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

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

(11) **1-0039344**

(51)[8] **A61K 39/395**; C07K 16/40; C07K 16/28; C07K 16/30; A61P 35/00; C07K 14/705

(13) **B**

(21) 1-2017-01765
(22) 13/11/2015
(86) PCT/EP2015/076528 13/11/2015
(87) WO2016/075278 19/05/2016
(30) 14193260.8 14/11/2014 EP; 15183736.6 03/09/2015 EP; 15188142.2 02/10/2015 EP
(45) 25/04/2024 433
(43) 25/09/2017 354A
(73) F. Hoffmann-La Roche AG (CH)
Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland
(72) AMANN, Maria (DE); REGULA, Joerg Thomas (DE); UMANA, Pablo (CR); BRUENKER, Peter (DE); FERRARA KOLLER, Claudia (CH); GRAU-RICHARDS, Sandra (DE); KLEIN, Christian (DE); LEVITSKI, Viktor (SE); MOESSNER, Ekkehard (DE); CLAUS, Christina (DE).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHÂN TỬ GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN CHỨA TRIME CỦA PHỐI TỬ HỌ TNF, POLYNUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP MÃ HÓA PHÂN TỬ NÀY, DƯỢC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PHÂN TỬ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF mới bao gồm (a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và (b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, khác biệt ở chỗ polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm (a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và (b) polypeptit thứ n-hất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, trong đó các phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất các phân tử này và phương pháp sử dụng các phân tử này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các phối tử tương tác với các phân tử của siêu họ thụ thể TNF (yếu tố hoại tử khối u) có vai trò chủ chốt trong việc tổ chức và thực hiện chức năng của hệ miễn dịch. Mặc dù điều hòa các chức năng bình thường như đáp ứng miễn dịch, sinh huyết và tạo hình thái, các phối tử họ TNF (còn được gọi là các xytokin) cũng có vai trò khiến tạo u, thải loại mảnh ghép, sốc nhiễm khuẩn, sao chép virut, tiêu xương, viêm đa khớp dạng thấp và bệnh tiểu đường (Aggarwal, 2003). Họ phối tử TNF này bao gồm 18 gen mã hóa 19 protein xuyên màng typ II (tức là đầu tận N nội bào và đầu tận C ngoại bào), đặc trưng bởi sự có mặt của miền đầu tận C bảo toàn tạo ra 'miền tương đồng TNF' (THD). Miền này chịu trách nhiệm đối với việc gắn kết thụ thể và do vậy có tính quyết định đối với hoạt tính sinh học của các thành viên họ phối tử TNF này. Độ đồng nhất trình tự giữa các thành viên trong họ là khoảng từ 20 đến 30% (Bodmer, 2002). Các thành viên của họ phối tử TNF này sử dụng chức năng sinh học của chúng dưới dạng trime không cộng hóa trị tự lắp ráp (Banner et al, Cell 1993, 73, 431-445). Do vậy, các phối tử họ TNF tạo thành trime có khả năng gắn kết với và làm hoạt hóa các thụ thể tương ứng của siêu họ TNFR.

4-1BB (CD137), một thành viên của siêu họ thụ thể TNF, được nhận biết lần đầu là phân tử có sự biểu hiện được cảm ứng bằng cách hoạt hóa tế bào T (Kwon and Weissman, 1989). Những nghiên cứu sau đó đã chứng tỏ sự biểu hiện của 4-1BB trong các lympho bào T và B (Snell et al., 2011; Zhang et al., 2010), các tế bào NK (Lin et al., 2008), các tế bào NKT (Kim et al., 2008), các bạch cầu đơn nhân (Kienzle and von Kempis, 2000; Schwarz et al., 1995), các bạch cầu trung tính (Heinisch et al., 2000), các tế bào mast (Nishimoto et al., 2005) và các tế bào tua cũng như các tế bào có nguồn gốc không sinh huyết như tế bào nội mô và tế bào cơ trơn (Broll et al., 2001; Olofsson et al., 2008). Sự biểu hiện của 4-1BB trong các loại tế bào khác nhau hầu hết là dễ cảm ứng và được điều khiển bởi nhiều tín hiệu kích thích khác nhau, như việc khởi động thụ thể tế bào T (TCR) hoặc thụ thể tế bào B, cũng như việc truyền tín hiệu được cảm ứng thông qua các phân tử đồng kích thích hoặc các thụ thể của xytokin tiền viêm (Diehl et al., 2002; von Kempis et al., 1997; Zhang et al., 2010).

Sự biểu hiện của phối tử 4-1BB (4-1BBL hoặc CD137L) bị hạn chế hơn và được quan sát thấy trên các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) chuyên nghiệp như tế bào B, tế bào tua (DC) và đại thực bào. Sự biểu hiện dễ cảm ứng của 4-1BBL là đặc trưng đối với các tế bào T, bao gồm cả các tiểu quần thể tế bào T αβ và γδ, và các tế bào nội mô (xem trong tài liệu: Shao and Schwarz, 2011).

Việc truyền tín hiệu CD137 đã được biết là kích thích sự tiết IFNγ và sự tăng sinh của tế bào NK (Buechele et al., 2012; Lin et al., 2008; Melero et al., 1998) cũng như thúc đẩy sự hoạt hóa DC như được chỉ ra bởi sự tăng khả năng sống sót và khả năng tiết các xytokin của chúng và điều hòa tăng các phân tử đồng kích thích (Choi et al., 2009; Futagawa et al., 2002; Wilcox et al., 2002). Tuy nhiên, CD137 được đặc trưng nhất dưới dạng phân tử đồng kích thích mà điều tiết sự hoạt hóa được cảm ứng bởi TCR trong cả các tiểu quần thể CD4+ và CD8+ của tế bào T. Kết hợp với việc khởi động TCR, các kháng thể đặc hiệu 4-1BB có tính chủ vận làm tăng cường sự tăng sinh của các tế bào T, kích thích sự tiết lymphokin và làm giảm độ nhạy của các lympho bào T đối với sự chết tế bào kích thích sự hoạt hóa (xem trong tài liệu: Snell et al., 2011).

Nhất quán với tác động đồng kích thích này của kháng thể 4-1BB trên tế bào T *in vitro*, việc sử dụng chúng cho chuột nhắt mang khối u đem đến tác dụng kháng khối u hiệu nghiệm ở nhiều mô hình khối u thử nghiệm (Melero et al., 1997; Narazaki et al.,

2010). Tuy nhiên, 4-1BB thường chỉ thể hiện công hiệu của nó dưới dạng chất kháng khối u khi được sử dụng kết hợp với các hợp chất điều biến miễn dịch khác (Curran et al., 2011; Guo et al., 2013; Morales-Kastresana et al., 2013; Teng et al., 2009; Wei et al., 2013), các chất thử hóa trị (Ju et al., 2008; Kim et al., 2009), vắc-xin đặc hiệu khối u (Cuadros et al., 2005; Lee et al., 2011) hoặc liệu pháp xạ trị (Shi and Siemann, 2006). Các thử nghiệm suy kiệt *in vivo* đã chứng tỏ rằng các tế bào T CD8+ đóng vai trò quan trọng nhất trong tác dụng kháng khối u của các kháng thể đặc hiệu 4-1BB. Tuy nhiên, tùy thuộc vào mô hình khối u hoặc liệu pháp kết hợp bao gồm kháng 4-1BB, sự đóng góp của các loại tế bào khác như tế bào DC, tế bào NK hoặc tế bào T CD4+ đã được báo cáo (Melero et al., 1997; Murillo et al., 2009; Narazaki et al., 2010; Stagg et al., 2011).

