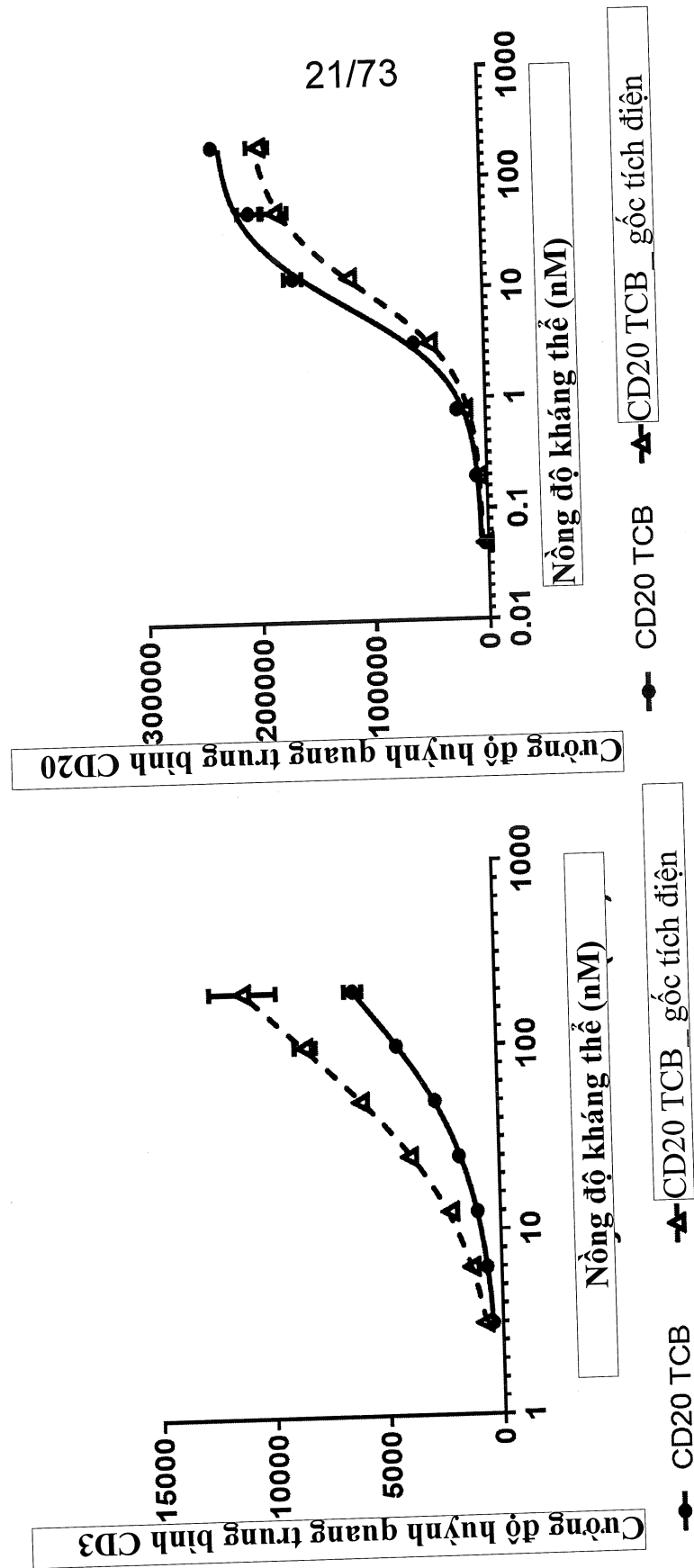


Fig.4

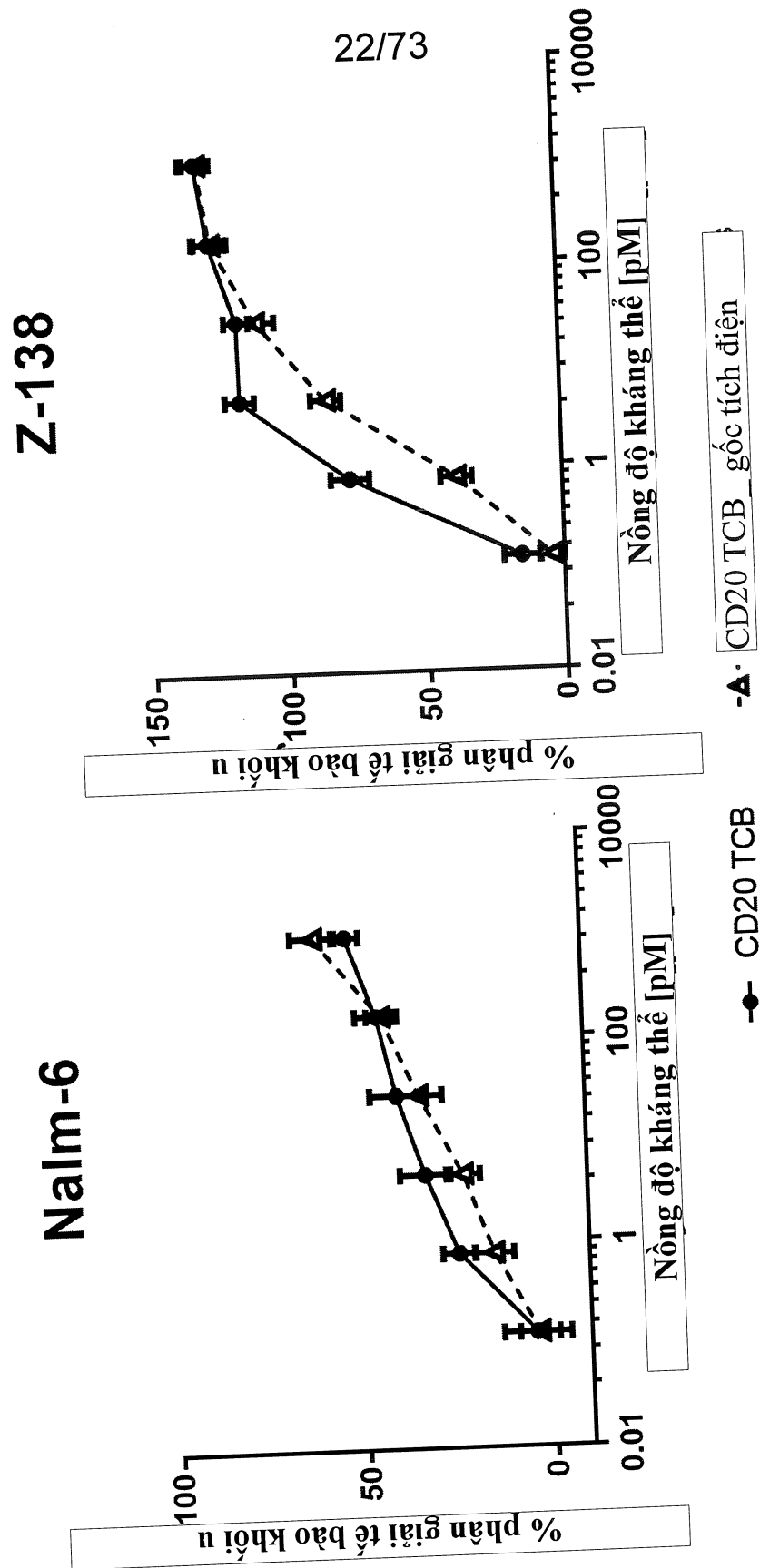
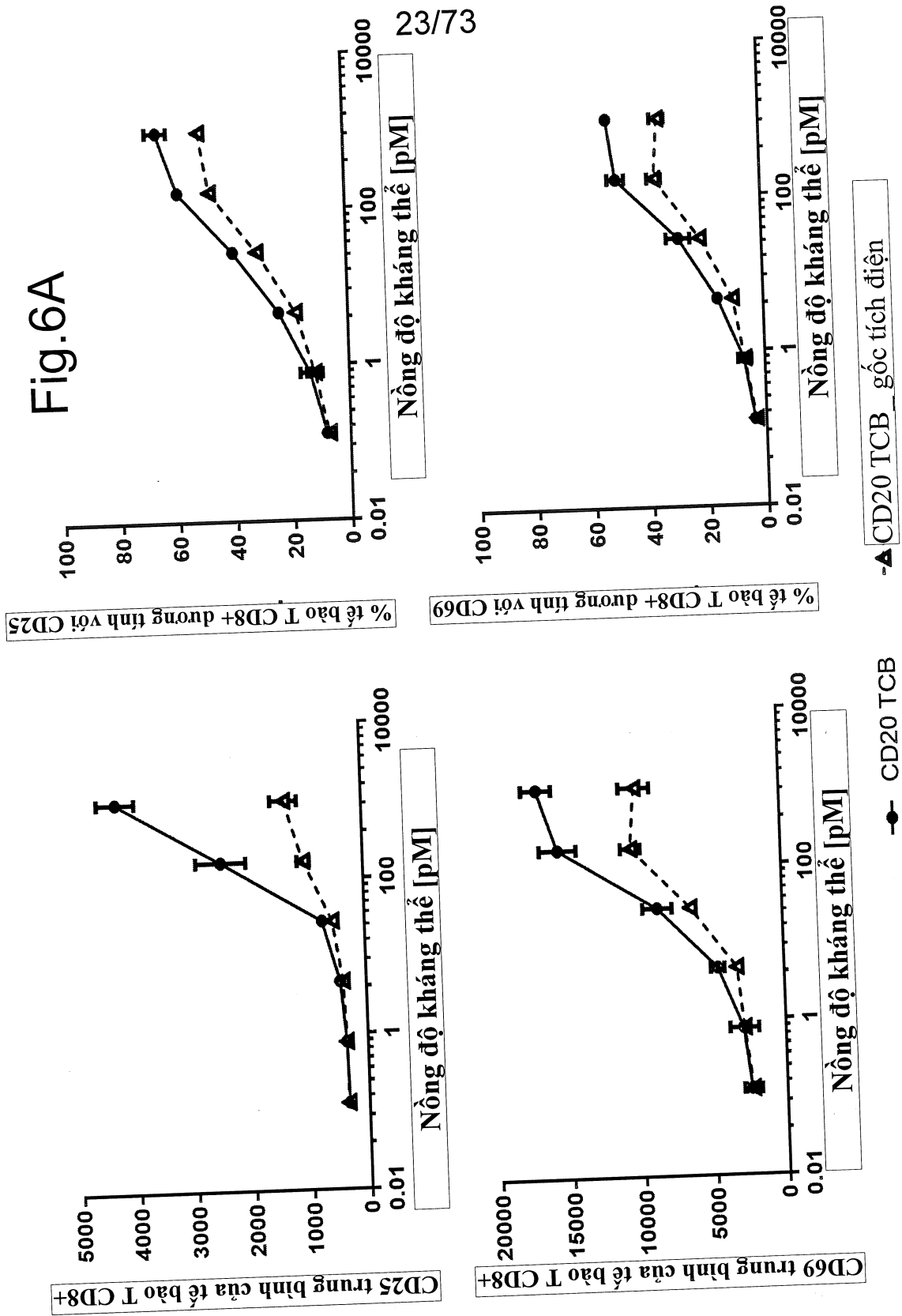
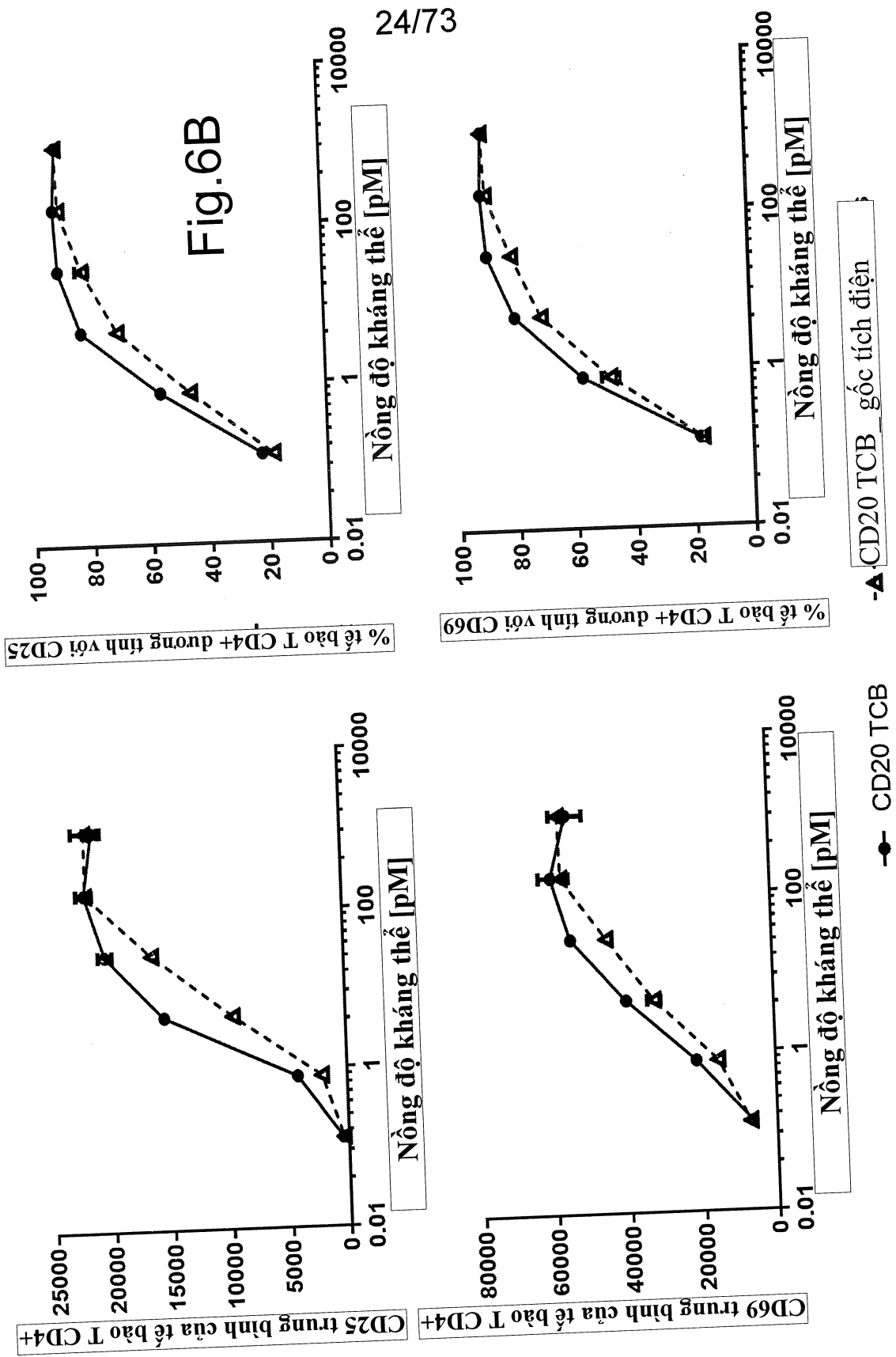
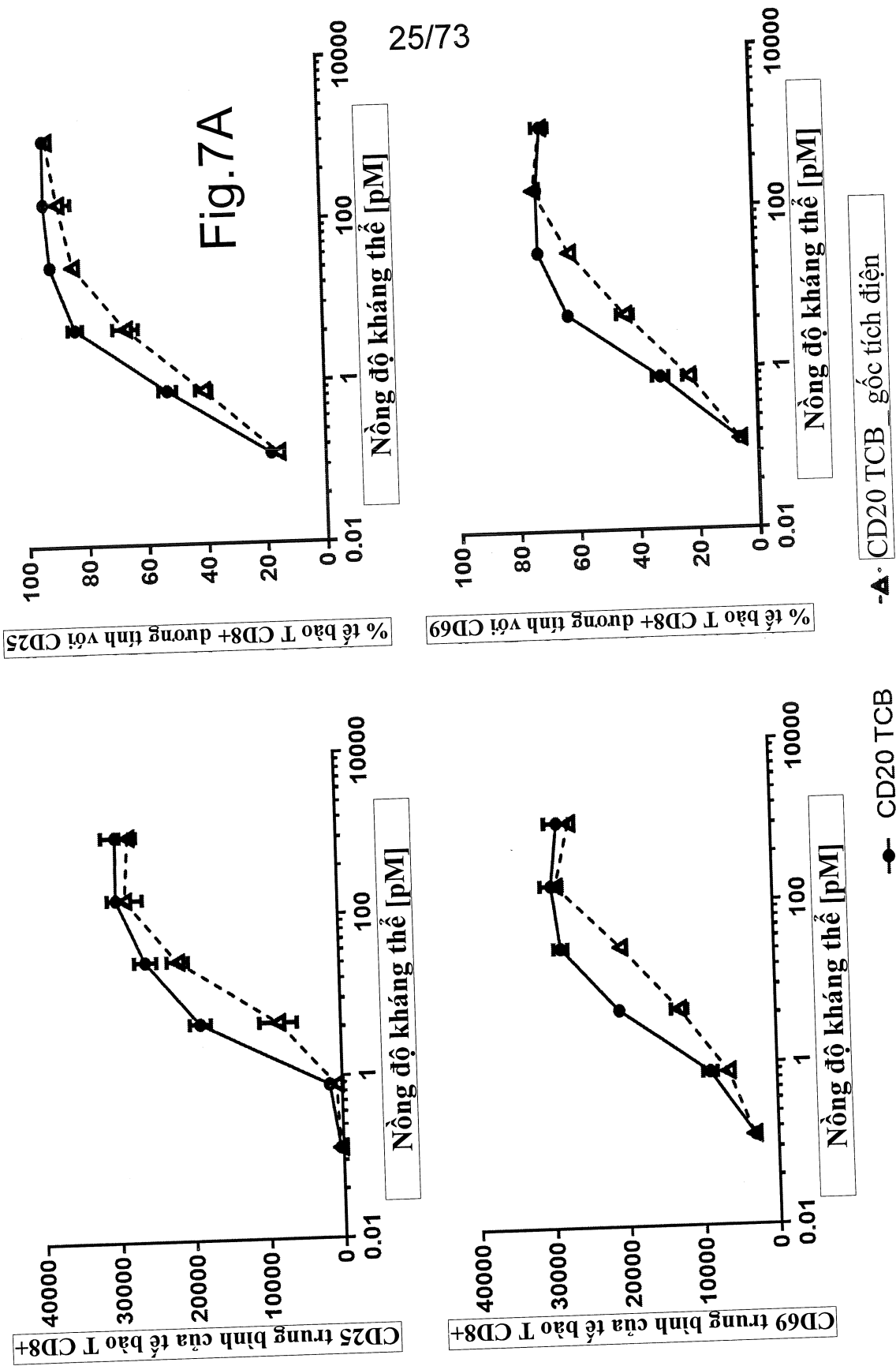