Ngoài tác dụng trực tiếp của chúng đối với các tiểu quần thể u lympho khác nhau, các chất chủ vận 4-1BB cũng có thể cảm ứng sự thâm nhiễm và lưu giữ của các tế bào T đã hoạt hóa trong khối u thông qua quá trình điều hòa tăng qua trung gian 4-1BB cho phân tử bám dính gian bào 1 (ICAM1) và phân tử bám dính tế bào mạch 1 (VCAM1) trên nội mô mạch khối u (Palazon et al., 2011).

Việc khởi động 4-1BB cũng có thể làm đảo ngược tình trạng mất ứng tế bào T được cảm ứng bởi sự tiếp xúc với kháng nguyên dễ tan mà có thể góp phần vào việc phá vỡ sự dung nạp miễn dịch trong vi môi trường khối u hoặc trong lây nhiễm lâu dài (Wilcox et al., 2004).

Có vẻ như các tính chất điều biến miễn dịch của kháng thể chủ vận 4-1BB *in vivo* đòi hỏi việc phần Fc kiểu dại có mặt trên phân tử kháng thể từ đó kéo theo sự gắn kết thụ thể Fc như là sự kiện quan trọng cần cho hoạt tính dược lý của các chất thử như đã được mô tả đối với các kháng thể chủ vận đặc hiệu đối với các thành viên khác mà điều biến miễn dịch hoặc kích thích sự chết tế bào theo chương trình của siêu họ TNFR (Li and Ravetch, 2011; Teng et al., 2009). Tuy nhiên, việc sử dụng toàn thân các kháng thể chủ vận đặc hiệu với 4-1BB có miền Fc có hoạt tính chức năng cũng cảm ứng sự mở rộng tế bào T CD8+ liên quan đến độ độc trong gan (Dubrot et al., 2010) mà được làm giảm hoặc được cải thiện đáng kể khi không có các thụ thể Fc chức năng ở chuột nhắt. Trong các thử nghiệm lâm sàng ở người (ClinicalTrials.gov, NCT00309023), các kháng thể chủ vận 4-1BB cạnh tranh với Fc (BMS-663513) được sử dụng cứ ba tuần một lần trong 12 tuần làm ổn định bệnh cho những bệnh nhân mắc u hắc sắc tố, caxinom tế bào

buồng trứng hoặc caxinom tế bào thận. Tuy nhiên, cùng kháng thể đó dùng trong một thử nghiệm khác (NCT00612664) lại gây bệnh viêm gan độ 4 khiến phải kết thúc thử nghiệm (Simeone and Ascierto, 2012).

Tóm lại, rõ ràng là các số liệu tiền lâm sàng và lâm sàng sẵn có chứng tỏ rằng vẫn có nhu cầu lâm sàng cao đối với các chất chủ vận 4-1BB hữu hiệu. Tuy nhiên, các ứng viên thuốc thế hệ mới không những nên gắn một cách hiệu quả 4-1BB trên bề mặt của các tế bào sinh huyết và các tế bào nội mô mà còn nên có khả năng đạt việc gắn đó thông qua các cơ chế khác với cơ chế gắn kết với thụ thể Fc để tránh các tác dụng phụ không kiểm soát được. Khả năng gắn kết với các thụ thể Fc có thể được thực hiện thông qua việc ưu tiên gắn kết với và oligome hóa trên các gốc đặc hiệu với khối u hoặc liên quan đến khối u.

Các protein dung hợp gồm một miền ngoại bào của phối tử 4-1BB và mảnh kháng thể chuỗi đơn (Mueller et al., 2008; Hornig et al., 2012) hoặc phối tử 4-1BB đơn dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng (Zhang et al, 2007) đã được tạo ra. Tài liệu WO 2010/010051 mô tả thế hệ protein dung hợp gồm ba miền ngoài phối tử TNF liên kết với nhau và dung hợp với một phần kháng thể.

Tuy nhiên, vẫn cần phải có phân tử gắn kết kháng nguyên mới kết hợp gốc có khả năng gắn kết ưu tiên với các đích đặc hiệu với khối u hoặc liên quan đến khối u với gốc có khả năng tạo trime phối tử TNF đồng kích thích và có độ ổn định đủ để trở thành hữu ích về mặt dược lý. Phân tử gắn kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm cả hai tính chất này và bất ngờ là chúng tạo ra phối tử TNF dạng trime và theo đó có hoạt tính sinh học, mặc dù một trong số các miền ngoài phối tử TNF trime hóa nằm trên một polypeptit khác so với hai miền ngoài phối tử TNF còn lại của phân tử này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó, và

(c) miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai có khả năng liên kết ổn định.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ,

(i) polypeptit thứ nhất chứa miền CH1 hoặc miền CL và polypeptit thứ hai chứa miền CL hoặc miền CH1, một cách tương ứng, trong đó polypeptit thứ hai được liên kết với polypeptit thứ nhất bằng liên kết disulfua giữa miền CH1 và miền CL, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với miền CH1 hoặc miền CL bằng tác nhân liên kết peptit và trong đó polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử

TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với miền CL hoặc miền CH1 của polypeptit nêu trên, hoặc

(ii) lần lượt polypeptit thứ nhất chứa miền CH3 và polypeptit thứ hai chứa miền CH3, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với đầu tận C của miền CH3 bằng tác nhân liên kết peptit và trong đó polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của miền CH3 của polypeptit nêu trên, hoặc

(iii) lần lượt polypeptit thứ nhất chứa miền VH-CL hoặc miền VL-CH1 và polypeptit thứ hai chứa miền VL-CH1 hoặc miền VH-CL, trong đó polypeptit thứ hai được liên kết với polypeptit thứ nhất bằng liên kết disulfua giữa miền CH1 và miền CL, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với VH hoặc VL bằng tác nhân liên kết peptit và trong đó polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với VL hoặc VH của polypeptit đã nêu.

Theo một khía cạnh cụ thể, thành viên họ phối tử TNF này là thành viên đồng kích thích sự hoạt hóa tế bào T ở người. Do vậy, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó, trong đó thành viên họ phối tử TNF này đồng kích thích sự hoạt hóa tế bào T ở người. Cụ thể hơn, thành viên họ phối tử TNF này được chọn từ 4-1BBL và OX40L.

Theo một khía cạnh, thành viên họ phối tử TNF này là 4-1BBL.

Theo một khía cạnh khác, miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO:374 và SEQ ID NO:375, đặc biệt là trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:96.

Theo một khía cạnh khác, miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc mảnh của nó chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 và SEQ ID NO:96, đặc biệt là trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:96. Đặc biệt hơn, miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:96.

Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.

Theo một khía cạnh, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:5 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:6.

Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:5 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:183.

Theo một khía cạnh khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:97 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:184 hoặc SEQ ID NO:185.

Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) polypeptit thứ nhất chứa miền CH1 hoặc miền CL và polypeptit thứ hai chứa miền CL hoặc miền CH1, một cách tương ứng, trong đó polypeptit thứ hai được liên kết với polypeptit thứ nhất bằng liên kết disulfua giữa miền CH1 và miền CL,

và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với miền CH1 hoặc miền CL bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối bằng tác nhân liên kết peptit với miền CL hoặc miền CH1 của polypeptit đã nêu.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) polypeptit thứ nhất chứa miền CH1 và polypeptit thứ hai chứa miền CL, trong đó polypeptit thứ hai được liên kết với polypeptit thứ nhất bằng liên kết disulfua giữa miền CH1 và miền CL,

và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với miền CH1 bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với miền CL của polypeptit đã nêu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) polypeptit thứ nhất chứa miền CL và polypeptit thứ hai chứa miền CH1, trong đó polypeptit thứ hai được liên kết với polypeptit thứ nhất bằng liên kết disulfua giữa miền CH1 và miền CL,

và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với miền CL bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với miền CH1 của polypeptit đã nêu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể, mảnh kháng thể và protein gắn kết kháng nguyên khung.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là mảnh kháng thể.

Cụ thể, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích được chọn từ nhóm bao gồm mảnh kháng thể, phân tử Fab, phân tử Fab lai chéo, phân tử Fab chuỗi đơn, phân tử Fv, phân tử scFv, kháng thể miền đơn, protein gắn kết kháng nguyên aVH và kháng nguyên khung.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là protein gắn kết kháng nguyên khung.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế liên quan đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích. Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, trong đó kháng nguyên tế bào đích này được chọn từ nhóm bao gồm protein hoạt hóa nguyên bào sợi (Fibroblast Activation Protein-FAP), kháng nguyên caxinom phôi (Carcinoembryonic Antigen-CEA), Chondroitin Sulfat Proteoglycan liên quan đến u hắc sắc tố (Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan-MCSP), thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu mô (Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR), CD19, CD20 và CD33.

Theo một khía cạnh cụ thể, kháng nguyên tế bào đích là protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:100, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:101, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:102, và miền VL

bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:103, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:11 hoặc SEQ ID NO:104, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:105.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:9, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:10, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:11 và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:12.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:100, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:101, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:102, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:103, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:104, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:105.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, trong đó peptit bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 hoặc miền CL của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai và trong đó một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL hoặc miền CH1 trên chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó tác nhân liên kết peptit này là $(G4S)_2$, tức là tác nhân liên kết peptit của SEQ ID NO:13. Theo một khía cạnh, tác nhân liên kết peptit thứ nhất là $(G4S)_2$, tác nhân liên kết peptit thứ hai là GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:57) và tác nhân liên kết peptit thứ ba là $(G4S)_2$. Theo một khía cạnh khác, tác nhân liên kết peptit thứ nhất, thứ hai và thứ ba là $(G4S)_2$.

Sáng chế còn liên quan đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, bao gồm miền Fc gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai có khả năng liên kết ổn định.

Cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm (c) miền Fc gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai có khả năng liên kết ổn định còn bao gồm (a) phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, trong đó chuỗi nặng Fab được dung hợp ở đầu tận C với đầu tận N của miền CH2 trong miền Fc.

Theo một khía cạnh khác, miền Fc này là IgG, đặc biệt là miền Fc của IgG1 hoặc miền Fc của IgG4. Đặc biệt hơn, miền Fc này là miền Fc của IgG1. Theo một khía cạnh cụ thể, miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự kết hợp của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế liên quan đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, bao gồm (c) miền Fc gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai có khả năng liên kết ổn định, trong đó miền Fc bao gồm một hoặc nhiều cải biến thay thế axit amin làm giảm sự gắn kết với thụ thể Fc, cụ thể là đối với thụ thể Fcγ.

Cụ thể, miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin ở các vị trí 234 và 235 (đánh số theo EU) và/hoặc 329 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng IgG. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa phối tử họ trime TNF theo sáng chế mà bao gồm miền Fc của IgG1 có cải biến thay thế axit amin L234A, L235A và P329G (đánh số theo EU).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

peptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ thứ hai bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai,

và peptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu được dung hợp ở đầu tận C của nó lần lượt với chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng thứ hai bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó peptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 mà là một phần của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai,

và peptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL mà là một phần của chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó peptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL mà là một phần của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai,

và peptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 mà là một phần của chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó peptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền VH mà là một phần của chuỗi nặng, bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai

và peptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền VL mà là một phần của chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó trong miền CL liền kề với thành viên họ phối tử TNF này, axit amin ở vị trí 123 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng arginin (R) và axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo EU) đã được thế bằng lysin (K), và trong đó trong miền CH1 liền kề với thành viên họ phối tử TNF này, các axit amin ở vị trí 147 (đánh số theo EU) và ở vị trí 213 (đánh số theo EU) đã được thế bằng axit glutamic (E).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

(a) chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99, và

chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

(a) phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP, và

(b) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99, và

chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO.115, SEQ ID NO:139 và SEQ ID NO:148, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:114 và SEQ ID NO:115.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119 và SEQ ID NO:173, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120 và SEQ ID NO:174.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa miền CH3 và polypeptit thứ hai chứa miền CH3, một cách tương ứng, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với đầu tận C của miền CH3 bằng tác nhân liên kết peptit và trong đó polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của miền CH3 của polypeptit đã nêu.

Cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên này chứa trime phối tử họ TNF bao gồm hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP. Cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:121, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:122, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:19, hoặc

(ii) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:123, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:124, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, hoặc

(iii) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:126, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:127, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125.

Theo một khía cạnh cụ thể khác nữa, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó kháng nguyên tế bào đích là CD19.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:195 hoặc SEQ ID NO:252, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:196 hoặc SEQ ID NO:253, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:197 hoặc SEQ ID NO:254, và

miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:198 hoặc SEQ ID NO:249, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:199 hoặc SEQ ID NO:250, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:200 hoặc SEQ ID NO:251.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202 hoặc trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:111 và SEQ ID NO:113, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112 và SEQ ID NO:114.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119 và SEQ ID NO:173, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120 và SEQ ID NO:174.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19. Cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, 29, 30 và 32 đến 34, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:209, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:210, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:206, hoặc

(ii) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:213, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:214, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:206, hoặc

(iii) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:309, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:310, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:279, hoặc

(iv) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:313, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:314, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:279.

Theo một khía cạnh cụ thể khác nữa, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó kháng nguyên tế bào đích này là CEA.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó gốc này có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:321, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:322, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:323, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của

SEQ ID NO:324, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:325, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:326.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó gốc này có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và vùng chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:330.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:330,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:111 và SEQ ID NO:113, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112 và SEQ ID NO:114.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:330,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119 và SEQ ID NO:173, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120 và SEQ ID NO:174.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA. Cụ thể là, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:337, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:338, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334, hoặc

(ii) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:341, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:342, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó thành viên họ phối tử TNF này là OX40L. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54, đặc biệt là trình tự axit amin của SEQ ID NO:53.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, 10 đến 24, 29, 30, 32 đến 34, 38 đến 40, 44 và 45, bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:371 hoặc SEQ ID:372 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó kháng nguyên tế bào đích là protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP) và gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:100, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:101, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:102, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:103, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:11 hoặc SEQ ID NO:104, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:105.

Cụ thể là, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:355, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:356.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây. Sáng chế còn đề xuất vectơ, cụ thể là vectơ biểu hiện, bao gồm polynucleotit được phân lập theo sáng chế và tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit được phân lập hoặc vectơ theo sáng chế. Theo một số phương án, tế bào vật chủ này là tế bào nhân điển hình, 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 chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, bao gồm các bước (i) nuôi cấy tế bào vật chủ theo sáng chế trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên, và (ii) thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên này. Sáng chế còn bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF được tạo ra theo phương pháp của sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế và ít nhất một tá dược dược dụng.