Fig.5

Fig.6A

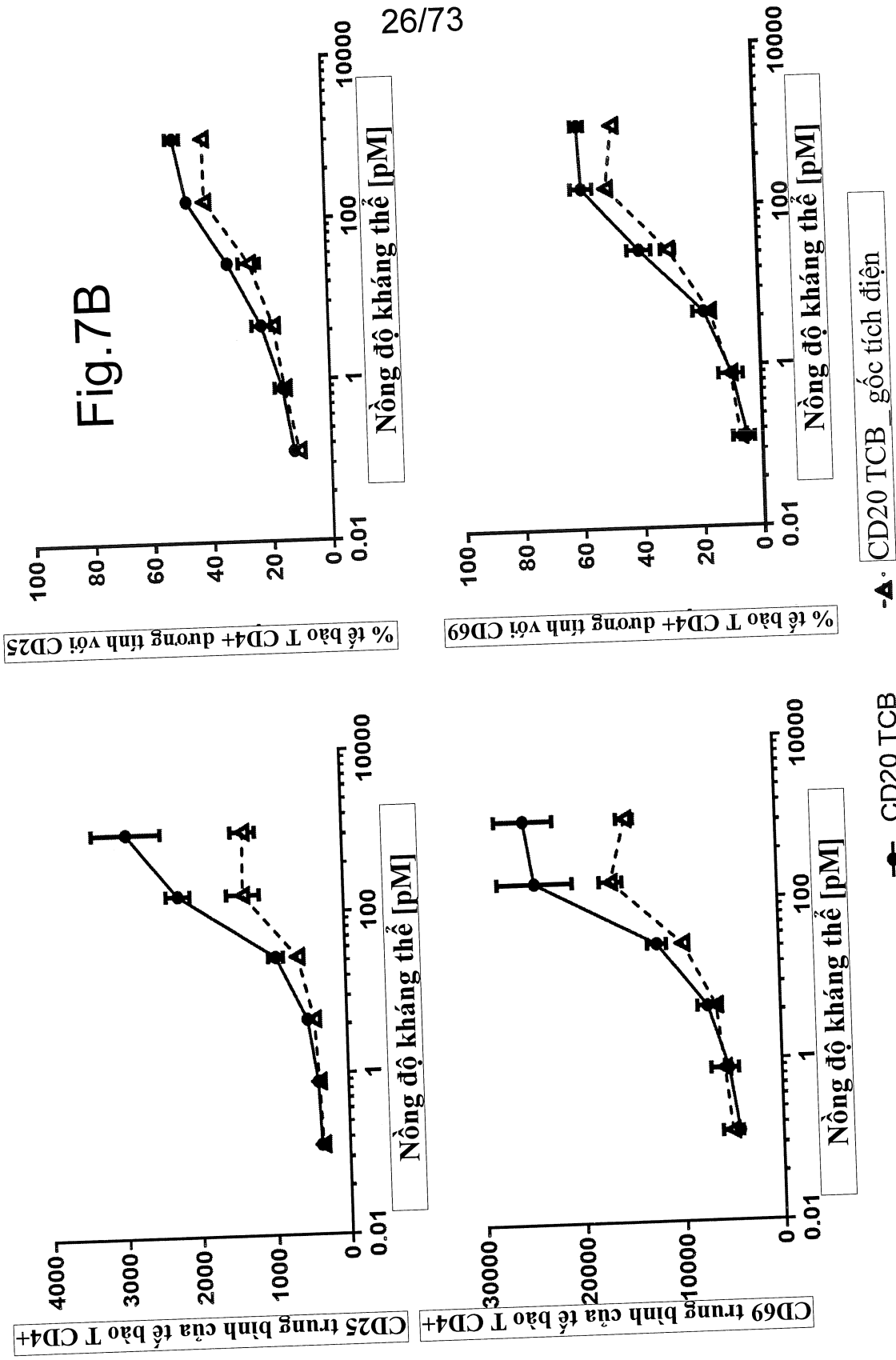






26/73

Fig.7B



27/73

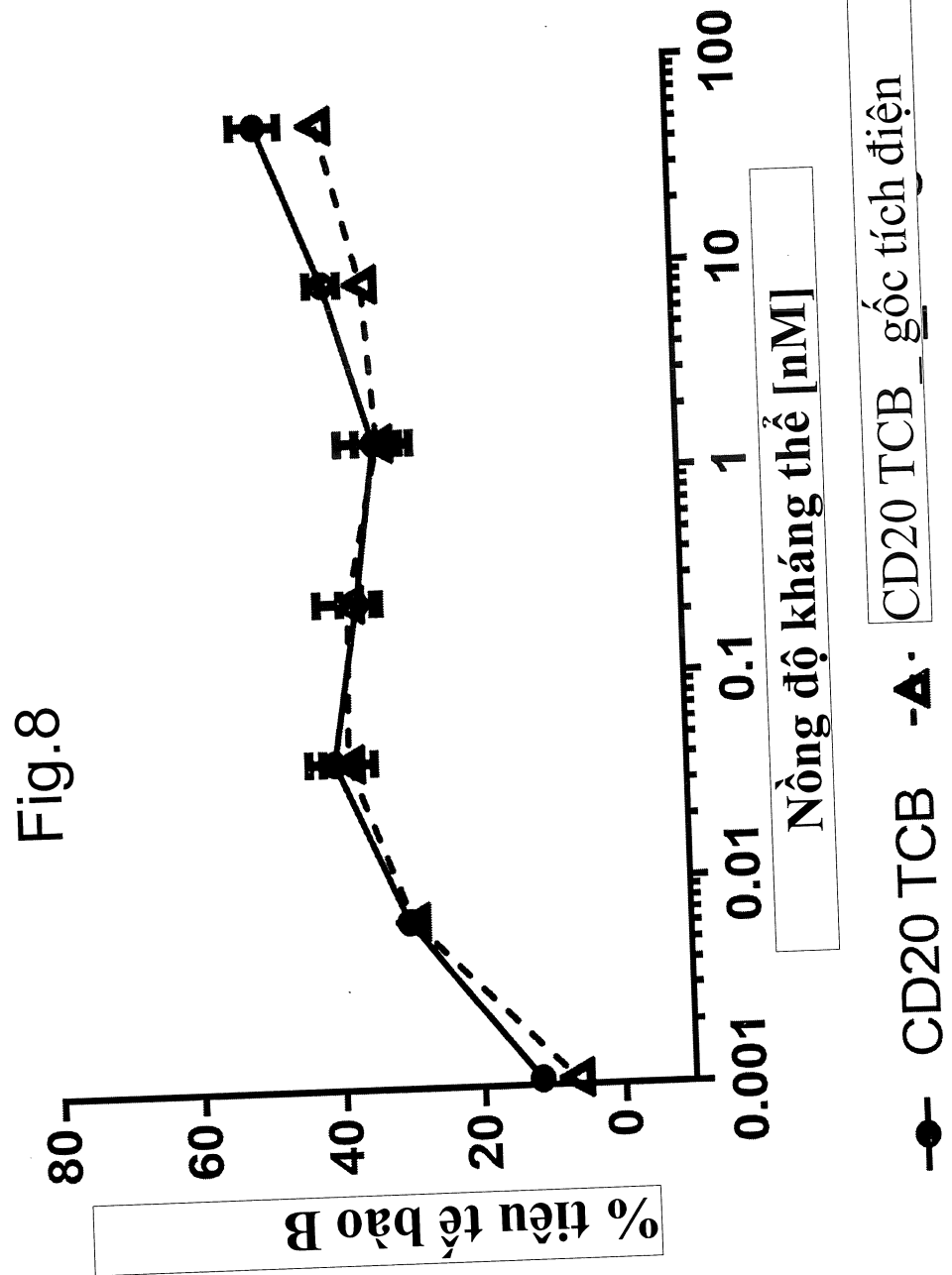
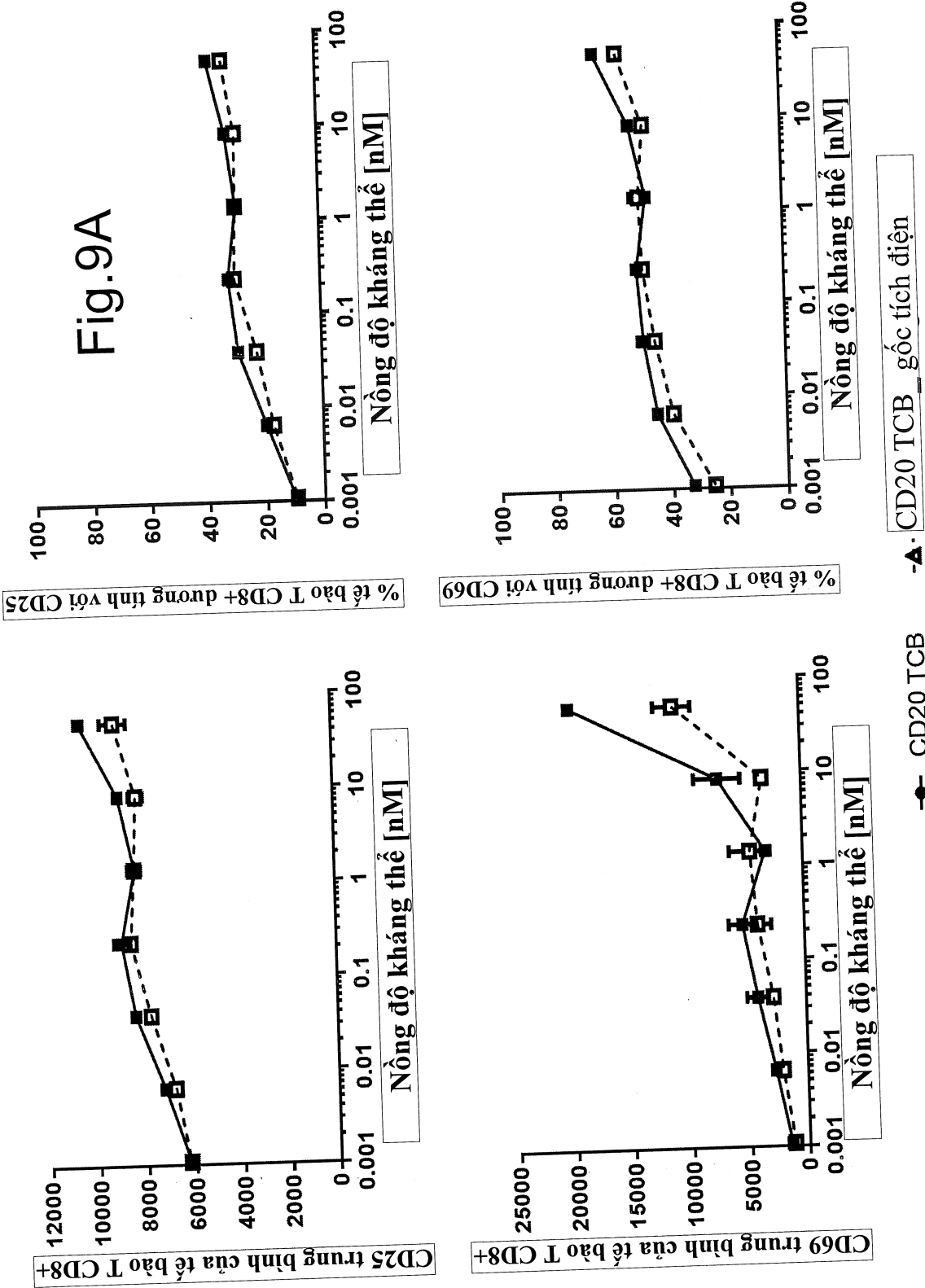


Fig.9A



29/73

Fig.9B

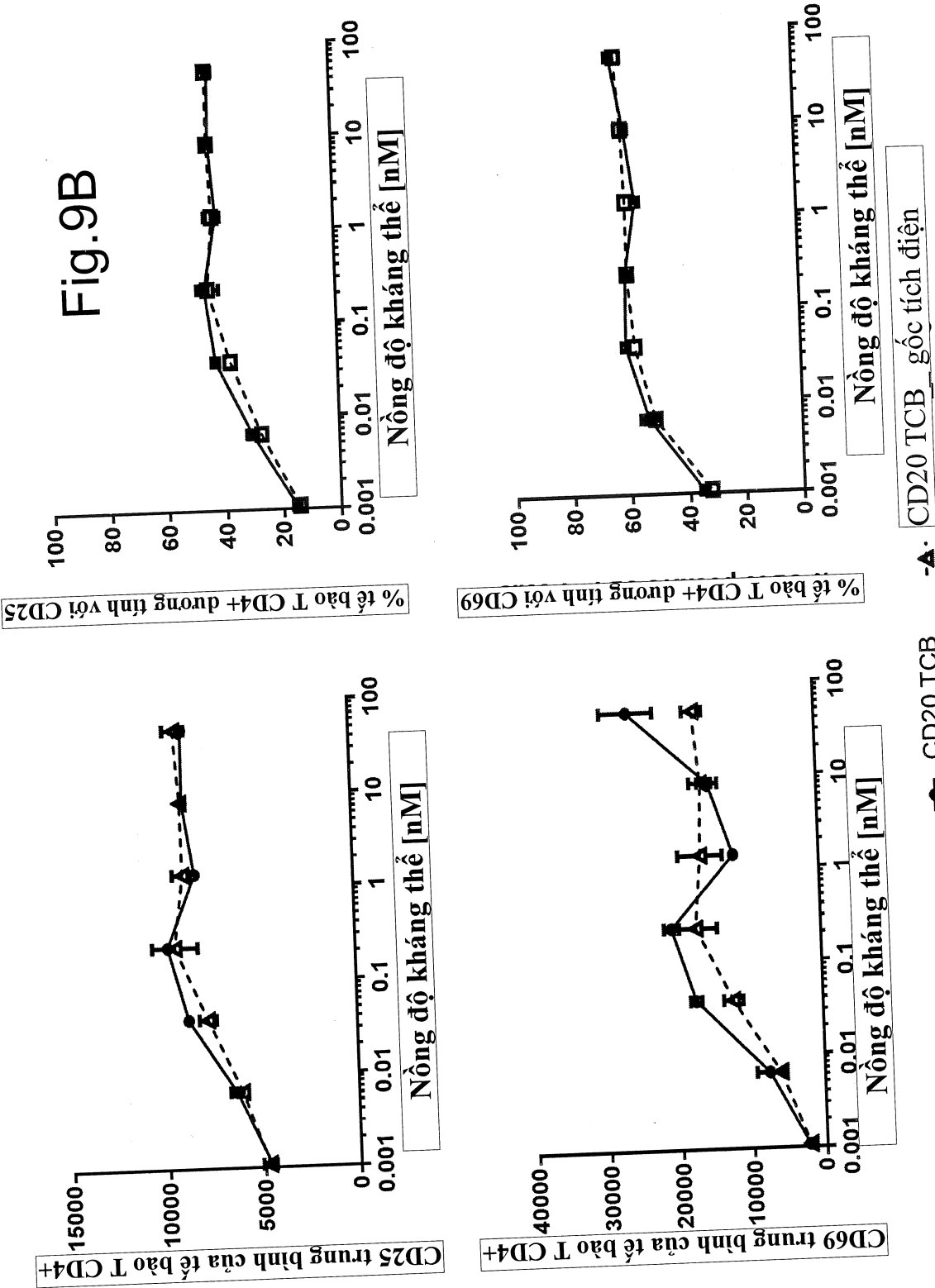
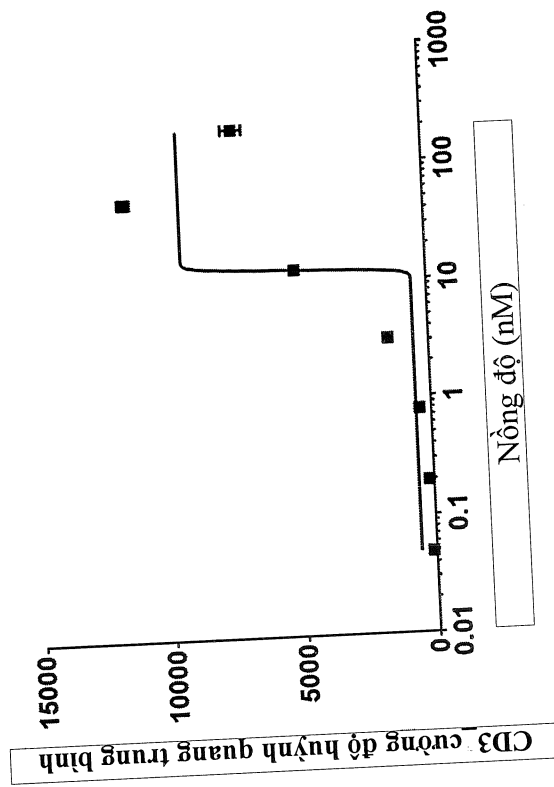
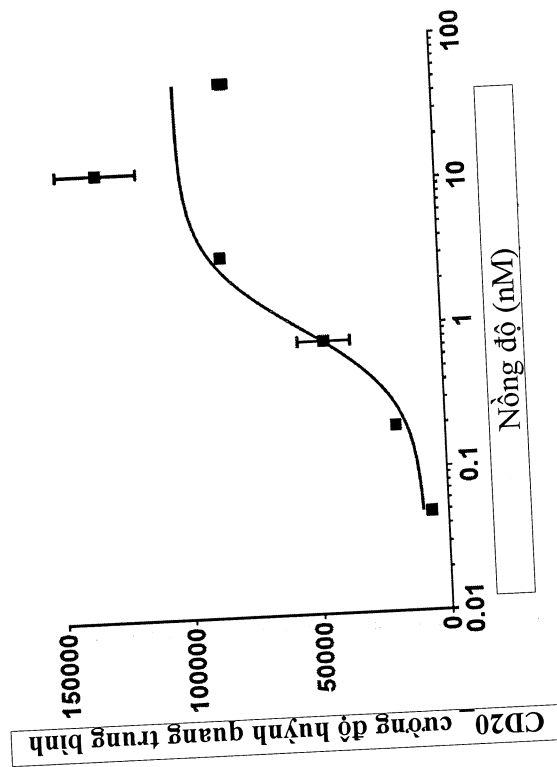


Fig.10

B



A



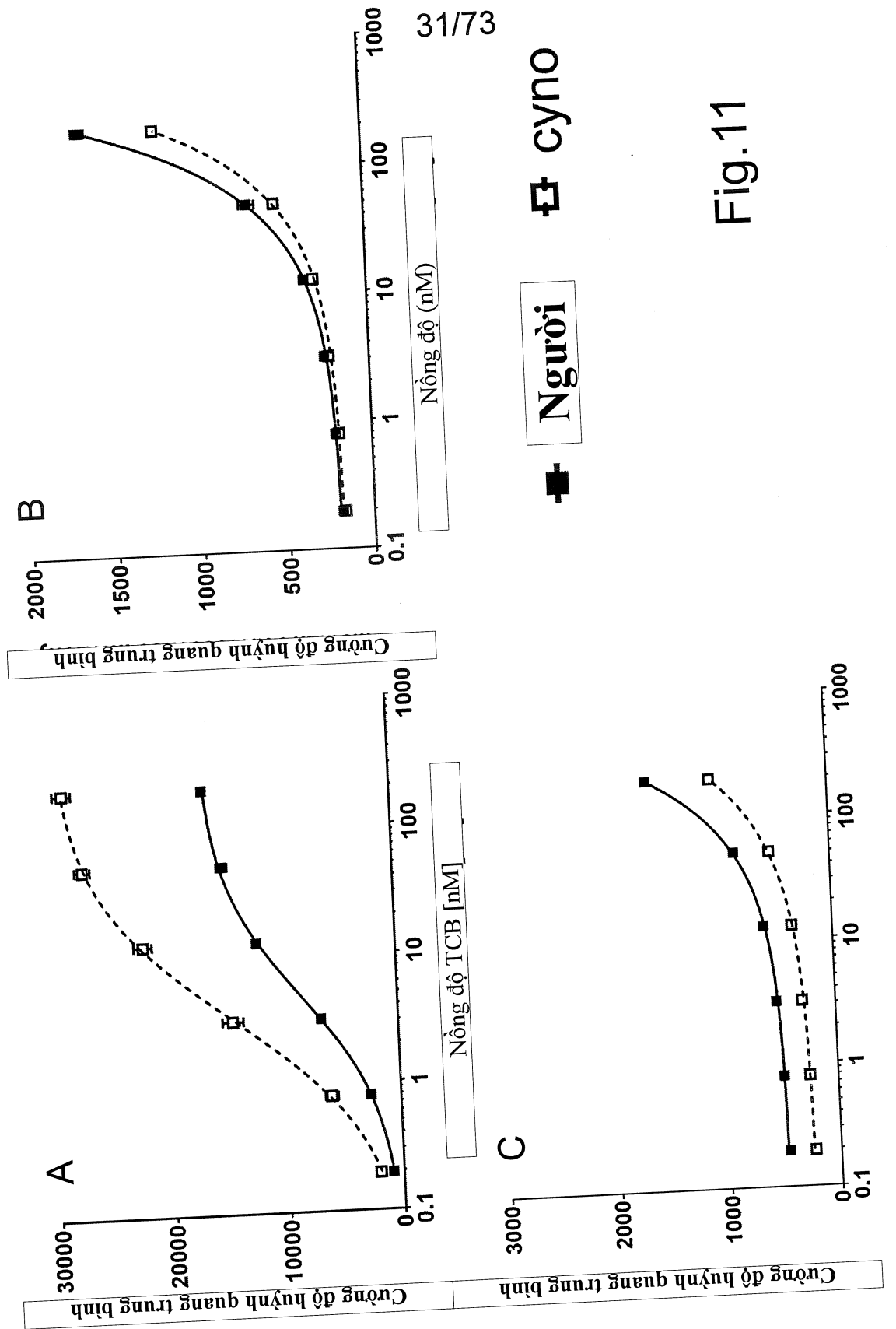


Fig.11

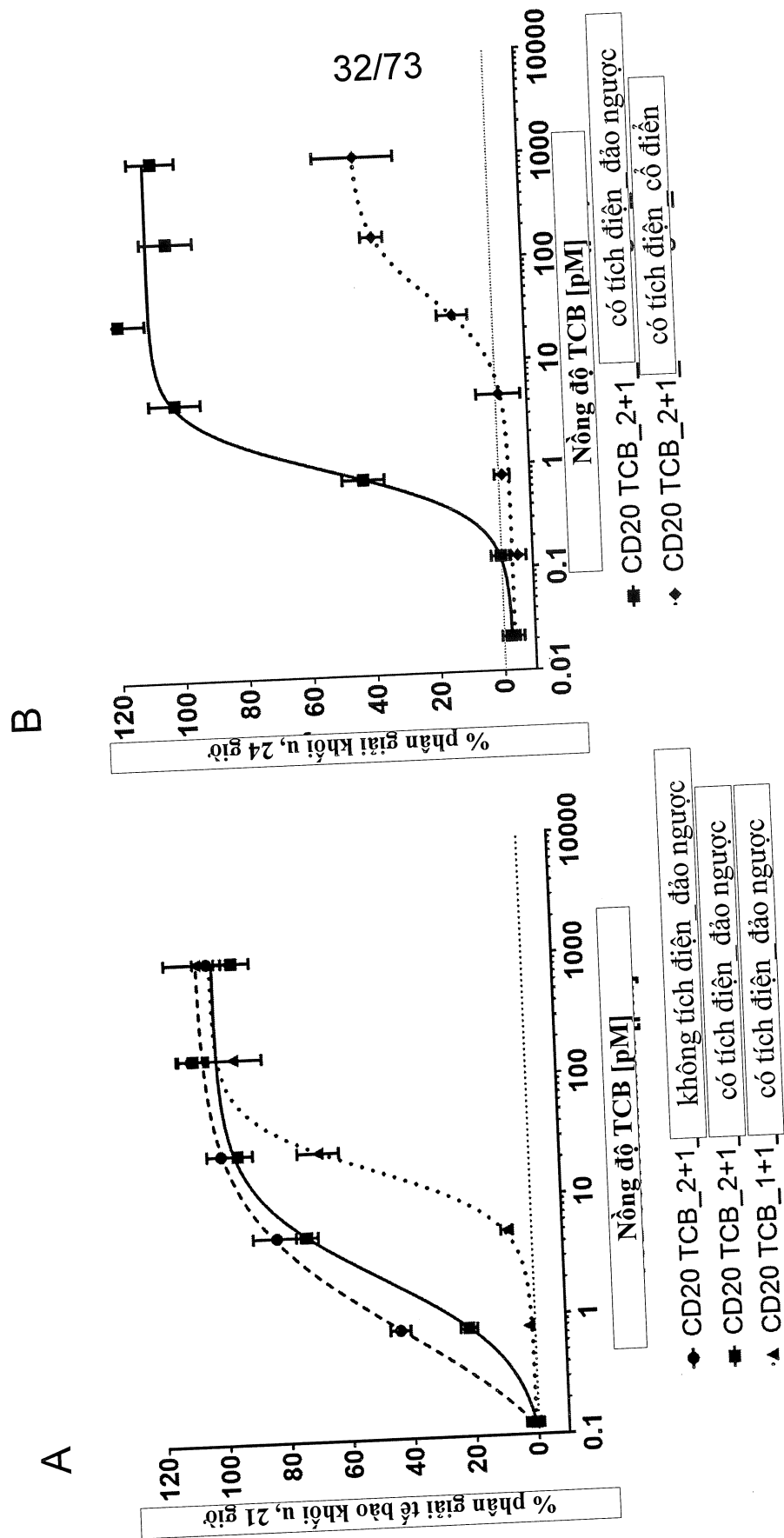
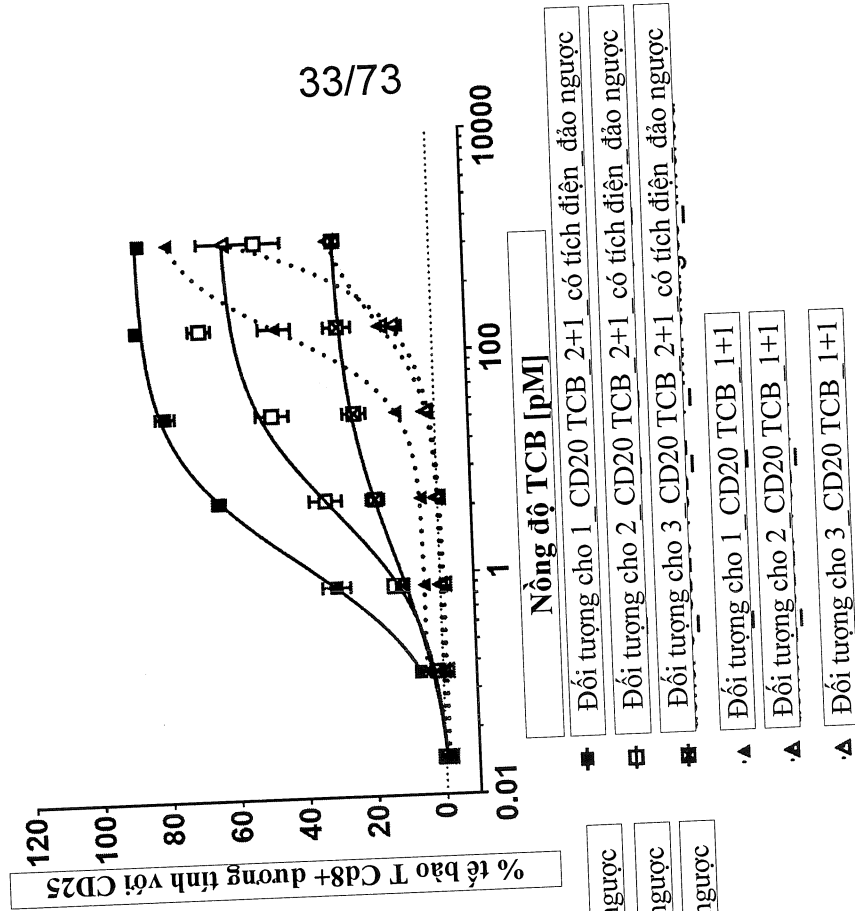


Fig.12

Fig.13

B



A

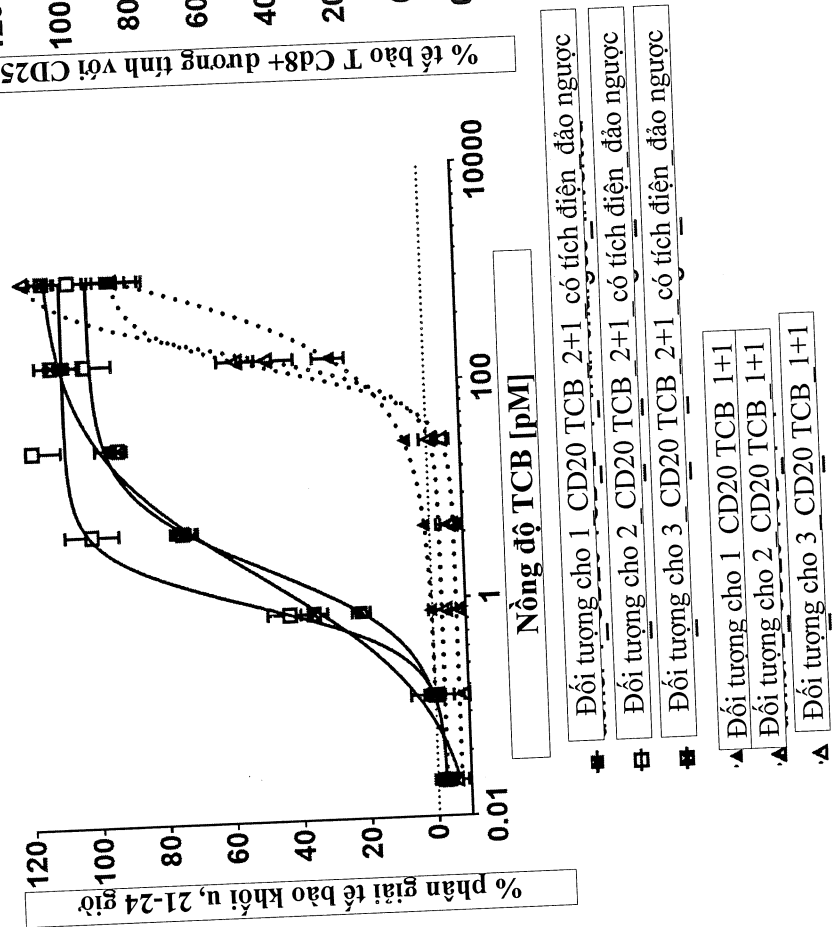
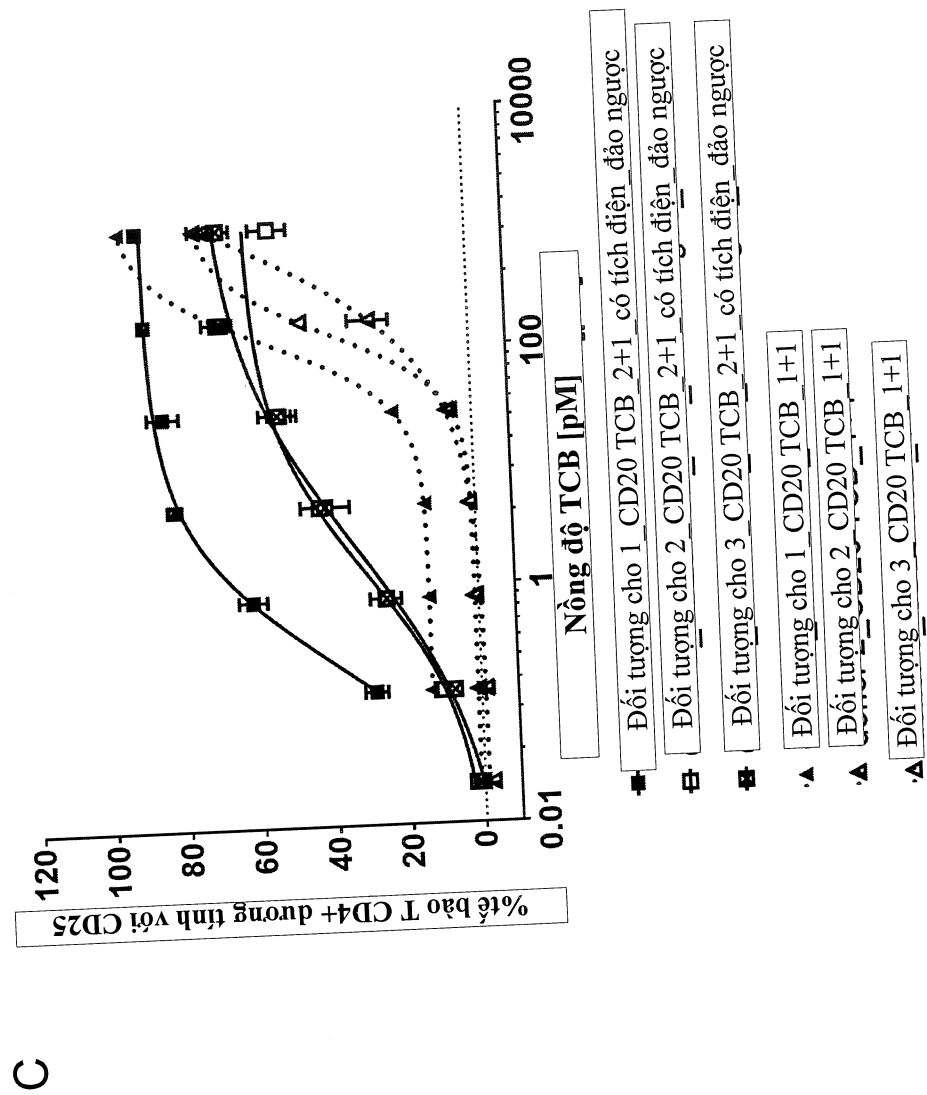
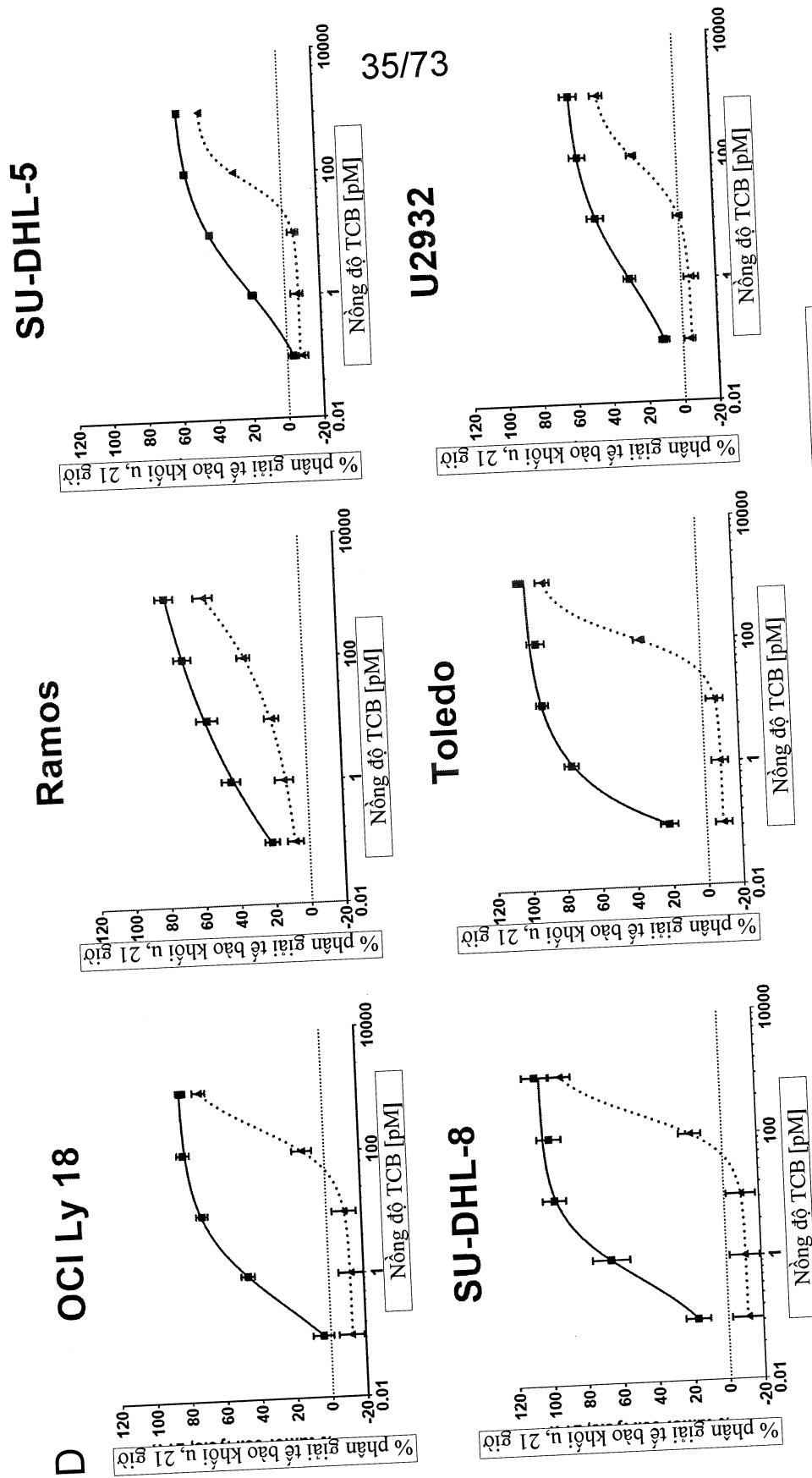


Fig.13





$\blacksquare$ CD20 TCB_2+1 có tích điện đảo ngược

$\blacktriangle$ CD20 TCB_1+1

Fig.13

Fig.14

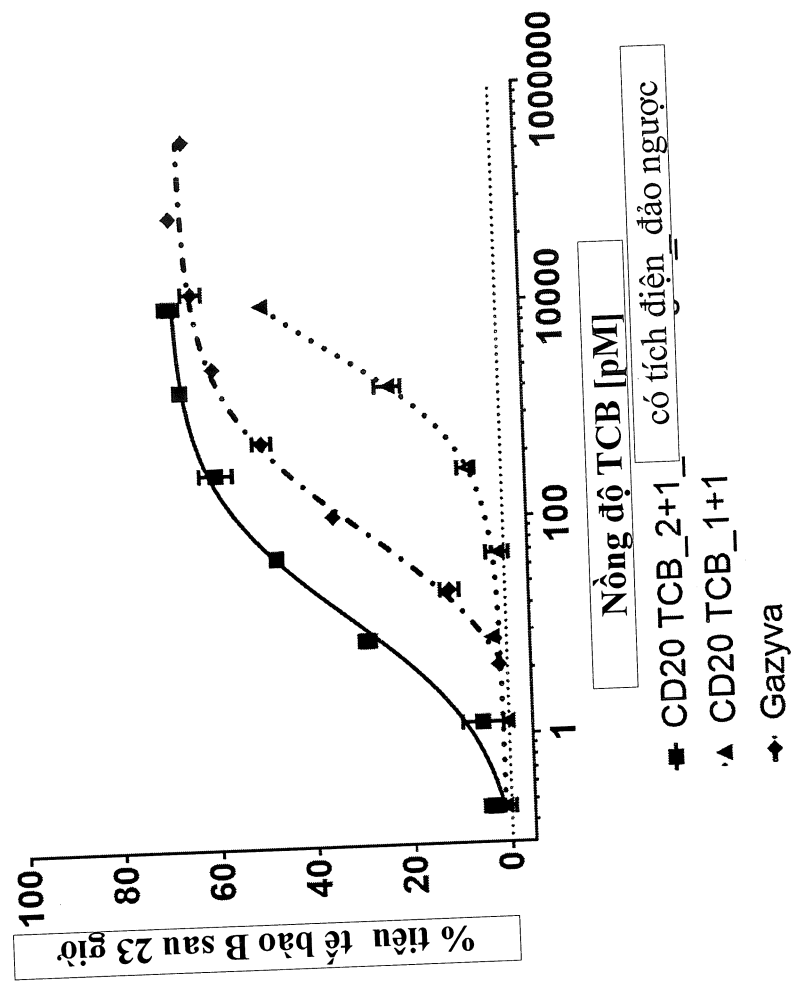
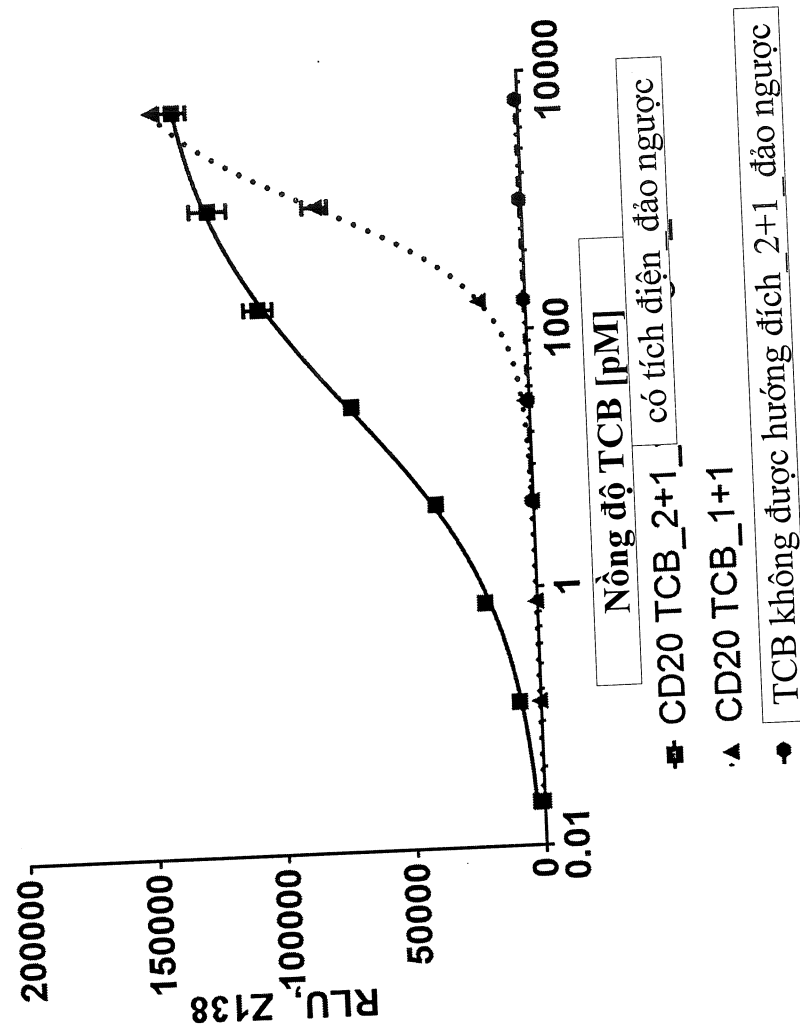