Ngoài ra, sáng chế còn bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, hoặc dược phẩm theo sáng chế, để dùng làm thuốc. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, hoặc dược phẩm theo sáng chế, để sử dụng để điều trị bệnh ở cá thể cần

điều trị. Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, hoặc dược phẩm theo sáng chế, dùng để điều trị bệnh ung thư.

Đồng thời sáng chế đề xuất việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế để bào chế thuốc để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị, cụ thể là để bào chế thuốc để điều trị bệnh ung thư, cũng như phương pháp điều trị bệnh ở cá thể, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể đã nêu dùng một lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị của dược phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế ở dạng dược dụng. Theo một phương án cụ thể, bệnh này là bệnh ung thư. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, cá thể được ưu tiên là động vật có vú, đặc biệt là người.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện các thành phần để lắp ráp phối tử 4-1BB trime người đã chia tách. Fig.1A thể hiện phối tử dime được dung hợp ở đầu tận C với miền CH1 hoặc miền CL ở người hoặc miền VL hoặc miền VH và Fig.1B thể hiện phối tử monome được dung hợp với miền CL hoặc miền CH1 ở người hoặc miền VL hoặc miền VH. Fig.1C thể hiện phối tử dime được dung hợp ở đầu tận N với miền CH3 ở người và Fig.1D thể hiện phối tử monome được dung hợp ở đầu tận N với miền CH3 ở người.

Fig.2 thể hiện phân tử gắn kết kháng nguyên chứa 4-1BBL-trime có các cấu trúc từ 1.1 đến 1.10 theo sáng chế. Việc điều chế và sản xuất các cấu trúc này được mô tả trong Ví dụ 1. Các miền VH và VL là các miền của kháng thể kháng FAP 28H1, điểm màu đen đặc ký hiệu cho cải biến "tra khóa vào ổ". * ký hiệu cho cải biến axit amin trong miền CH1 và miền CL (còn được gọi là các gốc mang điện).

Fig.3 thể hiện các thành phần để lắp ráp phối tử 4-1BB trime chuột đã chia tách. Fig.3A thể hiện phối tử dime được dung hợp ở đầu tận C với miền CL ở chuột và Fig.3B thể hiện phối tử monome được dung hợp ở đầu tận C với miền CH1 ở chuột. Các thành phần để lắp ráp phối tử 4-1BB trime chuột đã chia tách hướng đích FAP. Fig.3C thể hiện phân tử gắn kết kháng nguyên chứa 4-1BBL-trime ở chuột được lắp ráp như được mô tả chi tiết hơn trong Ví dụ 1.3.

Fig.4 thể hiện phân tử gắn kết kháng nguyên chứa 4-1BBL-trime có các cấu trúc từ 2.1 đến 2.6 theo sáng chế. Việc điều chế và sản xuất các cấu trúc này được mô tả

trong Ví dụ 2. Các miền VH và VL là các miền của kháng thể kháng FAP 4B9, điểm màu đen đặc ký hiệu cho cải biến "tra khóa vào ổ". * ký hiệu cho cải biến axit amin trong miền CH1 và miền CL (còn được gọi là các gốc mang điện).

Fig.5A và Fig.5B thể hiện các biến thể "không được hướng đích" của cấu trúc 1.1 và cấu trúc 1.2 bao gồm phân tử Fab DP47 thay vì phân tử Fab kháng FAP. Các phân tử này lần lượt được gọi là Đối chứng A và Đối chứng B. Quy trình tạo ra được mô tả trong Ví dụ 1.4. Fig.5C là hình vẽ thể hiện cấu trúc Fc(kih) 4-1BB monome như được tạo ra trong Ví dụ 3.

Fig.6 thể hiện sự gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (trime 4-1BBL đã chia tách FAP, các hình tròn đặc) hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB không hướng đích DP-47 (trime 4-1BBL đã chia tách DP47, các hình tròn rỗng) với PMBC người đang nghỉ (chưa qua thí nghiệm) hoặc được hoạt hóa. Cụ thể, sự gắn kết với các tế bào T CD8+ người đang nghỉ (chưa qua thí nghiệm) hoặc được hoạt hóa được thể hiện trên Fig.6A, với các tế bào T CD4+ người đang nghỉ (chưa qua thí nghiệm) hoặc được hoạt hóa trên Fig.6B, với các tế bào NK người đang nghỉ (chưa qua thí nghiệm) hoặc được hoạt hóa trên Fig.6C. Được thể hiện trên hình vẽ là sự gắn kết dưới dạng mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) của mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người được đánh dấu Phycoerythrin (R-PE) của tảo đỏ lớn mà được sử dụng làm kháng thể phát hiện thứ cấp. MFI được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy và đường cơ sở được hiệu chuẩn bằng cách trừ đi MFI của mẫu đối chứng trống.

Sự gắn kết của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime ở người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP khác nhau với các tế bào T biểu hiện 4-1BB người từ các PBMC người được hoạt hóa lại kháng CD3 người/kháng CD28 người và được tiền hoạt hóa bằng PHA-L và Proleukin được thể hiện trên Fig.7. Việc gắn kết được phát hiện bằng mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người liên hợp với R-Phycoerythrin-flocrom. Được thể hiện trên hình vẽ là mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) so với nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm từ 1.1 đến 1.10 của Ví dụ 1. Để thể hiện tốt hơn, các đường cong gắn kết được chia tách thành bốn biểu đồ khác nhau với Cấu trúc 1.1 (Fc (kih)) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích FAP hóa trị một và Đối chứng B (Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia

tách không hướng đích hóa trị một với phần lai chéo CH-CL và các gốc mang điện) làm đường cong so sánh. Việc gắn kết được theo dõi trên các tế bào T CD3+ CD8+ (Fig.7A) và các tế bào T CD45+ CD3+ CD4+ (Fig.7B). Mức biểu hiện 4-1BB trên các tế bào T CD8 thường thì cao hơn so với trên các tế bào T CD4. Tất cả các phiên bản đều gắn kết với 4-1BB người với ái lực khá tương tự nhau.

Fig.8 thể hiện sự gắn kết của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP khác nhau với các tế bào T CD4+ hoặc CD8+ từ các PBMC sạch (Fig.8A) hoặc với 4-1BB người biểu hiện các PBMC người được tiền hoạt hóa PHA-L và Proleukin và được tái hoạt hóa kháng CD3 người/kháng CD28 người (Fig.8B). Việc gắn kết được phát hiện bằng mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người được liên hợp với R-Phycoerythrin-flocrom. Được thấy trên hình vẽ là mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) so với nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 và 2.6 trong Ví dụ 2 và các phân tử đối chứng Đối chứng B, Đối chứng C, Đối chứng E và Đối chứng F. Để thể hiện tốt hơn, các đường cong gắn kết được chia tách thành hai biểu đồ khác nhau với cấu trúc 2.1 (Fc (kih)) của phối tử 4-1BB trime người được chia tách hướng đích FAP hóa trị một và đối chứng B (Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách không hướng đích hóa trị một với phần lai chéo CH-CL và các gốc mang điện) làm đường cong so sánh. Việc gắn kết được theo dõi trên các tế bào T CD45+ CD3+ CD8+ (các biểu đồ ở phía dưới) và các tế bào T CD45+ CD3+ CD4+ (các biểu đồ ở phía trên). Mức biểu hiện 4-1BB trên các tế bào T CD8 bình thường cao hơn so với trên các tế bào T CD4. Tất cả các cấu trúc này đều gắn kết với 4-1BB người với ái lực khá tương tự nhau, trong khi đó cấu trúc hóa trị hai 2.3 và đối chứng C không được hướng đích của nó thể hiện MFI thấp hơn. Điều này có thể là do trở ngại lập khi gắn kết 4-1BB và/hoặc sự phát hiện kém hơn do kháng thể phát hiện thứ hai được cảm ứng bởi phối tử 4-1BB đã chia tách được liên hợp với Fc.