Fig.15



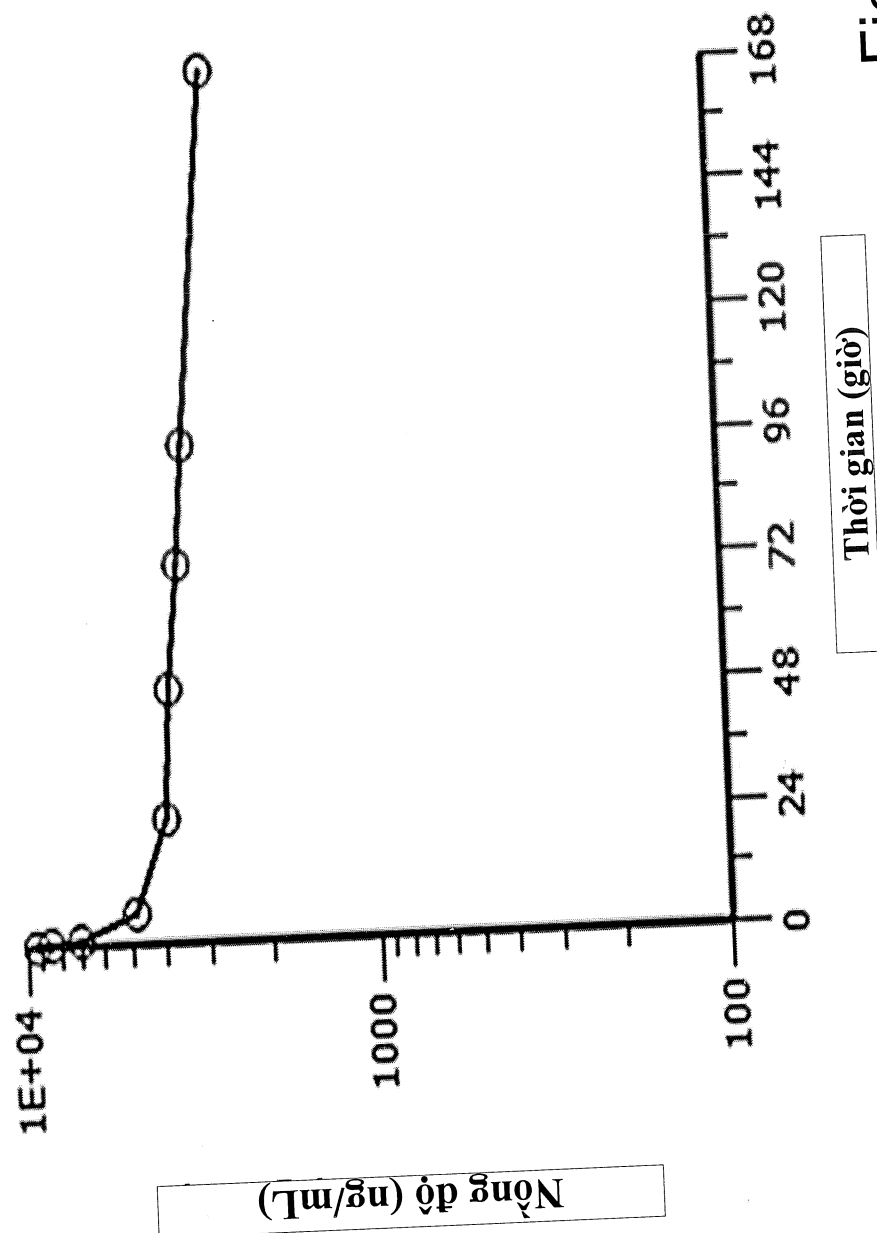


Fig.16

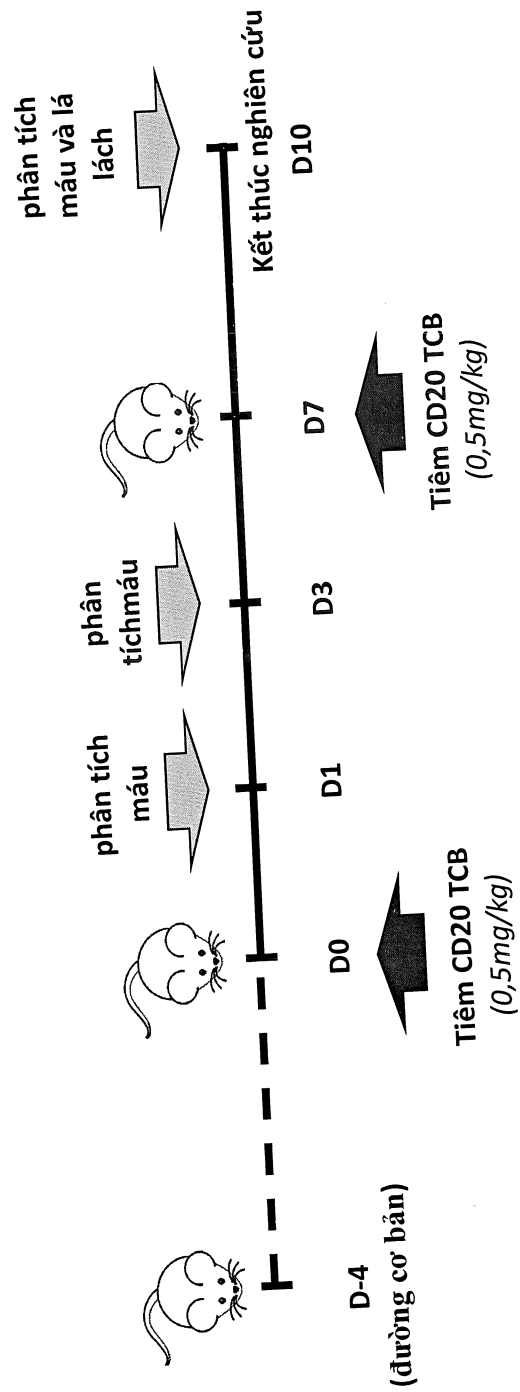


Fig.17

Fig.18

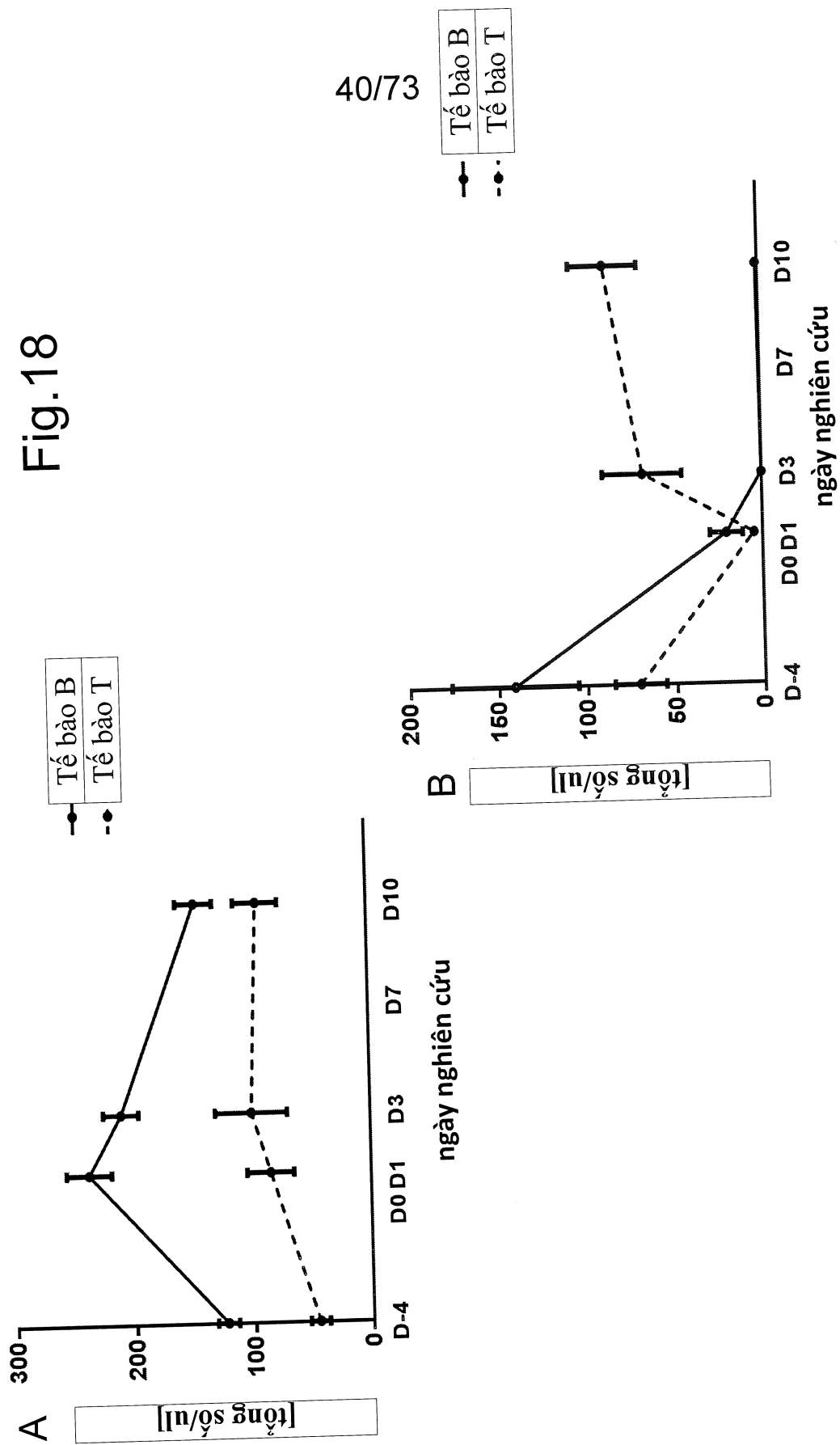
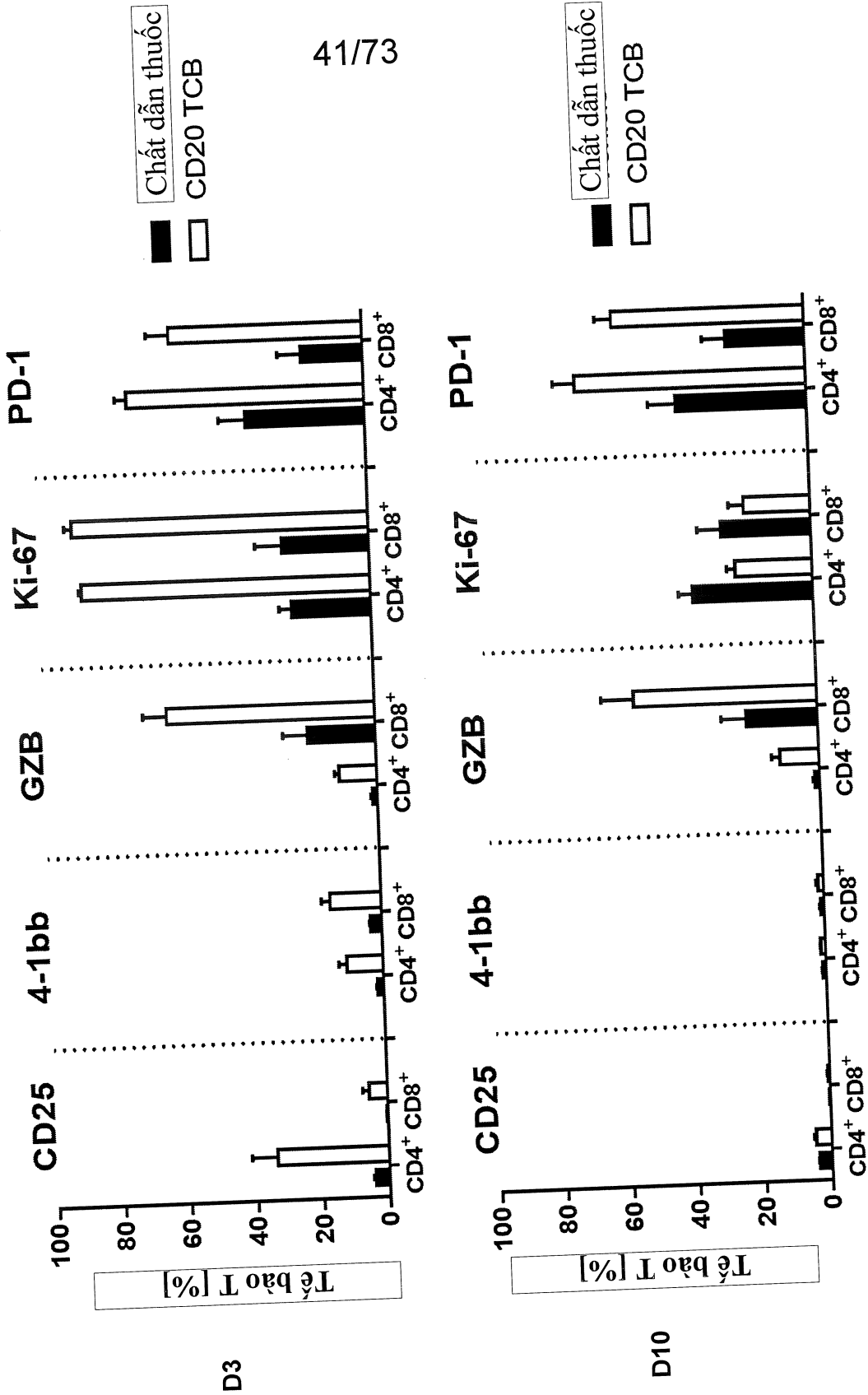


Fig.19



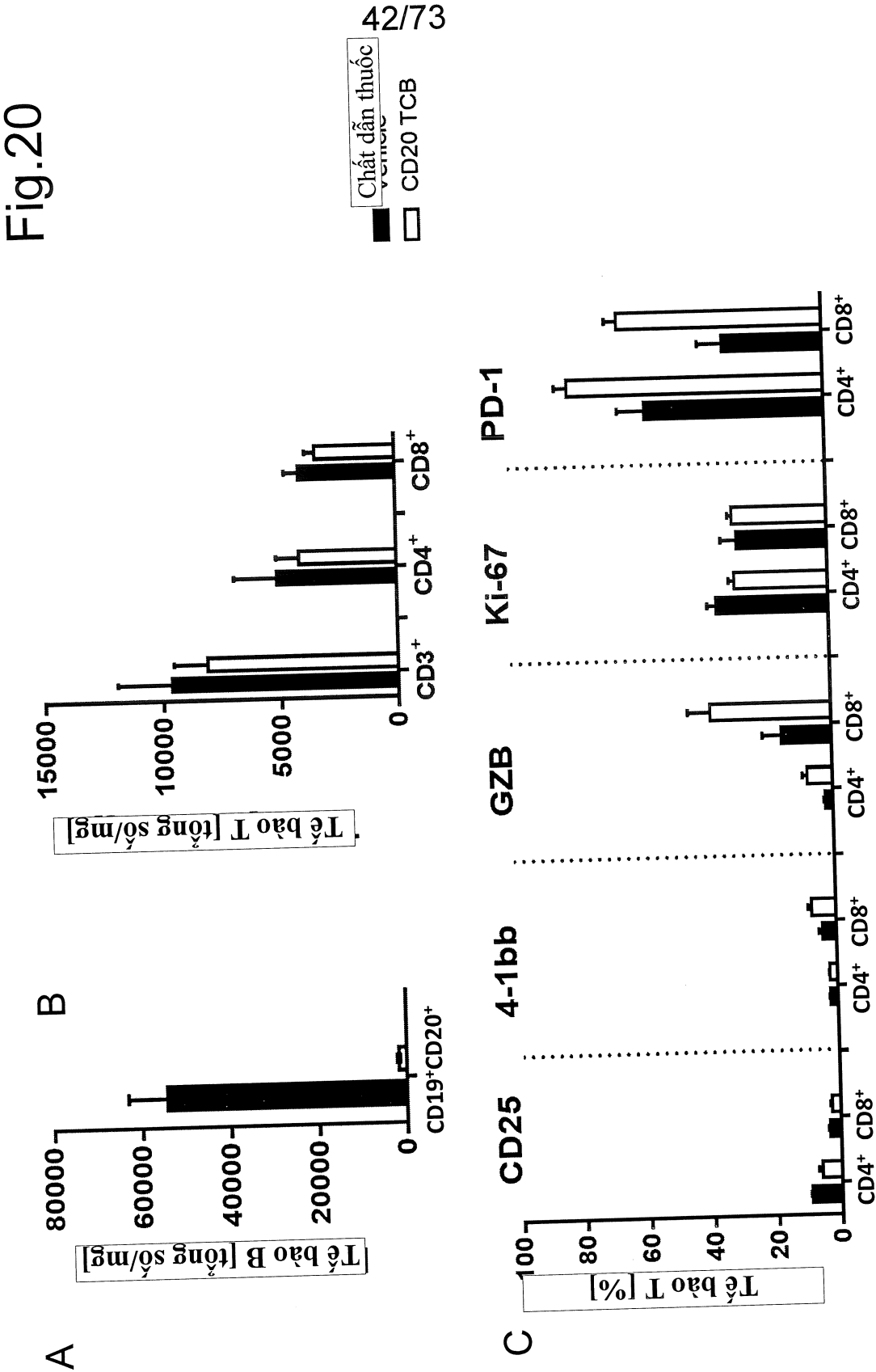
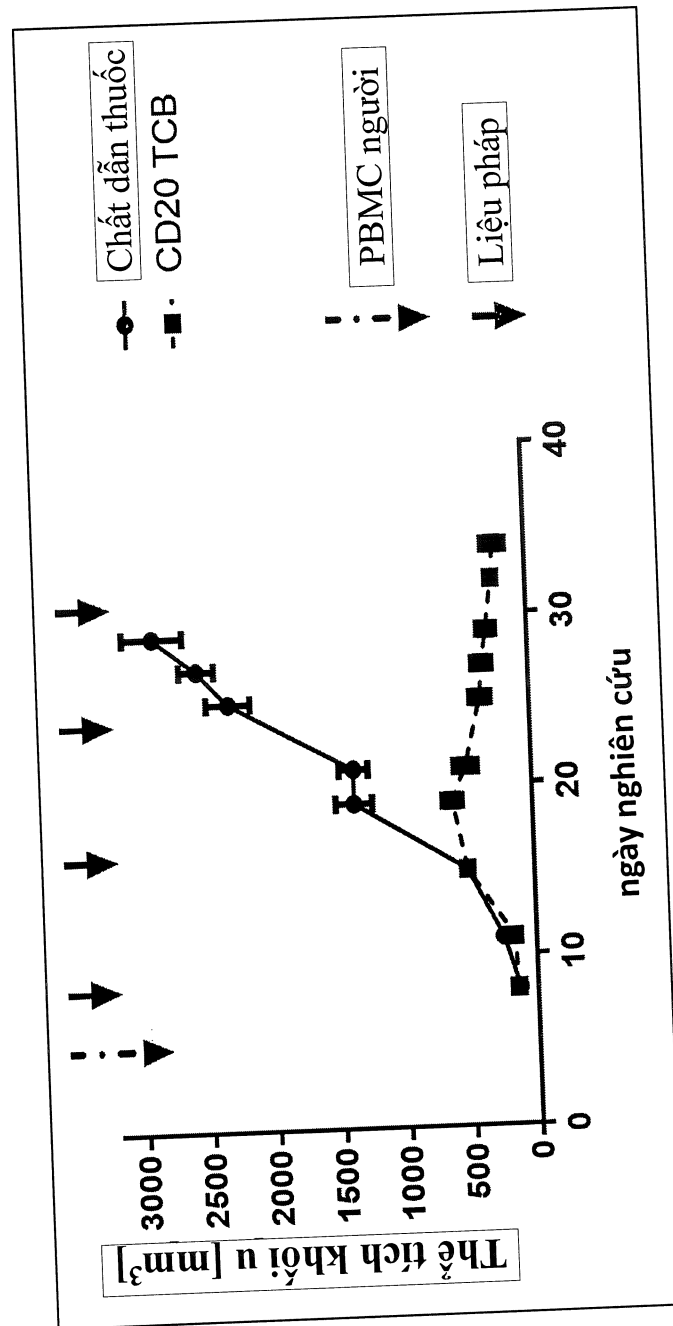


Fig.21



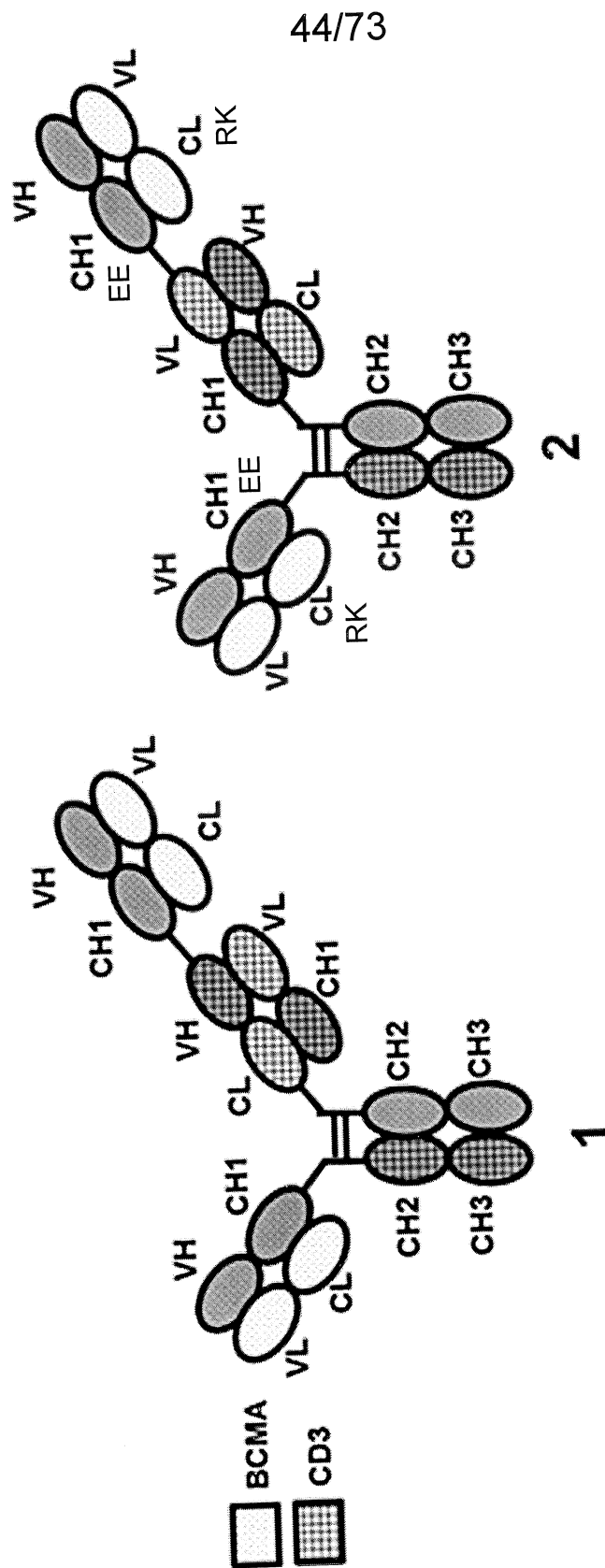
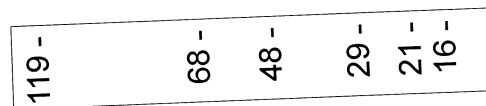
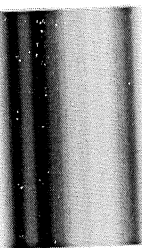


Fig.22

A. 83A10-TCB

Phương pháp tinh chế: PA + SEC
 Độ tinh khiết: < 30%
 Sản lượng: 6,7mg/L
 Lượng: 2,7mg
 Monome: 82,8%