Trên Fig.9 là sự gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (trime 4-1BBL được chia tách FAP, các hình tròn đặc) hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB không hướng đích DP47 (trime 4-1BBL được chia tách DP47; các hình tròn rỗng) với các tế bào lách chuột nhắt đã được hoạt hóa. Cụ thể, sự gắn kết với các tế bào T CD4+ chuột nhắt đã được hoạt hóa được thể hiện trên Fig.9A và với các tế bào T CD8+ chuột

nhắt đã được hoạt hóa trên Fig.9B. Kháng thể P329G LALA của IgG1 người đặc hiệu CD137 kháng chuột nhắt (dòng vô tính Lob12.3) được dùng làm đối chứng dương (các hình tam giác). Sự gắn kết được đặc trưng bằng cách vẽ biểu đồ MFI của mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu Fcγ kháng IgG người được đánh dấu R-PE mà được dùng làm kháng thể phát hiện thứ cấp so với nồng độ tính theo nM của các cấu trúc trime của 4-1BBL thử nghiệm đã chia tách. MFI được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy và đường cơ sở được hiệu chuẩn bằng cách trừ đi MFI của mẫu đối chứng trống.

Fig.10 thể hiện sự gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB (các hình tròn đặc: Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP Cấu trúc 1.1, các hình tròn rỗng: Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB không hướng đích DP47 Đối chứng A với dòng tế bào MV-3 và (B) dòng tế bào WM-266-4 u hắc sắc tố ở người(A) biểu hiện protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP). Việc gắn kết được đặc trưng bằng cách vẽ biểu đồ MFI của mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người được đánh dấu R-PE mà được dùng làm kháng thể phát hiện thứ cấp so với nồng độ tính theo nM các cấu trúc trime 4-1BBL đã chia tách được thử nghiệm. MFI được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy và đường cơ sở được hiệu chuẩn bằng cách trừ đi MFI của mẫu đối chứng trống.

Trên Fig.11 là sự gắn kết của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP khác nhau với các tế bào MV-3 u hắc sắc tố ở người biểu hiện FAP người (Fig.11A) và/hoặc các tế bào nguyên bào sợi phôi chuột nhắt được truyền nhiễm dòng vô tính 39 NIH/3T3-huFAP (Fig.11B) được thể hiện. Sự gắn kết được phát hiện bằng các mảnh IgG F(ab`)2 dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người được liên hợp với R-Phycoerythrin-flocrom hoặc floresxein-flocrom. Được thấy trên hình vẽ là mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) so với nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm. Để thể hiện tốt hơn, các đường cong gắn kết được phân bố vào bốn (Fig.11A) hoặc hai biểu đồ (Fig.11B), trong khi đó cấu trúc 1.1 (Fc (kih)) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích FAP hóa trị một được dùng làm đường cong so sánh. Tất cả các cấu trúc này đều gắn kết với FAP người với ái lực tương tự trừ các cấu trúc được hướng đích FAP hóa trị hai (các cấu trúc 1.5, 1.7 và 1.8). Chúng cho thấy xu hướng có giá trị EC50 thấp hơn và mật độ phát huỳnh quang trung bình thấp hơn. Điều này có thể được giải thích bằng việc hướng đích hóa trị hai của chúng (ái lực

càng cao thì càng ít phân tử có thể gắn kết đồng thời do sự chiếm giữ của hai epitop khiến cho mức MFI thấp hơn). Sự khác biệt cấu trúc cũng có thể giải thích cho sự khác biệt giữa Cấu trúc 1.8 (hướng đích hóa trị hai hoàn toàn) và các cấu trúc 1.5 và 1.7 (hướng đích hóa trị hai chỉ một phần).

Trên Fig.12 sự gắn kết của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP khác nhau 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 và 2.6 với các tế bào MV-3 u hắc sắc tố ở người biểu hiện FAP người (Fig.12A) và các tế bào WM-266-4 u hắc sắc tố ở người biểu hiện FAP người (Fig.12B) được thể hiện. Sự gắn kết được phát hiện bằng các mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người liên hợp với R-Phycoerythrin-flocrom. Được thấy trên hình vẽ là mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) so với nồng độ của các cấu trúc được thử nghiệm. Để thể hiện tốt hơn, các đường cong gắn kết được phân bố vào hai biểu đồ, trong khi đó cấu trúc 2.1 (Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích FAP hóa trị một) được dùng làm đường cong so sánh. Tất cả các cấu trúc đều gắn kết với FAP người với ái lực tương tự trừ cấu trúc hướng đích FAP hóa trị hai 2.3. Nó có xu hướng có các giá trị EC50 thấp hơn và mật độ phát huỳnh quang trung bình thấp hơn. Điều này có thể được giải thích bằng việc hướng đích hóa trị hai của nó, mà tạo ra ái lực cao hơn nhưng chiếm giữ ít hơn hoặc các phân tử FAP trên bề mặt tế bào tạo ra mức MFI thấp hơn.

Fig.13 thể hiện sự gắn kết của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime chuột nhắt đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP khác nhau với các tế bào T CD4+ hoặc CD8+ từ các tế bào lá lách tươi (Fig.13A) hoặc với 4-1BB chuột nhắt biểu hiện các tế bào lá lách chuột nhắt hoạt hóa các kháng thể chủ vận đơn dòng kháng CD23 chuột nhắt/kháng CD28 chuột nhắt (Fig.13B). Sự gắn kết được phát hiện bằng mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu Fcγ kháng IgG chuột nhắt liên hợp với FITC-flocrom. Được thấy trên hình vẽ là mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) so với nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm. Việc gắn kết được theo dõi trên các tế bào T CD3+ CD8+ (biểu đồ bên trái) và các tế bào T CD45+ CD3+ CD4+ (biểu đồ bên phải). Mức biểu hiện 4-1BB trên các tế bào T CD8 bình thường cao hơn so với trên các tế bào T CD4. Tất cả các cấu trúc đều gắn kết với 4-1BB chuột nhắt với ái lực khá tương tự.

Sự gắn kết của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime chuột nhắt đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP khác nhau với các tế bào khối u biểu hiện FAP người được thể hiện trên Fig.14. Sự gắn kết được phát hiện bằng mảnh F(ab`)2 của

IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG chuột nhắt được liên hợp với FITC-flocrom. Được thấy trên hình vẽ là mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) so với nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm. Sự gắn kết được theo dõi trên các tế bào MV-3 (Fig.14A) và các tế bào WM-266-4 (Fig.14B). Các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime chuột nhắt đã chia tách hướng đích FAP M.1 và M.2 gắn kết với FAP với ái lực khá tương tự.

Fig.15 thể hiện sơ đồ minh họa nguyên tắc chung của thử nghiệm hoạt tính NFkB được mô tả trong Ví dụ 6.1 bằng cách sử dụng dòng tế bào báo cáo. Được thấy trên hình vẽ là thử nghiệm hoạt hóa được thiết lập với dòng tế bào báo cáo HeLa biểu hiện 4-1BB người. Việc liên kết ngang của 4-1BB biểu hiện trên các tế bào báo cáo cảm ứng sự hoạt hóa NFκB và sự biểu hiện Luciferaza qua trung gian NFκB. Sau khi phân giải các tế bào, Luciferaza có thể xúc tác sự oxi hóa của Luciferin thành Oxyluciferin. Phản ứng hóa học này liên quan tích cực đến cường độ biểu hiện Luciferaza qua trung gian NFκB và có thể được xác định bằng cường độ ánh sáng phát ra (đơn vị ánh sáng phát ra). Tỷ lệ giữa các tế bào khối u biểu hiện FAP với dòng tế bào báo cáo HeLa-huCD137-NFkB-luc là 5 với 1.