Kích cỡ [kDa]	% tinh khiết
28,78	0,79
89,65	1,20
154,36	22,53
165,88	3,52
172,58	4,23
180,85	16,81
188,67	25,19
198,86	26,52

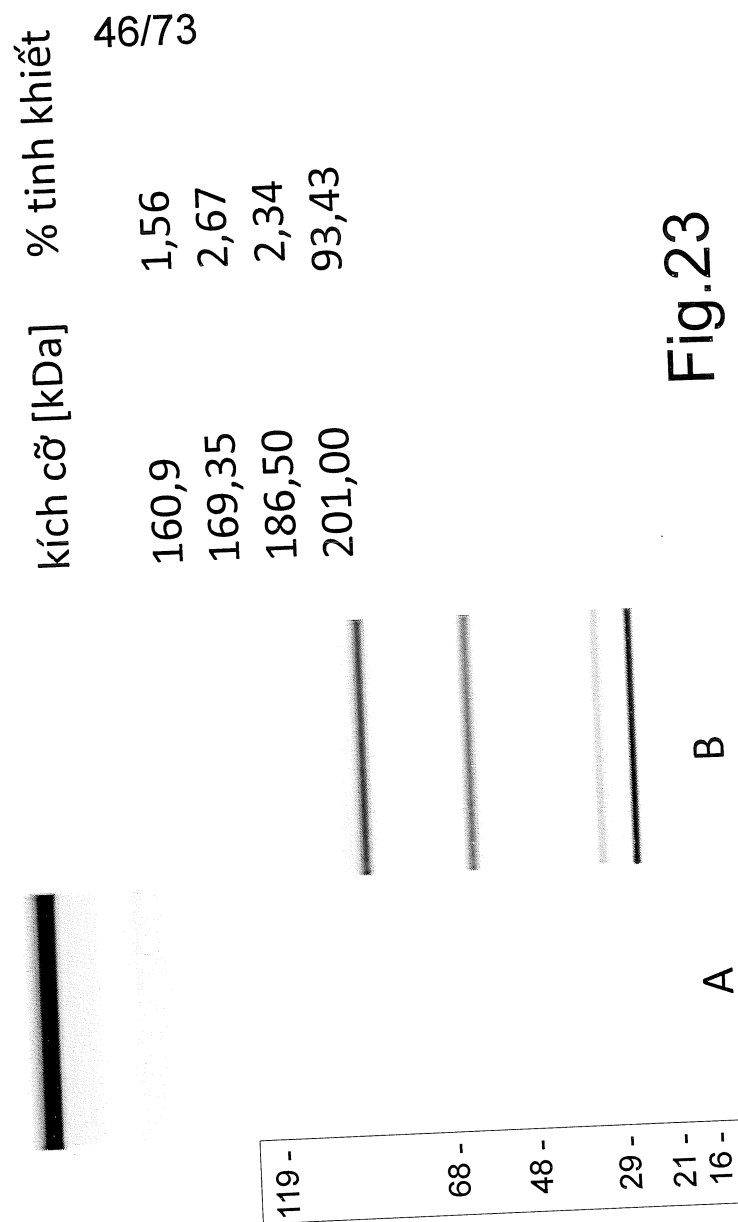


A B

Fig.23

B. 83A10-TCB

Phương pháp tinh chế: PA + SEC + cLEX + re-SEC
Độ tinh khiết: 93,4%
Sản lượng: 0,42mg/L
Lượng: 0,168mg
Monome: 82,8%



C. 83A10-TCBcv

Phương pháp tinh chế: PA + cIEX + SEC
Độ tinh khiết: 95,3%
Sân lượng: 3,3mg/L
Lượng: 1,3mg
Monome: 100%

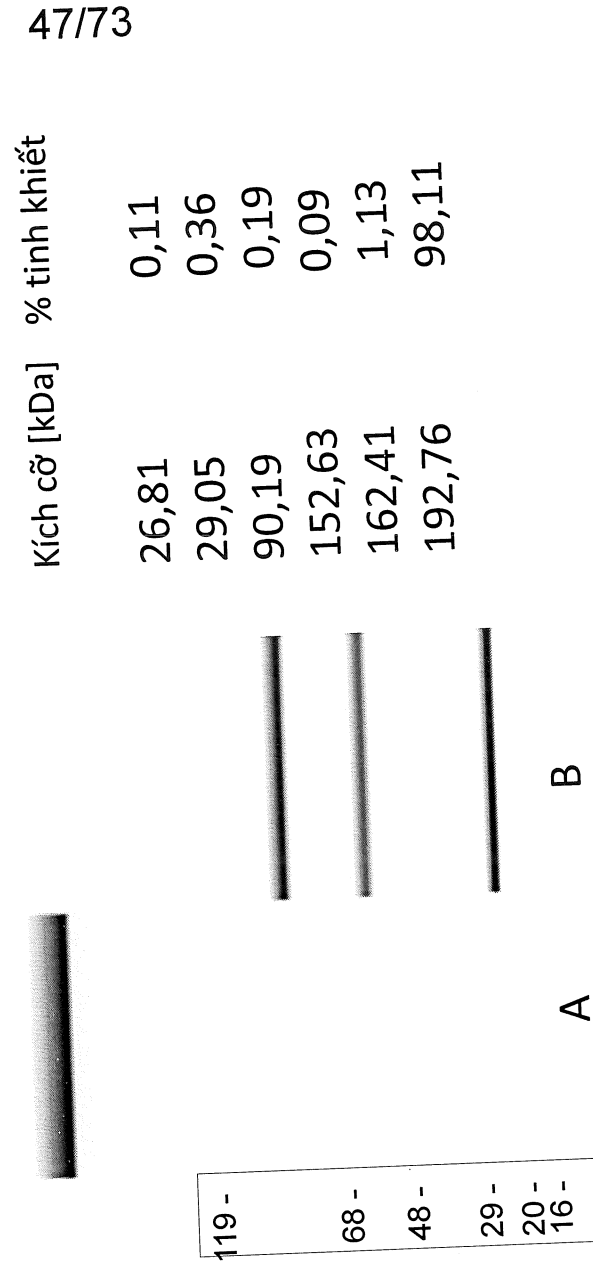


Fig.23

48/73

A. 83A10-ICB

Phương pháp tinh chế: PA
Độ tinh khiết: 61,3%
Sản lượng: 26,2mg/L
Lượng: 24,3mg
Monome: 63,7%
LC-MS: n.d.

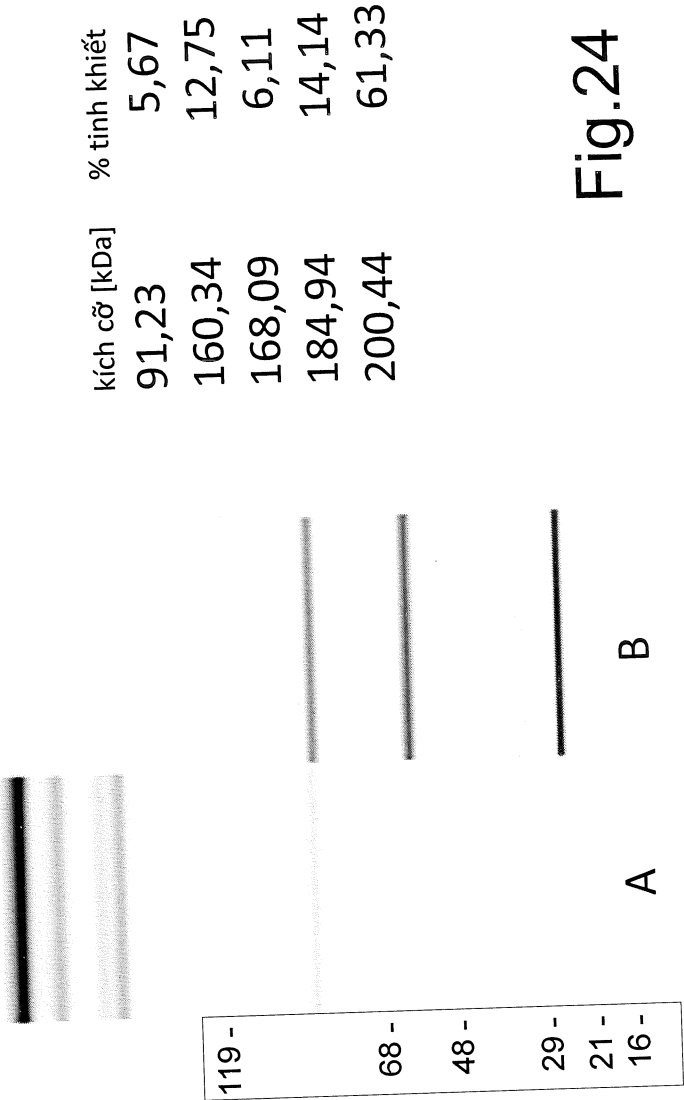


Fig.24

B. 83A10-ICBcv

Phương pháp tinh chế: PA
Độ tinh khiết: 81,0%
Sản lượng: 51,5mg/L
Lượng: 50,2mg
Monome: 68,2%

LC-MS: n.d.

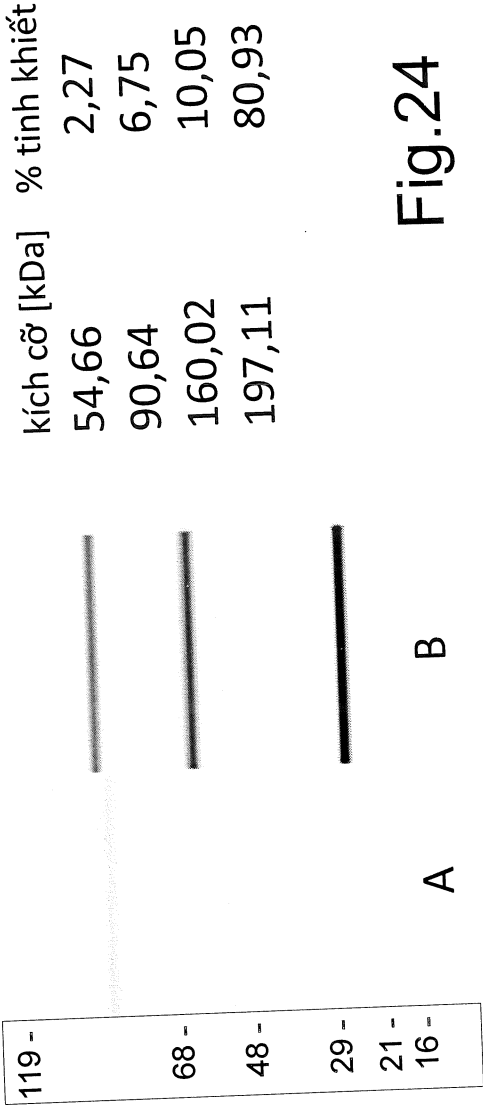
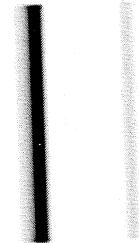


Fig.24

C. 83A10-ICB

Phương pháp tinh chế: PA + SEC

Độ tinh khiết: 69,5%

Sản lượng: 14,1mg/L

Lượng: 13,1mg

Monome: 74,7%

LC-MS: 40-60% phân tử
hiệu chỉnh

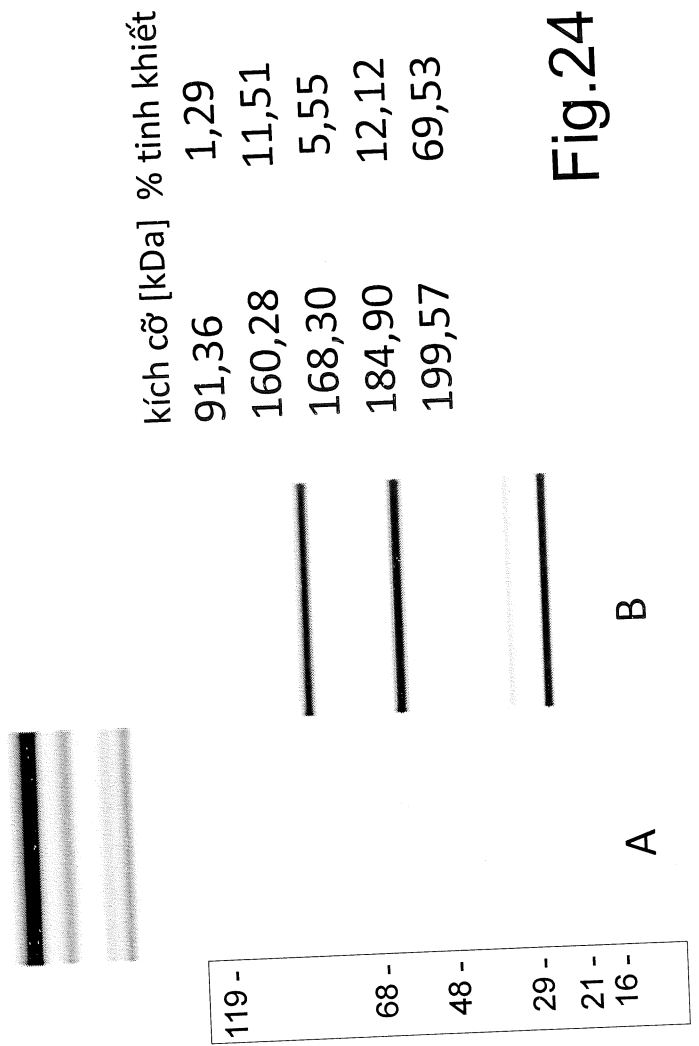


Fig.24

D. 83A10-ICBCV

Phương pháp tinh chế: PA + SEC

Độ tinh khiết: 91,0%

Sản lượng: 10,3mg/L

Lượng: 10,0mg

Monome: 83,9%

LC-MS: 90% phân tử
hiệu chỉnh

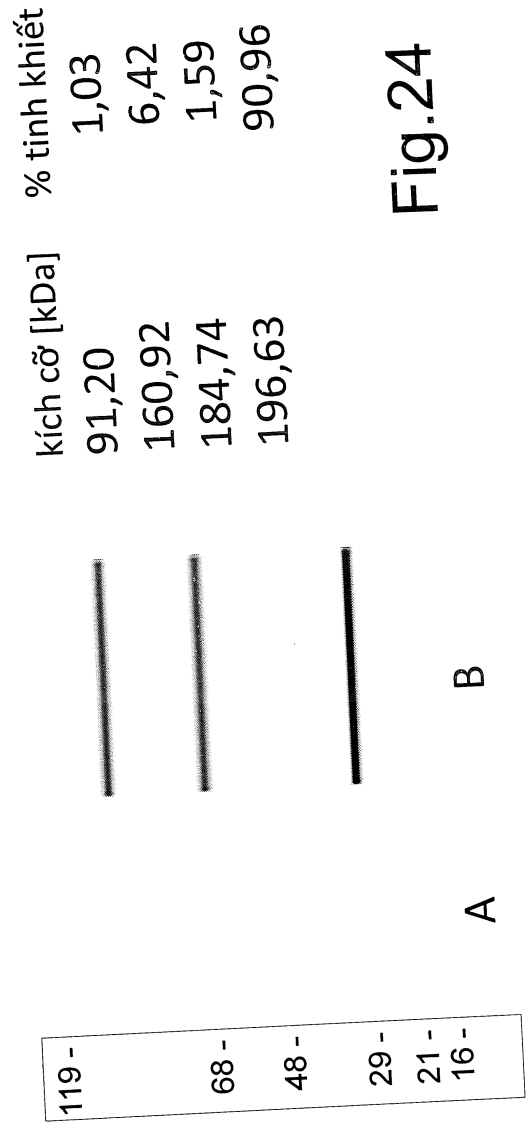


Fig.24

E. 83A10-ICB

Phương pháp tinh chế: [(PA + SEC + (PA))] + cLEX + SEC

Độ tinh khiết: 43,1%

Sản lượng: 0,43mg/L

Lượng: 0,73mg

Monome: 98,3%

LC-MS: 60-70% phân tử hiệu chỉnh

52/73

kích cỡ [kDa]

1,59
4,76
11,02
2,09
3,75
3,98
43,10
29,71

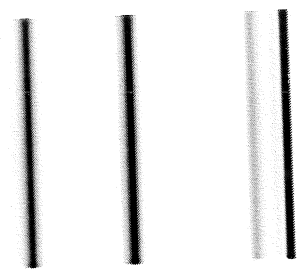
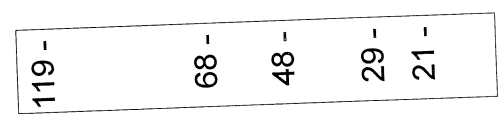
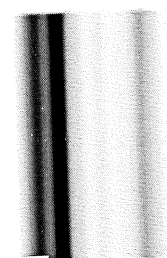


Fig.24

F. 83A10-TCBcy

Phương pháp tinh chế: [(PA + SEC + (PA))] + cLEX + SEC

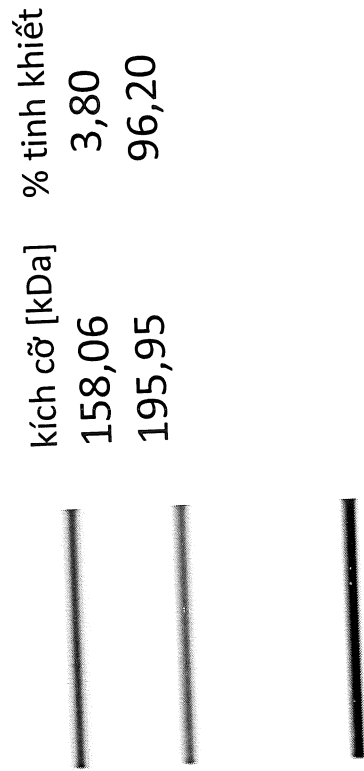
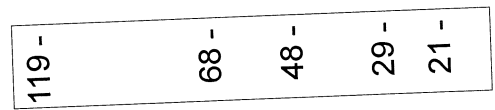
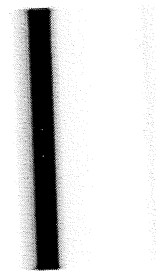
Độ tinh khiết: 96,2%

Sản lượng: 0,64mg/L

Lượng: 1,27mg

Monome: 98,9%

LC-MS: >95% phân tử hiệu chỉnh



kích cỡ [kDa]	% tinh khiết
158,06	3,80
195,95	96,20

A B

Fig.24

54/73

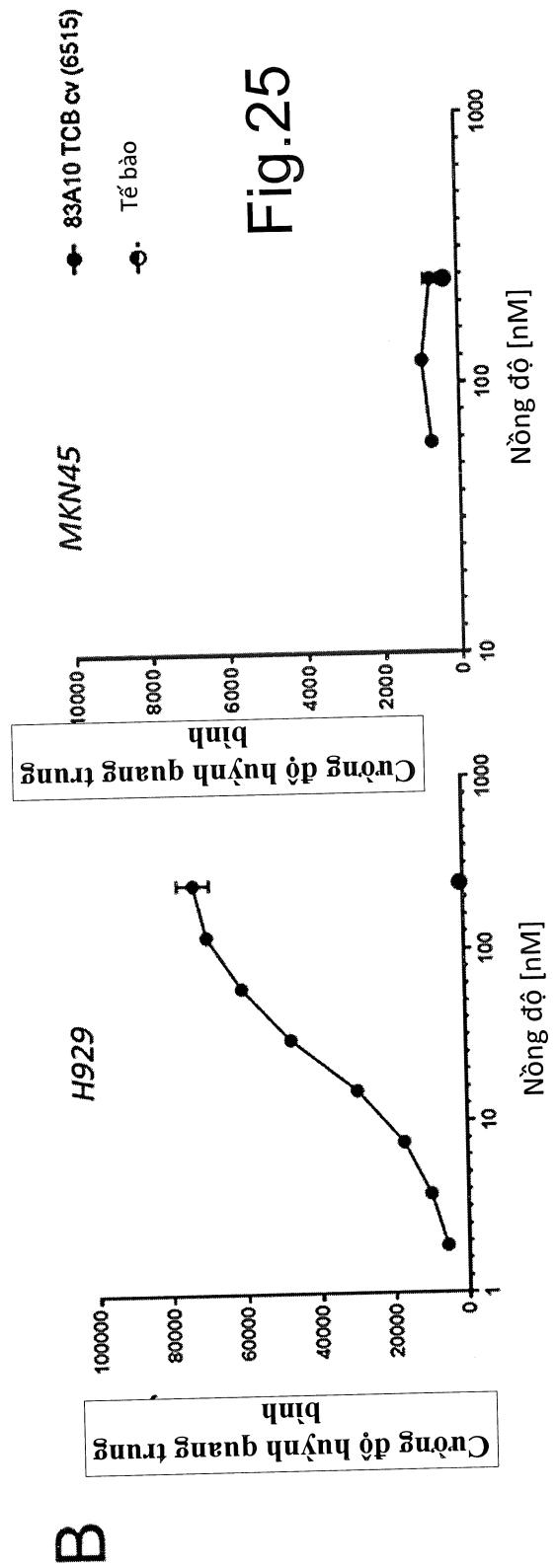
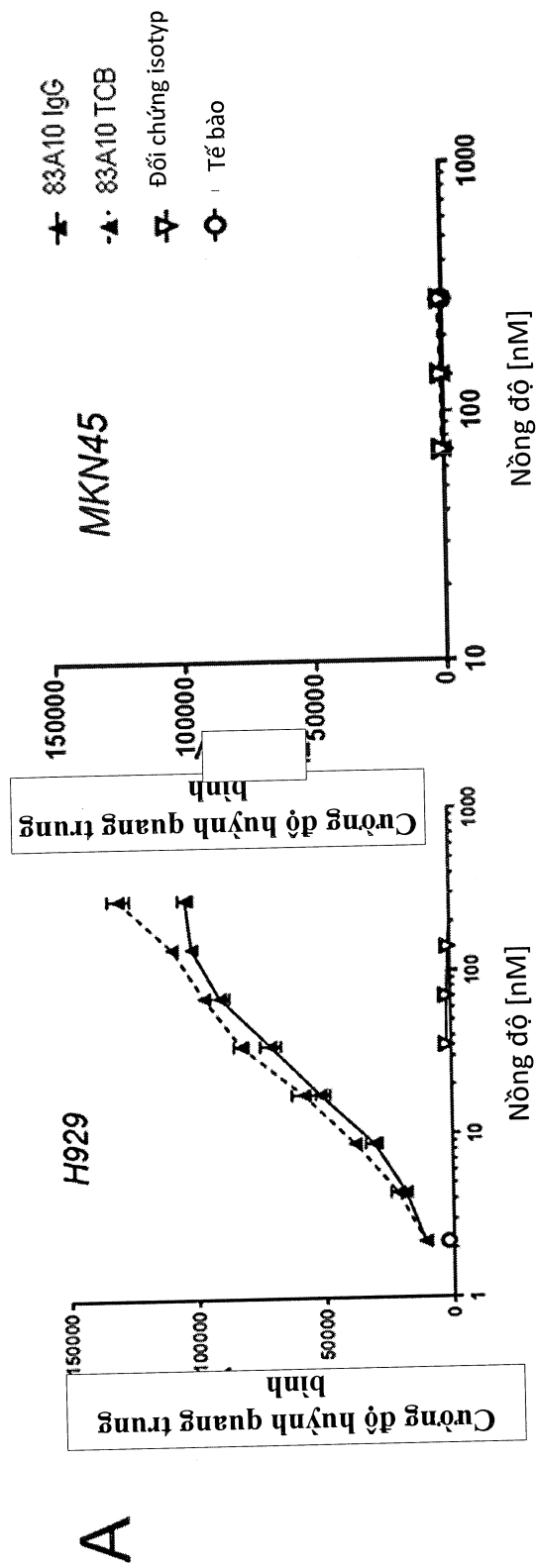


Fig.25

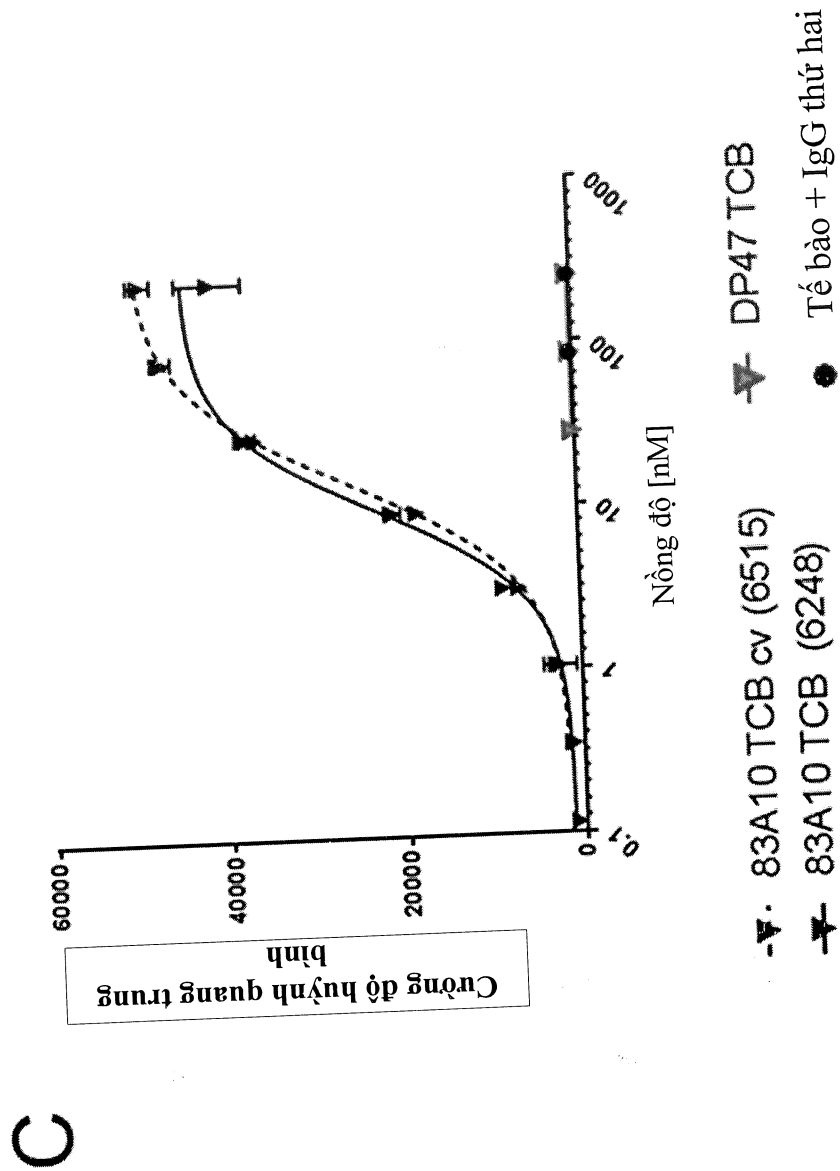


Fig.25

D

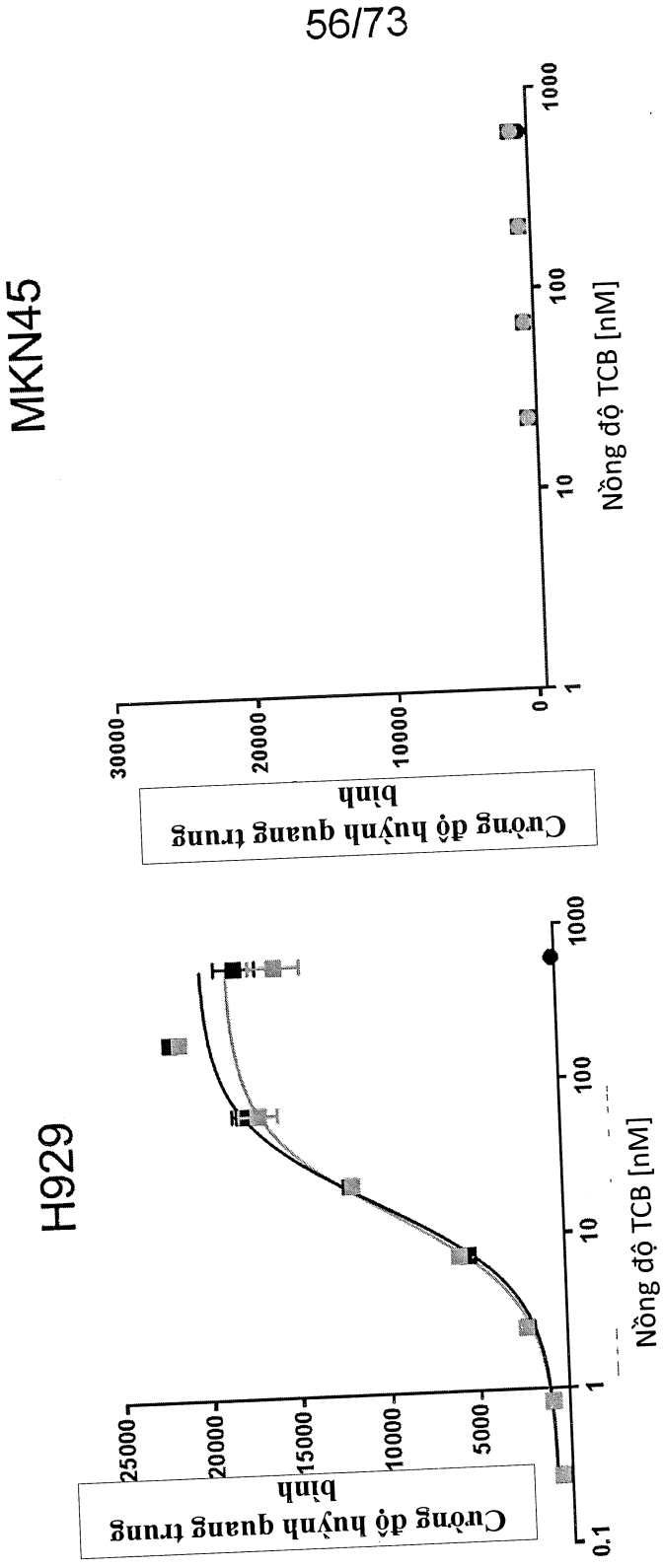


Fig.25

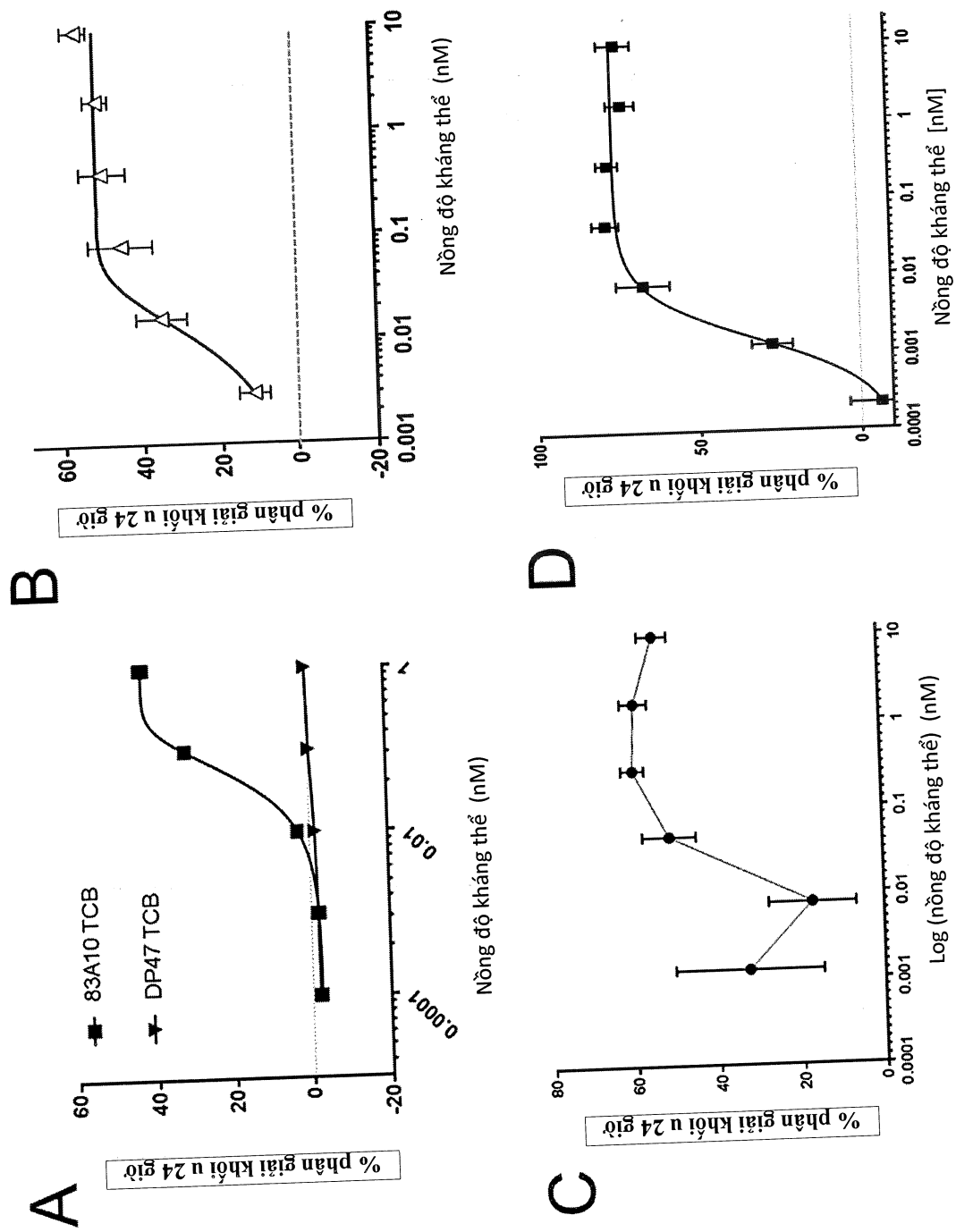
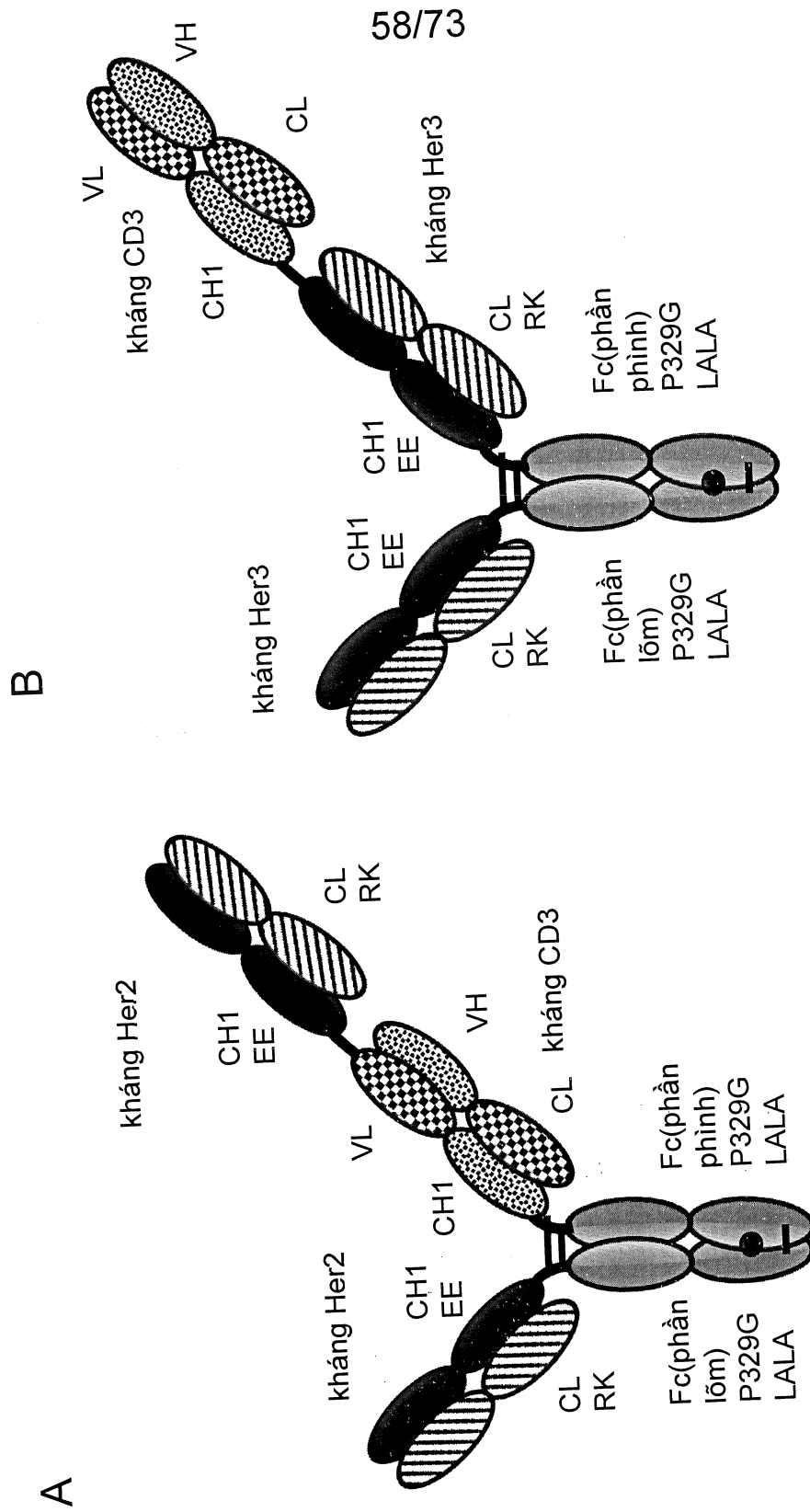