Trên Fig.16 thể hiện rằng sự hoạt hóa của con đường truyền tín hiệu NFkB bằng phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (Cấu trúc 1.1) phụ thuộc nghiêm ngặt vào sự gắn kết của nó với các tế bào đích biểu hiện FAP. Các tế bào HeLa báo cáo NFkB biểu hiện CD137 ở người được nuôi cấy đồng thời với các tế bào khối u đã chỉ định có các mức biểu hiện FAP trên bề mặt tế bào khác nhau. Hoạt tính luciferaza được đánh giá như được mô tả trong Ví dụ 6.1 sau khi nuôi cấy các tế bào khi có hoặc không có các phân tử chứa 4-1BBL ở các nồng độ đã chỉ định trong 6 giờ. Các hình tròn đặc thể hiện Cấu trúc 1.1. Các hình tròn rỗng thể hiện phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB không hướng đích DP47 (Đối chứng A). Dòng vô tính 39 của dòng tế bào NIH/3T3-FAP người được dùng làm các tế bào đích trong biểu đồ (A), biểu đồ (B) thể hiện sự hoạt hóa với dòng tế bào MV3 dưới dạng tế bào đích và biểu đồ (C) với dòng tế bào WM-266-4 dưới dạng tế bào đích. Hoạt tính được đặc trưng bằng cách vẽ biểu đồ các đơn vị ánh sáng phát ra (URL) đo được trong khoảng thời gian 0,5 giây so với nồng độ tính theo nM của các cấu trúc trime 4-1BBL đã chia tách được thử nghiệm. Các URL được phát xạ do sự oxy hóa qua trung gian luciferaza của luciferin thành oxyluciferin.

Fig.17 thể hiện sự biểu hiện và hoạt tính luciferaza được cảm ứng bởi sự hoạt hóa NFκB vnhư được xác định bằng thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 6.1. Số lượng ánh sáng phát ra trong mỗi giây (CPS) được xác định trong 0,5 giây/lỗ và được vẽ biểu đồ dựa vào nồng độ được sử dụng của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách không hướng đích hoặc hướng đích FAP. Các tế bào báo cáo HeLa biểu hiện 4-1BB ở người được ủ trong 6 giờ khi không có (Fig.17A) hoặc có dòng tế bào u hắc sắc tố ở người biểu hiện FAP người liên kết ngang MV-3 (Fig.17B) hoặc WM-266-4 (Fig.17C). CPS được xác định và được vẽ biểu đồ dựa vào các nồng độ của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP khác nhau. Tỷ lệ tế bào là một tế bào báo cáo HeLa biểu hiện 4-1BB người với năm tế bào khối u. Để thể hiện tốt hơn, các đường cong hoạt hóa được chia tách thành bốn biểu đồ biểu hiện khác nhau với cấu trúc 1.1 (Fc (kih)) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích FAP hóa trị một và đối chứng B (Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách không hướng đích hóa trị một với phần lai chéo CH-CL và các gốc mang điện) làm đường cong so sánh. Fig.17A thể hiện sự hoạt hóa không có các tế bào khối u biểu hiện FAP liên kết ngang, Fig.17B thể hiện sự hoạt hóa với sự có mặt của các tế bào khối u MV-3 biểu hiện FAP liên kết ngang và Fig.17C thể hiện sự hoạt hóa với sự có mặt của các tế bào khối u WM-266-4 biểu hiện FAP liên kết ngang.

Fig.18 thể hiện sự biểu hiện và hoạt tính luciferaza cảm ứng bởi sự hoạt hóa NFκB như được xác định đối với các cấu trúc trong Ví dụ 2. Các đơn vị ánh sáng phát ra (URL) được xác định trong 0,5 giây/lỗ và được vẽ biểu đồ dựa vào nồng độ được sử dụng của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách không hướng đích hoặc hướng đích FAP. Các tế bào báo cáo HeLa biểu hiện 4-1BB người được ủ trong 6 giờ khi có hoặc không có dòng tế bào u hắc sắc tố người MV-3 hoặc WM-266-4 biểu hiện FAP người liên kết ngang. Các URL được xác định và được vẽ biểu đồ dựa vào các nồng độ của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP khác nhau 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 và 2.6 và các đối chứng B, C, E và F. Tỷ lệ tế bào là một tế bào báo cáo HeLa biểu hiện 4-1BB với năm tế bào khối u. Để thể hiện tốt hơn, các đường cong hoạt hóa được chia tách thành hai biểu đồ biểu hiện khác nhau với cấu trúc 2.1 (Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích FAP hóa trị một).

Trên Fig.19 là thử nghiệm hoạt hóa được thiết lập với dòng tế bào báo cáo T293-HEK biểu hiện 4-1BB khỉ đuôi dài được thể hiện. Sự liên kết ngang của 4-1BB khỉ đuôi dài biểu hiện trên các tế bào báo cáo gây cảm ứng sự hoạt hóa NFκB và sự biểu hiện Luciferaza qua trung gian NFκB. Sau khi phân giải các tế bào, Luciferaza có thể xúc tác sự oxi hóa của Luciferin thành Oxyluciferin. Phản ứng hóa học này liên quan tích cực đến cường độ biểu hiện Luciferaza qua trung gian NFκB và có thể được xác định bằng cường độ ánh sáng phát ra (các đơn vị ánh sáng phát ra).

Fig.20 thể hiện sự biểu hiện và hoạt tính Luciferaza cảm ứng bởi sự hoạt hóa NFκB. Các đơn vị ánh sáng phát ra (URL) được xác định trong 0,5 giây/lỗ và được vẽ biểu đồ dựa vào nồng độ được sử dụng của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách không hướng đích hoặc hướng đích FAP. Các tế bào báo cáo T293-HEK biểu hiện 4-1BB khỉ đuôi dài được ủ trong 6 giờ khi có hoặc không có dòng tế bào u hắc sắc tố người MV-3 hoặc WM-266-4 biểu hiện FAP người liên kết ngang. Các URL được xác định và được vẽ biểu đồ dựa vào các nồng độ của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP khác nhau. Tỷ lệ tế bào là một tế bào báo cáo T293-HEK biểu hiện 4-1BB với năm tế bào MV-3 hoặc hai tế bào WM-266-4. Để thể hiện tốt hơn, các đường cong hoạt hóa được chia tách thành hai biểu đồ khác nhau với Cấu trúc 2.1 làm đường cong so sánh.

Fig.21: Sơ đồ này minh họa nguyên tắc của thử nghiệm hoạt hóa tế bào T mô tả trong Ví dụ 6.3. Được thấy trên hình vẽ là sơ lược về thử nghiệm hoạt hóa được thiết lập với các tế bào T CD8 đặc hiệu với HLA-A2-NLV và dòng tế bào MV-3 u sắc tố ở người HLA-A2+ FAP+ được tạo xung NLV với sự có mặt của nồng độ được chuẩn độ khác nhau của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách không hướng đích hoặc hướng đích FAP. Các tế bào này được ủ trong 28 giờ, 4 giờ cuối với sự có mặt của Golgi-Stop chứa monesin. Tỷ lệ giữa các tế bào T CD8 đặc hiệu với NLV với các tế bào khối u MV-3 là 1:8.