Fig.26



59/73

A

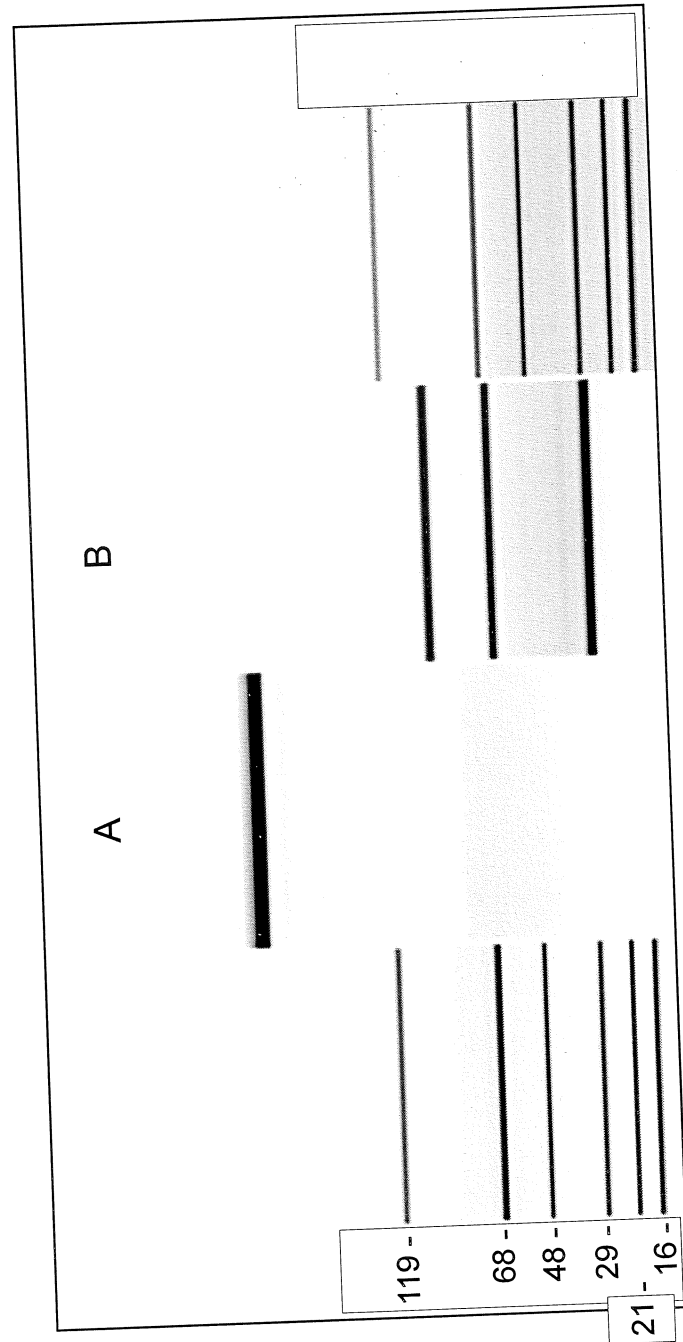


Fig.28

60/73

B

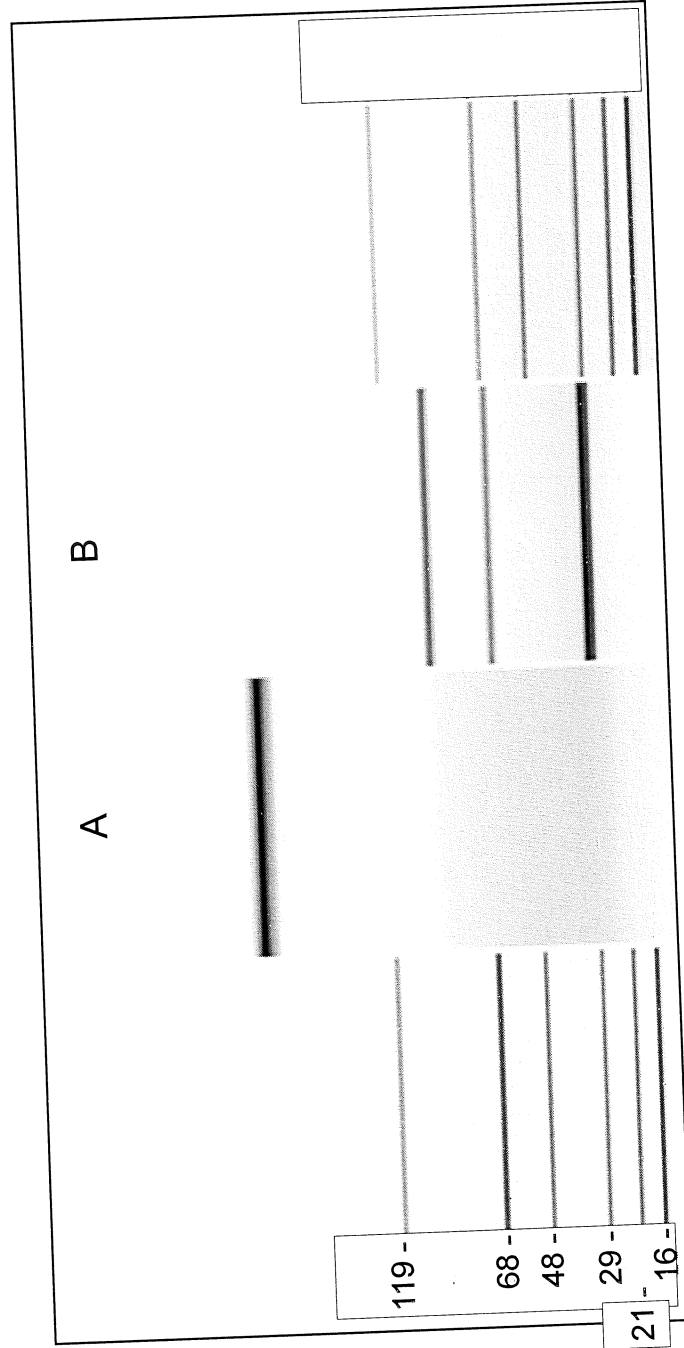


Fig.28

A

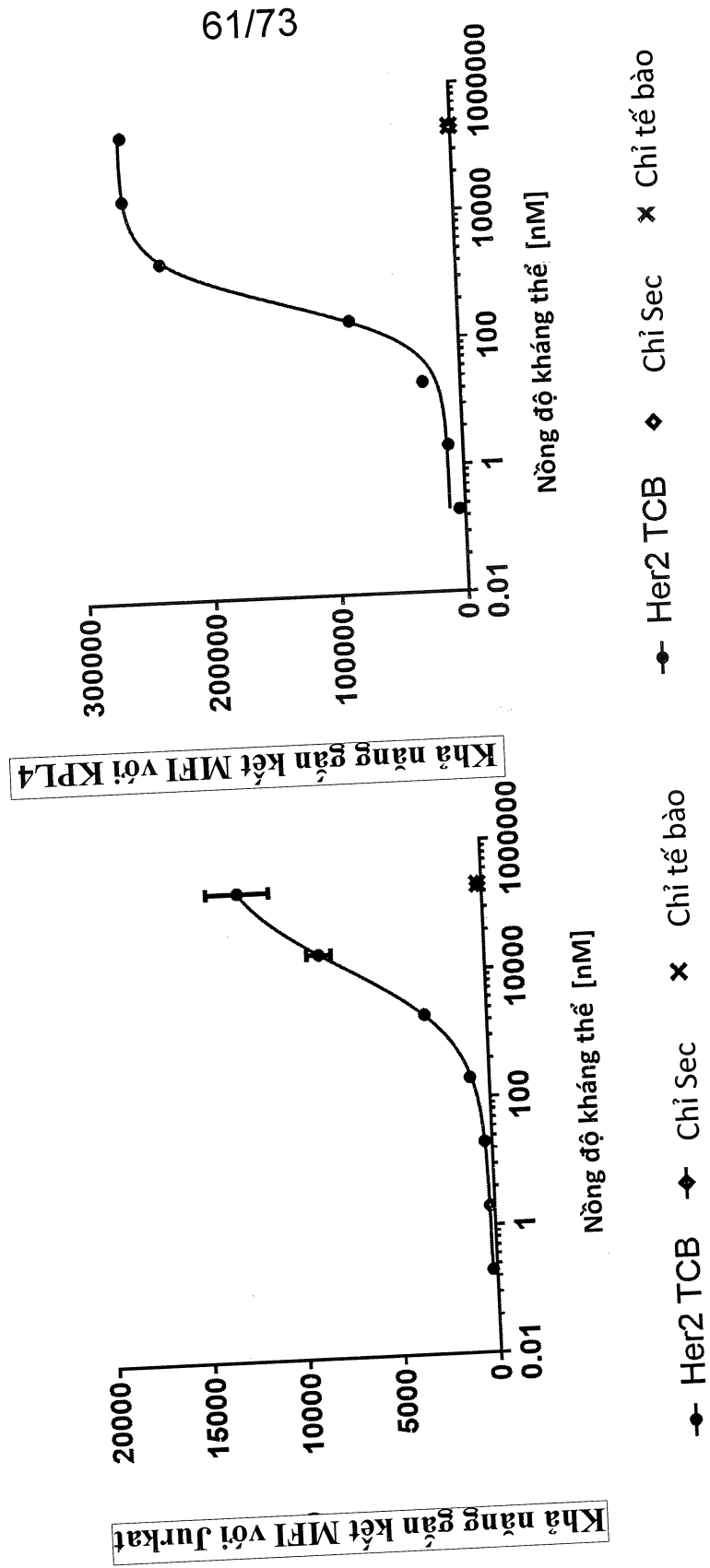


Fig.29

B

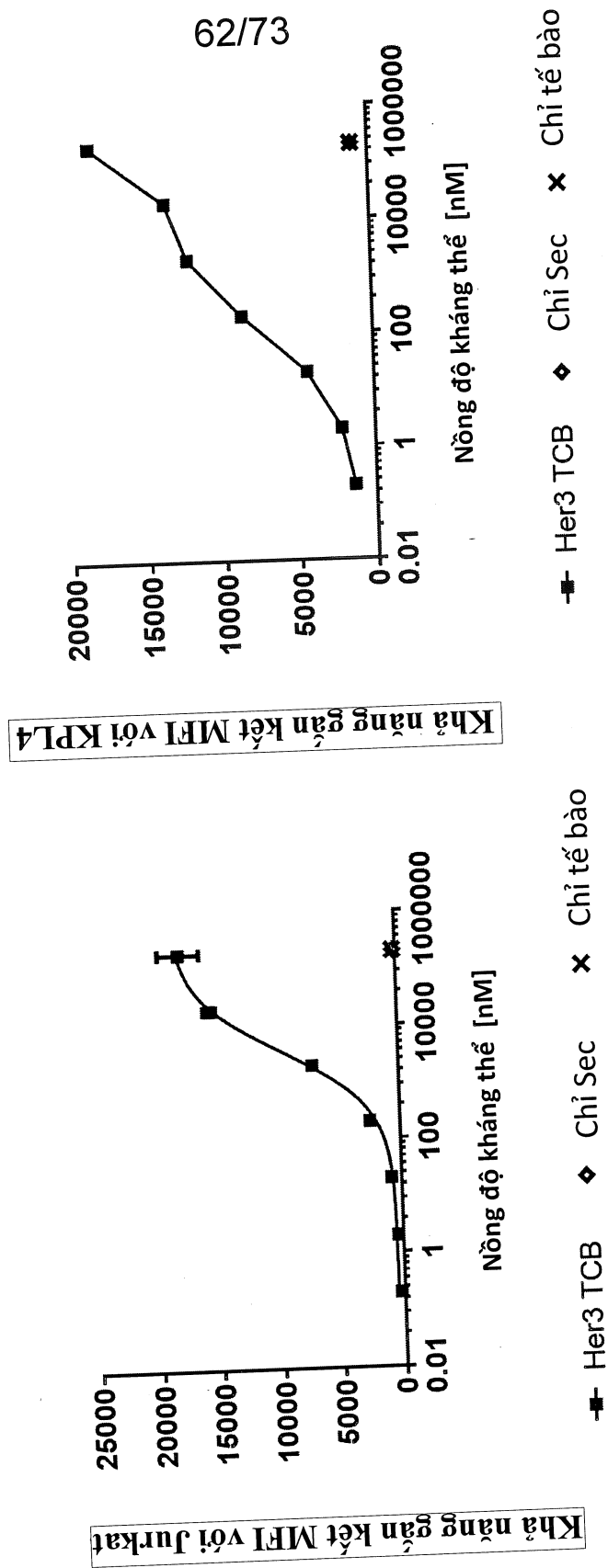


Fig.29

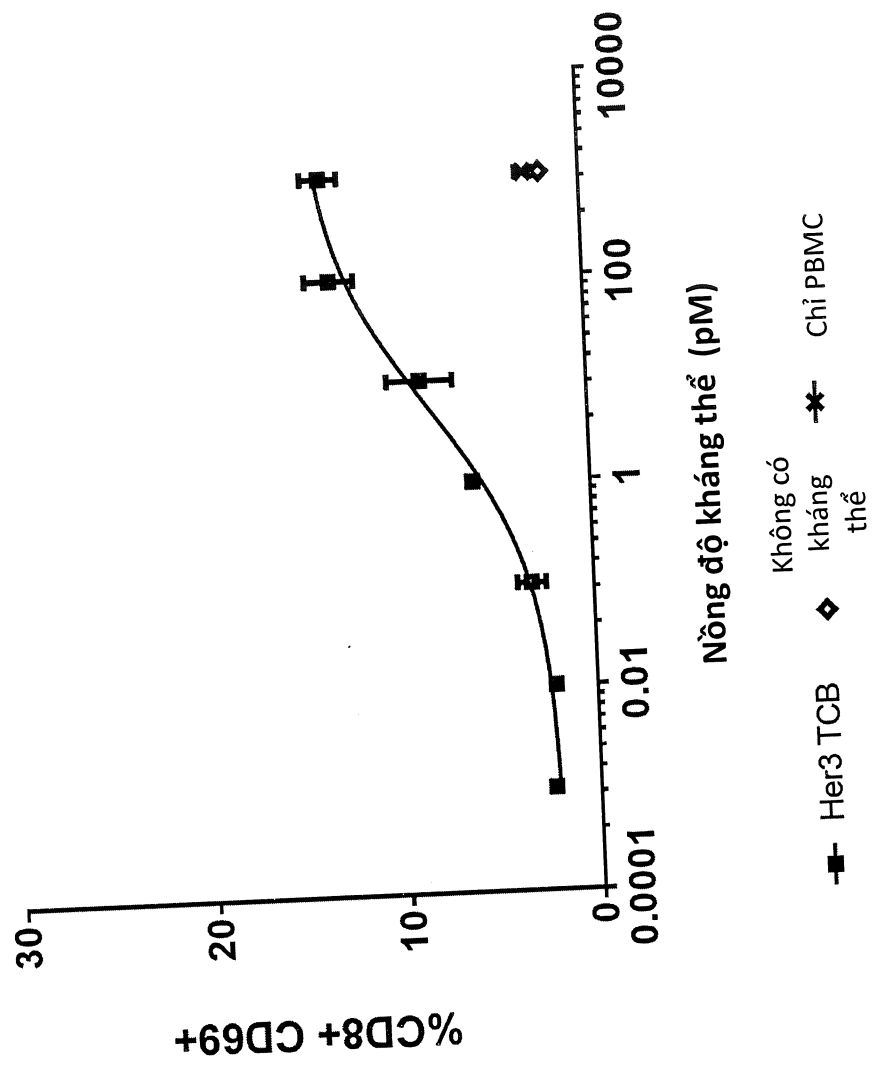


Fig.30

A

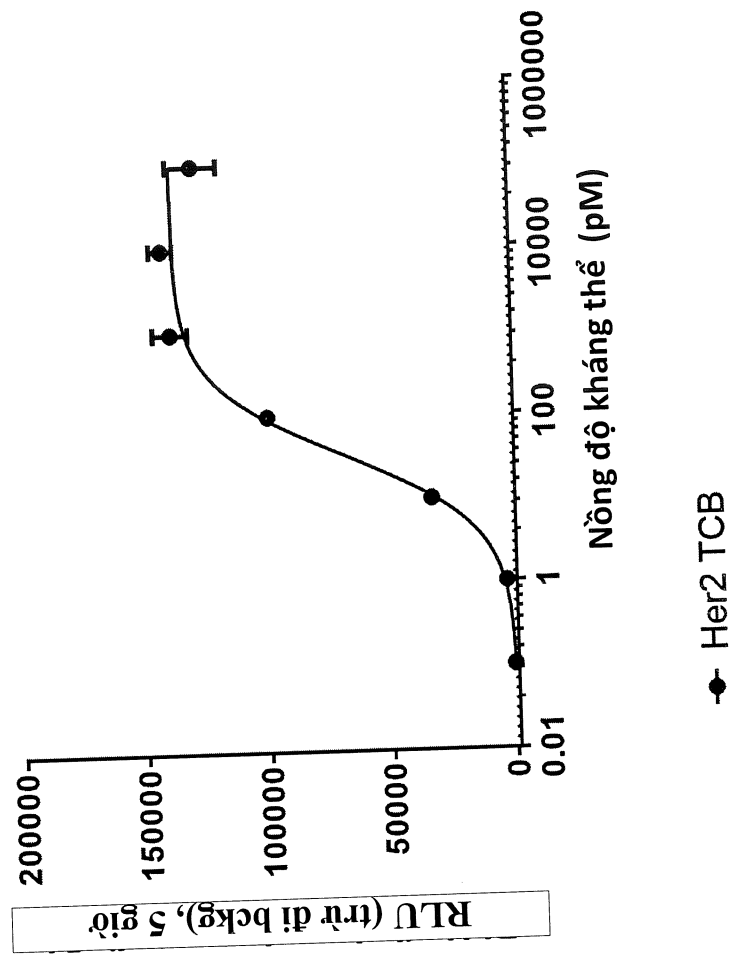


Fig.31

B

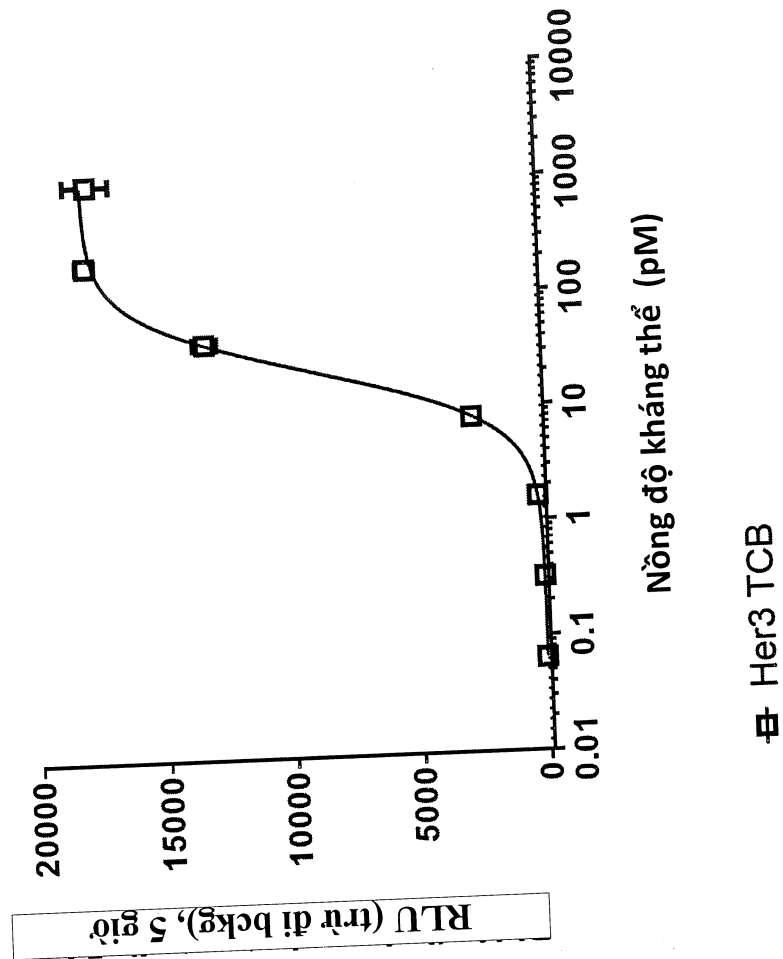


Fig.31

Fig.32

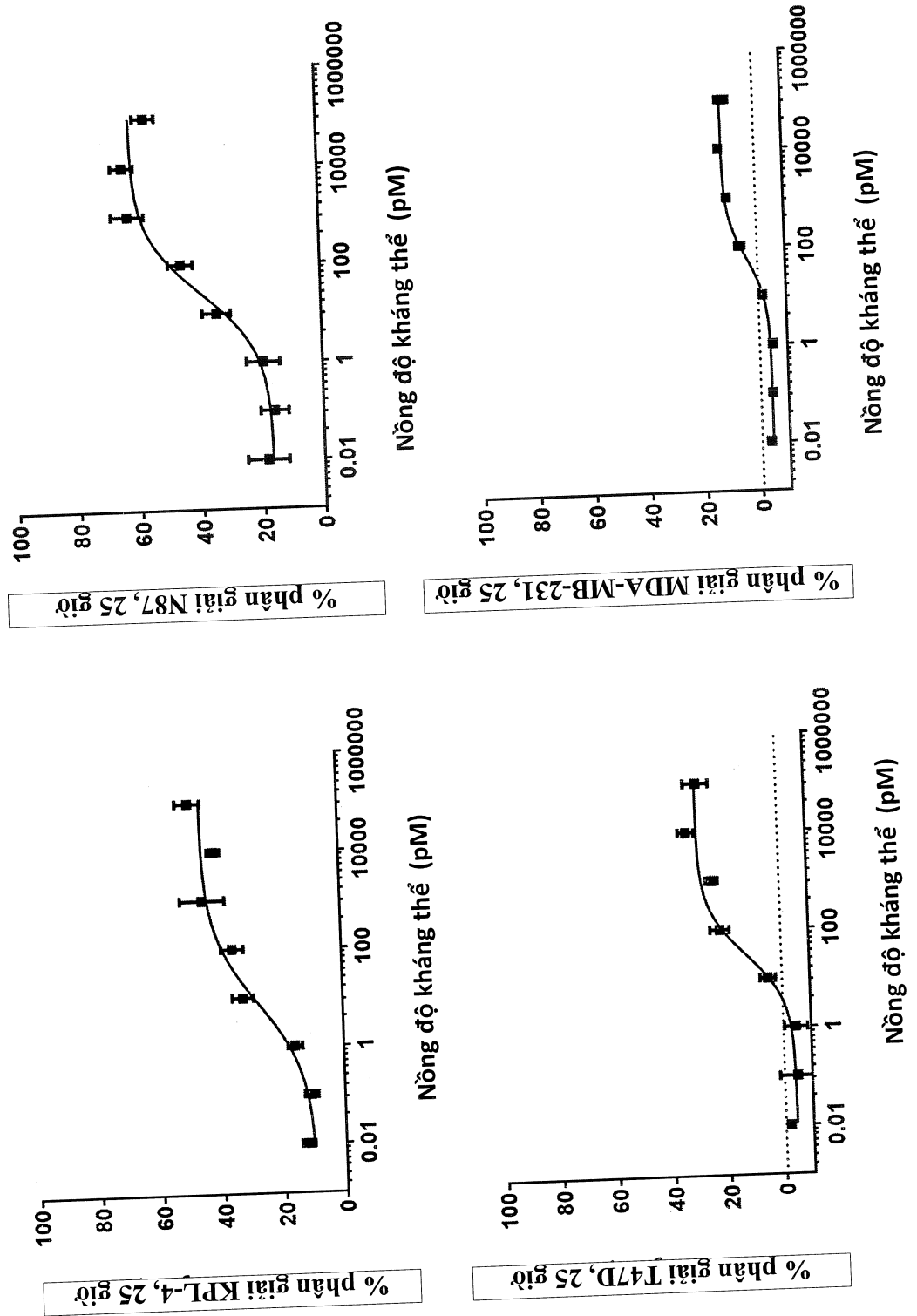
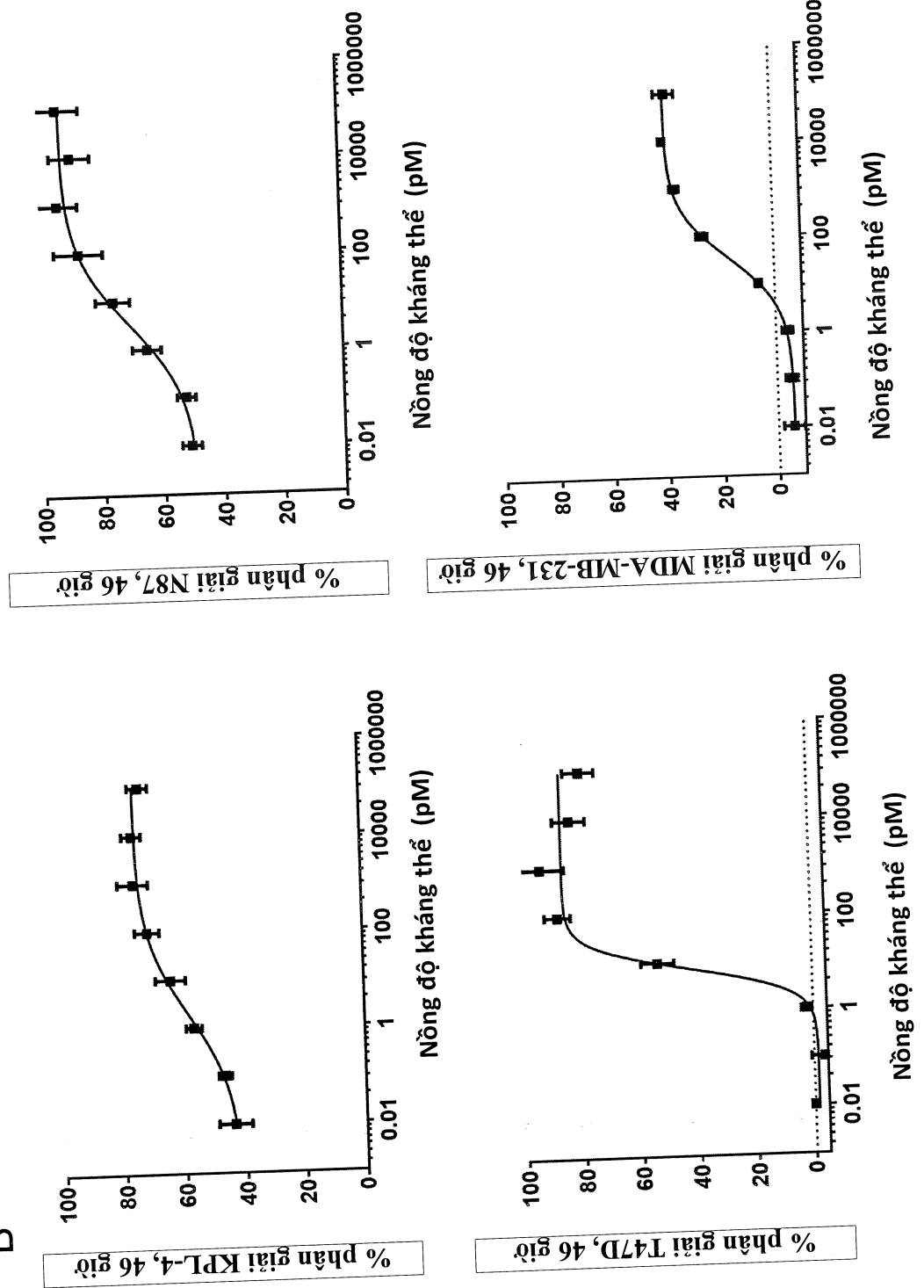