Các hình vẽ Fig.22A-Fig.22E và Fig.23A-Fig. 23E thể hiện thử nghiệm hoạt hóa với các tế bào T CD8 đặc hiệu với HLA-A2-NLV và dòng tế bào MV-3 u sắc tố ở người HLA-A2+ FAP+ được tạo xung NLV với sự có mặt của nồng độ được chuẩn độ khác nhau các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP khác nhau như được tạo ra trong Ví dụ 1. Để thể hiện tốt hơn,

các đường cong biểu hiện được chia tách thành một vài biểu đồ biểu hiện khác nhau với Cấu trúc 1.1 (Fc (kih)) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích FAP hóa trị một và Đối chứng B (Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách không hướng đích hóa trị một) làm đường cong so sánh. Các kết quả thu được trong bốn thử nghiệm tương tự độc lập và cho thấy rằng sự tiết IFNγ kéo dài và sự biểu hiện CD137 kéo dài của các tế bào T CD8+ đặc hiệu với NLV phụ thuộc nghiêm ngặt vào sự hoạt hóa đồng thời của các tế bào T thông qua sự nhận diện của phức NLV-HLA-A2 (tín hiệu 1) và sự khởi đầu 4-1BB bởi 4-1BBL người đã chia tách hướng đích FAP (tín hiệu 2). Tác dụng của việc điều hòa tăng 4-1BB được thể hiện trên các biểu đồ trên Fig.22, trong khi đó tác dụng của việc biểu hiện INFγ của các tế bào T CD8+ được thể hiện trong các biểu đồ trên Fig.23. Tần suất tính theo phần trăm của các tế bào dương tính trong toàn bộ quần thế tế bào T CD8+ luôn được thể hiện. Tất cả các biến thể hướng đích FAP đều cảm ứng sự cải thiện hoạt hóa tương tự của các tế bào T CD8 đã hoạt hóa bằng NLV-peptit được thể hiện trên Fig.22 dưới dạng điều hòa tăng 4-1BB (vòng phản hồi dương) và trên Fig.23 dưới dạng biểu hiện IFNγ sau 24 giờ kích thích. Sự khác biệt giữa các đường cong nằm trong khoảng độ lệch sai số thông thường và không đáng kể.

Các hình vẽ Fig.24 và Fig.25 thể hiện thử nghiệm hoạt hóa với các tế bào T CD8 đặc hiệu với HLA-A2-NLV và dòng tế bào MV-3 u sắc tố người HLA-A2+ FAP+ được tạo xung NLV với sự có mặt của nồng độ được chuẩn độ của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP khác nhau trong Ví dụ 2. Để thể hiện tốt hơn, các đường cong biểu hiện được chia tách thành hai biểu đồ biểu hiện khác nhau với Cấu trúc 2.1 (Fc (kih)) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích FAP hóa trị một) và đối chứng B làm đường cong so sánh. Tất cả các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích FAP đều cho thấy sự cải thiện hoạt hóa tương tự của các tế bào T CD8 đặc hiệu HLA-A2-NLV-peptit được thể hiện trên Fig.24 dưới dạng điều hòa tăng 4-1BB (vòng phản hồi dương) và trên Fig.25 dưới dạng biểu hiện IFNγ sau 24 giờ kích thích. Sự khác biệt giữa các đường cong nằm trong khoảng độ lệch sai số thông thường và không đáng kể.

Fig.26: Sơ đồ này minh họa thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 6.4.

Fig.27 thể hiện việc cảm ứng sự tăng sinh tế bào T CD8+. Được thấy trên hình vẽ là tần suất tăng sinh của các tế bào T CD8+ so với nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm.

Fig.28A thể hiện thử nghiệm PK liều đơn của Cấu trúc 1.2 và Đối chứng B ở các con chuột nhắt NOG khỏe mạnh. Được thấy trên hình vẽ là độ dốc nồng độ của cấu trúc theo thời gian. Fig.28B thể hiện các kết quả của thử nghiệm PK liều đơn của các cấu trúc 2.1, 2.3, Đối chứng B và Đối chứng C ở các con chuột nhắt NOG có khối u được biến đổi giống như của người bằng các tế bào gốc. Fig.28C thể hiện thử nghiệm PK liều đơn so sánh cấu trúc 2.1 và cấu trúc 2.3 ở các con chuột nhắt NOG khỏe mạnh.

Fig.29 thể hiện các thành phần để lắp ráp phối tử 4-1BB trime người đã chia tách. Fig.29A thể hiện phối tử dime được dung hợp ở đầu tận C với miền CL người có đột biến E123R và đột biến Q124K (các gốc mang điện) và Fig.29B thể hiện phối tử 4-1BB monome được dung hợp với miền CH1 người có đột biến K147E và đột biến K213E (các gốc mang điện). Các thành phần này để lắp ráp phân tử gắn kết kháng nguyên (cấu trúc 3.3) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích CD19 hóa trị hai (71-254). Fig.29C thể hiện phối tử dime được dung hợp với đầu tận C của chuỗi ổ IgG1 Fc của người. Fig.29D thể hiện phối tử monome được dung hợp với đầu tận C của chuỗi khóa IgG1 Fc của người.

Fig.30 thể hiện các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa 4-1BBL-trime hướng đích CD19 có các cấu trúc từ 3.1 đến 3.6 theo sáng chế. Việc điều chế và sản xuất các cấu trúc này được mô tả trong Ví dụ 3. Miền VH và miền VL là các miền của kháng thể 8B8-018 kháng CD19, điểm màu đen đặc ký hiệu cho cải biến "tra khóa và ổ". * ký hiệu cho cải biến axit amin trong miền CH1 và miền CL (còn được gọi là các gốc mang điện).

Trên Fig.31A được minh họa là chiến lược sắp xếp ngẫu nhiên đối với các vùng CDR của dòng vô tính ban đầu 8B8. Được thấy trên hình vẽ là các miền biến đổi của dòng vô tính ban đầu 8B8 và các vùng CDR (đóng khung) theo phương pháp đánh số của Kabat. (X) là các vị trí được sắp xếp ngẫu nhiên. Fig.31B là phần mô tả sơ lược các chiến lược tạo thư viện. Được thấy trên hình vẽ là chiến lược khuếch đại PCR và tách dòng dùng để tạo ra thư viện gốc 8B8 có A) các vùng CDR1 và CDR2 được sắp xếp ngẫu nhiên trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoặc B) các vùng CDR1 và CDR3 được sắp xếp ngẫu nhiên trong chuỗi nhẹ và vùng CDR3 trong chuỗi nặng. Các enzym tương ứng dùng để tách dòng thành thể thực khuẩn được chỉ ra.

Fig.32 thể hiện quá trình căn thẳng dòng vô tính 8B8 kháng CD19 ban đầu với tác nhân gắn kết có ái lực trưởng thành được chọn. Được thể hiện trên các hình vẽ là các

trình tự của dòng vô tính 8B8 và tất cả các tác nhân gắn kết có ái lực trưởng thành được chọn. CDR của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đều được tạo khung.

Fig.33 thể hiện phân tích SPR của dòng vô tính 8B8 ban đầu và các biến thể có ái lực trưởng thành của nó. Được thể hiện trên hình vẽ này là sơ đồ cảm biến của dòng vô tính 8B8 và các dẫn xuất có ái lực trưởng thành của nó mà không có các điểm nóng LCDR1 N27d và N28.