Fig.32



C

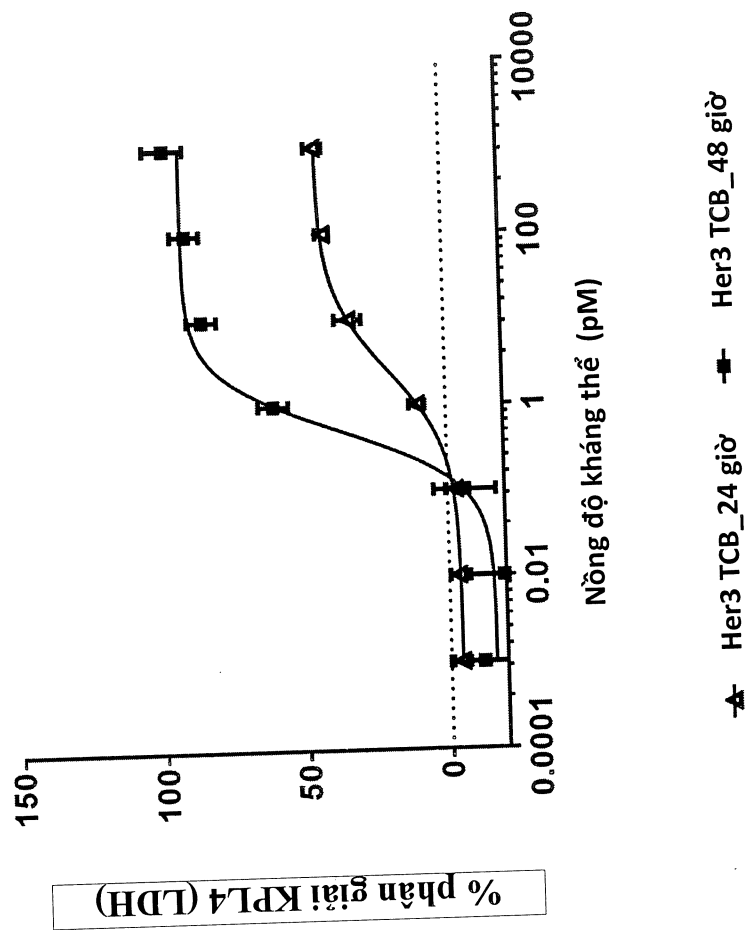


Fig.32

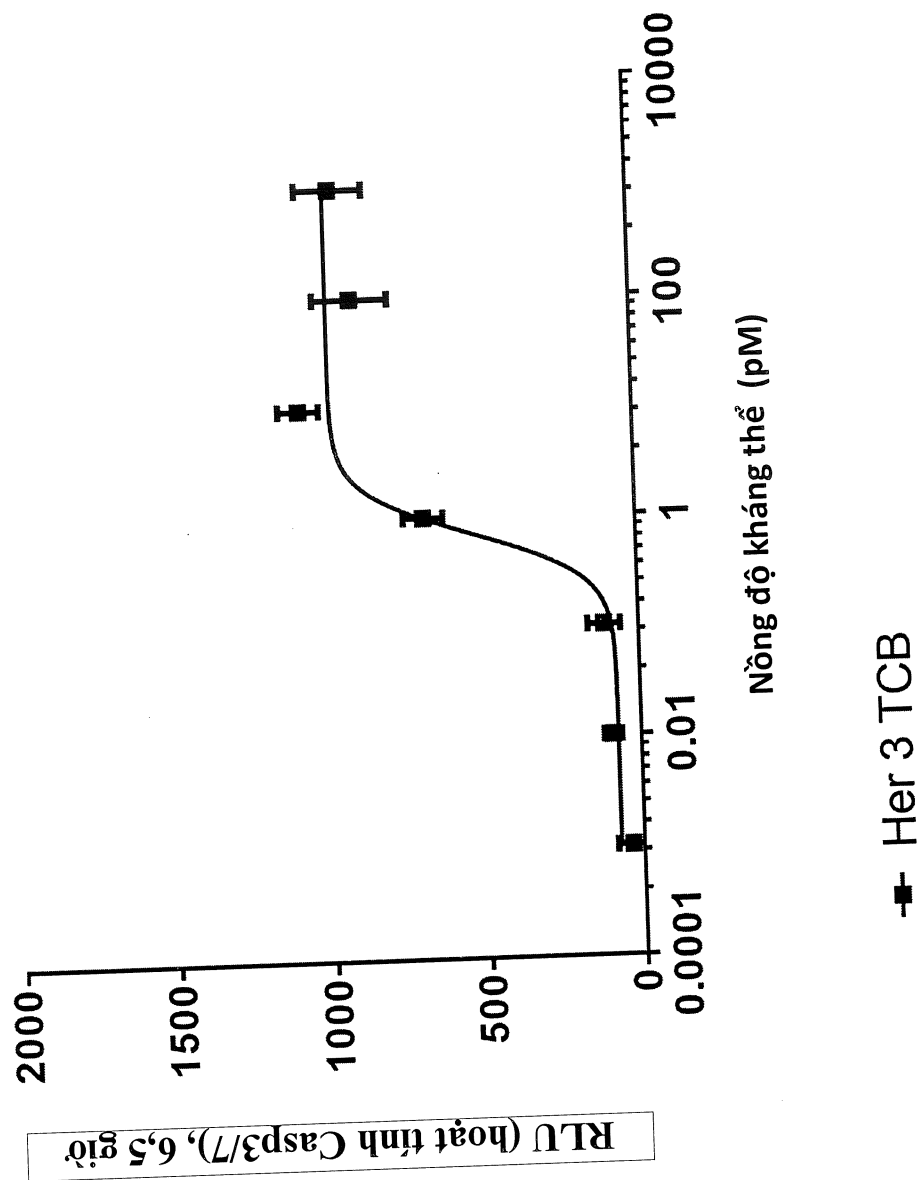


Fig.33

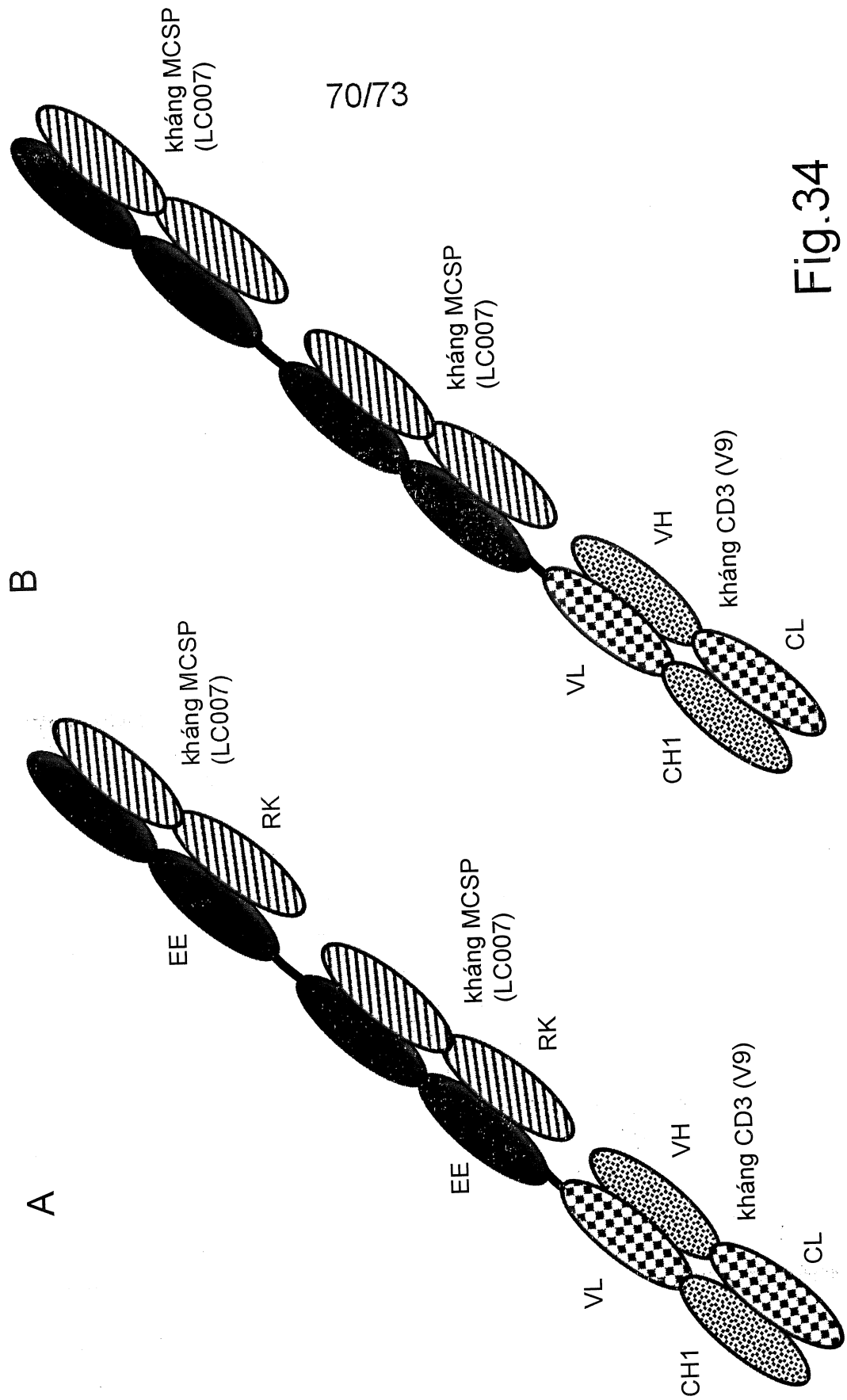


Fig.34

71/73

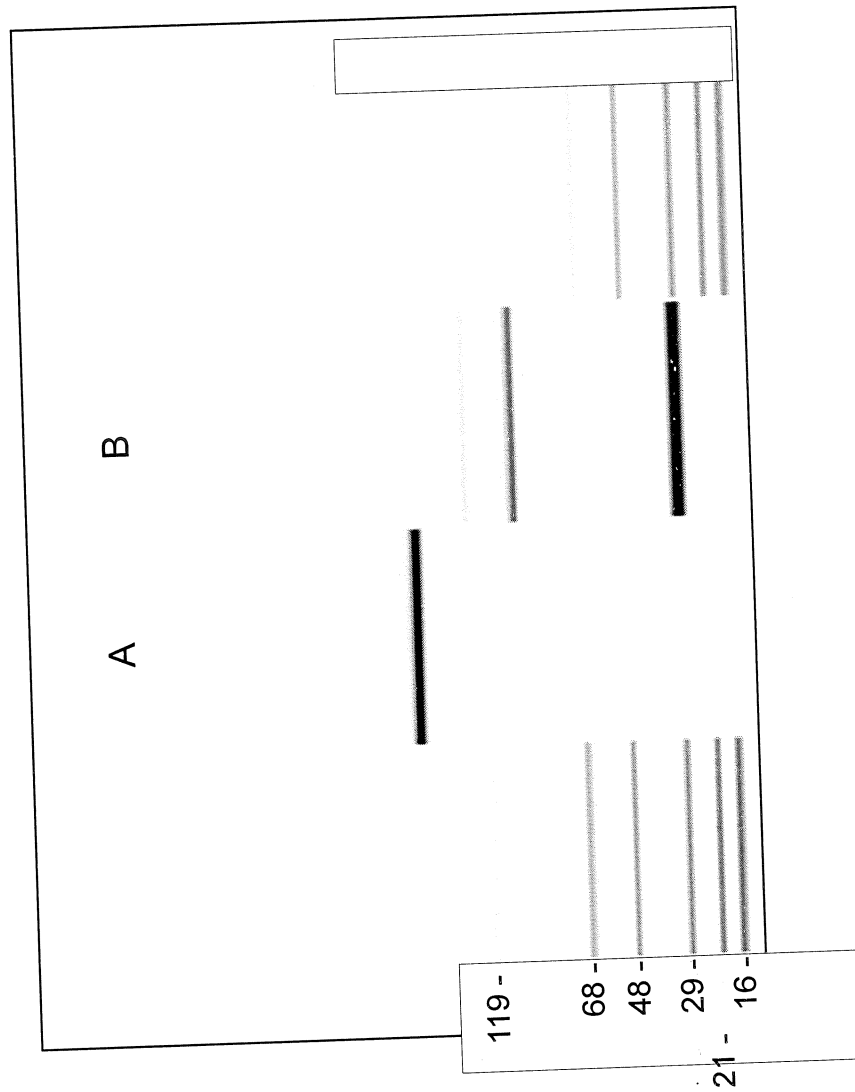


Fig.35

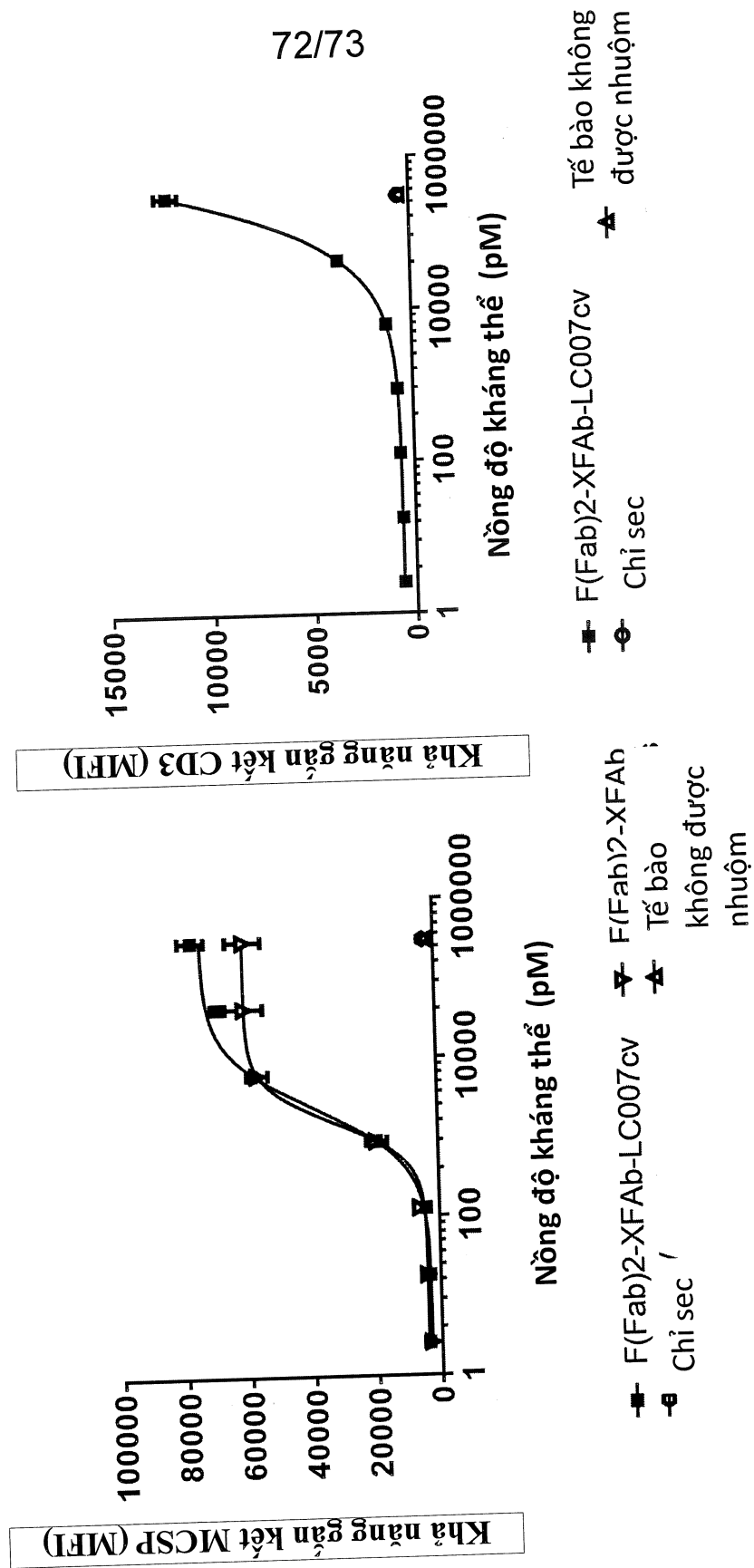


Fig.36

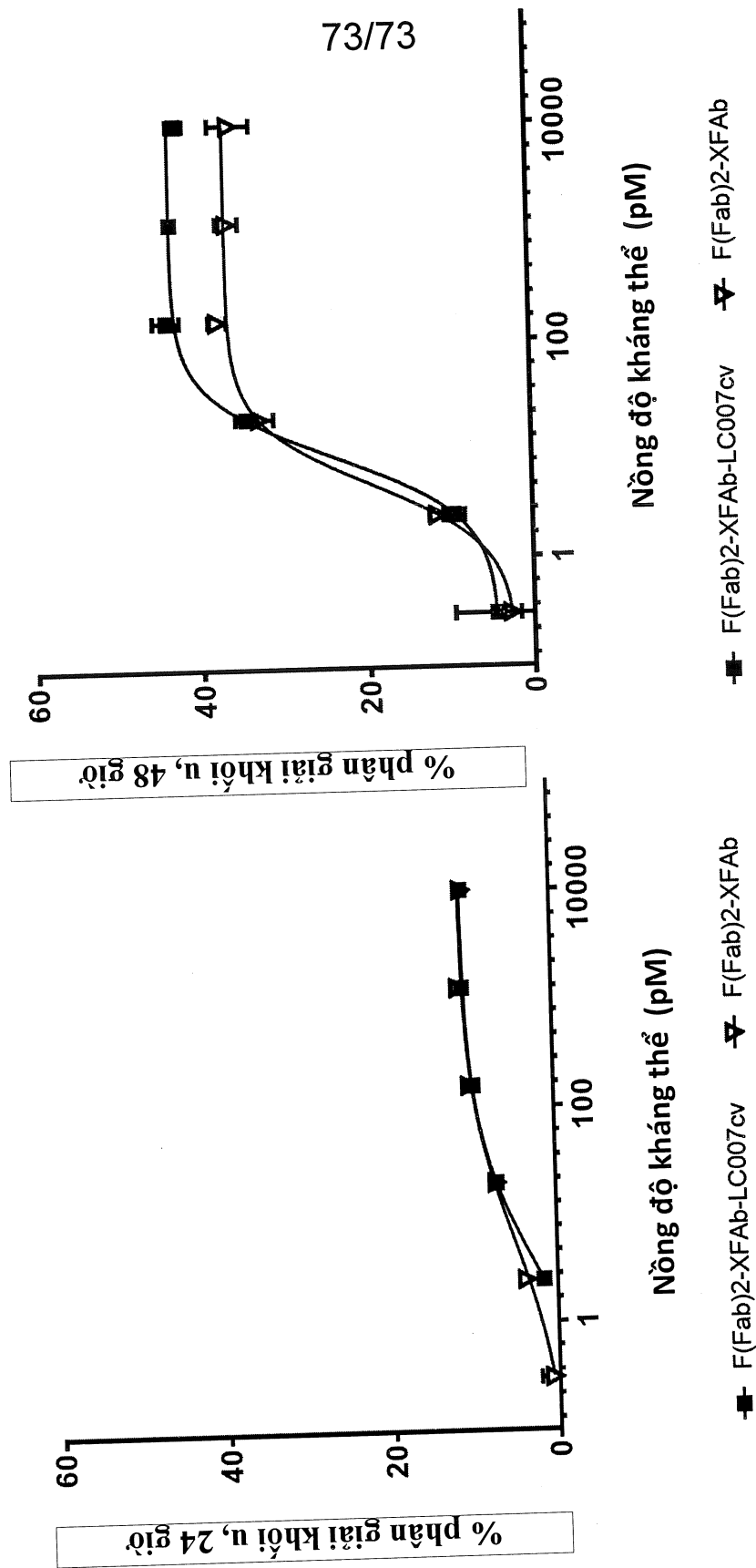


Fig.37