Fig.34A minh họa việc thiết lập thử nghiệm xác định sự gắn kết đồng thời của 4-1BBL trime đã chia tách hướng đích CD19 với hu4-1BB và huCD19 (Ví dụ 8.2).

Các biểu đồ trên Fig.35 thể hiện sự gắn kết đồng thời của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp 4-1BBL FC trime hướng đích CD19 có các cấu trúc 3.1, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 và 4.4 (Chất phân tích 1) với 4-1BB người và CD19 người đã được làm bất động (Chất phân tích 2).

Fig.36 thể hiện sự gắn kết của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích CD19 khác nhau với các tế bào T CD4 và CD8 biểu hiện 4-1BB của các PBMC người được tiền hoạt hóa PHA-L và Proleukin và tái hoạt hóa kháng CD3 người/kháng CD28 người. Sự gắn kết được phát hiện bằng mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người liên hợp với R-Phycoerythrin-flocrom. Được thấy trên hình vẽ là t mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) so với nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm. Để thể hiện tốt hơn, các đường cong gắn kết được chia tách thành ba biểu đồ khác nhau với Cấu trúc 3.4 và đối chứng F (HuIgG1 P329G LALA đối chứng isotyp) làm đường cong so sánh. Sự gắn kết được theo dõi trên các tế bào T CD45+ CD3+ CD8+ (Fig.36A) và các tế bào T CD45+ CD3+ CD4+ (Fig.36B). Mức biểu hiện 4-1BB trên các tế bào T CD8 bình thường cao hơn so với trên các tế bào T CD4. Tất cả các cấu trúc đều gắn kết với 4-1BB người với ái lực khá tương tự.

Fig.37 thể hiện sự kết của phân tử gắn kết kháng nguyên Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích CD19 với các dòng tế bào u lympho tế bào B biểu hiện CD19 người: u lympho tế bào B không phải Hodgkin lớn lan tỏa SU-DHL-8 (37A), bệnh bạch cầu lympho tiền chất tế bào B cấp tính Nalm6 (37B), u lympho nguyên bào tế bào lớn tan tỏa Toledo (37C) và u lympho tế bào B lớn lan tỏa OCI-Ly18 (37D). Sự gắn kết được phát hiện bằng các mảnh F(ab`)2 của IgG dê

đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người liên hợp với R-Phycoerythrin-flocrom. Được thấy trên hình vẽ là mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) so với nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm. Để thể hiện tốt hơn, các đường cong gắn kết được chia tách thành ba biểu đồ khác nhau với Cấu trúc 3.4 và đối chứng F (HuIgG1 P329G LALA đối chứng isotyp) làm đường cong so sánh. Tất cả các cấu trúc đều gắn kết với CD19 người với ái lực khá tương tự.

Fig.38 thể hiện sự biểu hiện và hoạt tính Luciferaza cảm ứng bởi sự hoạt hóa NFκB của phân tử gắn kết kháng nguyên Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích CD19. Các đơn vị ánh sáng phát ra (URL) được xác định trong 0,5 giây/lỗ và được vẽ biểu đồ dựa vào nồng độ được sử dụng của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích CD19 có cấu trúc 3.1 và cấu trúc 3.3 và các phân tử đối chứng B và C. Các tế bào báo cáo HeLa biểu hiện 4-1BB người được ủ trong 7,5 giờ khi không có hoặc có các tế bào SU-DHL-8 hoặc Pfeiffer biểu hiện CD19 người liên kết ngang. Các URL được xác định và được vẽ biểu đồ dựa vào các nồng độ của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích CD19 khác nhau. Tỷ lệ tế bào là một tế bào báo cáo HeLa biểu hiện 4-1BB với 2,5 hoặc năm tế bào khối u.

Fig.39 thể hiện sự gắn kết của các biến thể đã được biến đổi giống như của người khác nhau của IgG T84.66 trên các tế bào canxinom tuyến dạ dày ở người biểu hiện CEA. Dựa vào số liệu, biến thể đã được biến đổi giống như của người 1 được chọn để đưa nó vào phân tử gắn kết kháng nguyên Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người hướng đích CEA.

Fig.40 thể hiện phân tử gắn kết kháng nguyên chứa 4-1BBL-trime hướng đích CEA có các cấu trúc từ 5.1 đến 5.6 theo sáng chế. Việc điều chế và sản xuất các cấu trúc này được mô tả trong Ví dụ 11. Miền VH và miền VL là các miền của kháng thể T84.66-LCHA kháng CEA, điểm màu đen đặc ký hiệu cho cải biến "tra khóa vào ổ". * ký hiệu cho cải biến axit amin trong miền CH1 và miền CL (còn được gọi là các gốc mang điện).

Fig.41A thể hiện phần mô tả sơ lược về NA3B3A2-avi His của người, kháng nguyên dùng để đánh giá sự gắn kết của các phân tử gắn kết kháng nguyên Fc (kih) của 4-1BBL trime đã chia tách hướng đích CEA. Fig.41B minh họa việc thiết lập thử nghiệm

xác định sự gắn kết đồng thời của 4-1BBL trime đã chia tách hướng đích CEA với hu4-1BB và NA3B3A2 của người (Ví dụ 12.1).

Các biểu đồ trên Fig.42 thể hiện sự gắn kết đồng thời của các phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc của 4-1BBL trime được hướng đích CEA có các cấu trúc 5.4, 5.6, 5.7 và 5.8 (Chất phân tích 1) với 4-1BB người và NA3B3A2 người được làm bất động (Chất phân tích 2).

Sự gắn kết của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích CEA khác nhau với các tế bào T CD4 và CD8 biểu hiện 4-1BB của các PBMC người được tiền hoạt hóa PHA-L và Proleukin và được tái hoạt hóa kháng CD3 người/kháng CD28 người được thể hiện trên Fig.43. Sự gắn kết được phát hiện bằng mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người được liên hợp với R-Phycoerythrin-flocrom. Được thấy trên hình vẽ là mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) so với nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm. Để thể hiện tốt hơn, các đường cong gắn kết được chia tách thành hai biểu đồ khác nhau với cấu trúc 5.4 và đối chứng F (HuIgG1 P329G LALA đối chứng isotyp) làm đường cong so sánh. Sự gắn kết được theo dõi trên các tế bào T CD45+ CD3+ CD8+ (các biểu đồ ở phía dưới) và các tế bào T CD45+ CD3+ CD4+ (các biểu đồ ở phía trên). Mức biểu hiện 4-1BB trên các tế bào T CD8 bình thường cao hơn so với trên các tế bào T CD4. Tất cả các cấu trúc đều gắn kết với với 4-1BB người ái lực khá tương tự.

Fig.44 thể hiện sự gắn kết của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích CEA với dòng tế bào dạ dày người MKN-45 biểu hiện CEA người (bên trái) và dòng tế bào caxinom tuyến ruột kết trực tràng ở người LS180 (bên phải). Sự gắn kết được phát hiện bằng các mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người liên hợp với R-Phycoerythrin-flocrom. Được thấy trên hình vẽ là mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) so với nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm.

Fig.45 thể hiện sự biểu hiện và hoạt tính Luciferaza cảm ứng bởi sự hoạt hóa NFκB của phân tử gắn kết kháng nguyên Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích CEA. Các đơn vị ánh sáng phát ra (URL) được xác định trong 0,5 giây/lỗ và được vẽ biểu đồ dựa vào nồng độ được sử dụng của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng

đích CEA 5.4, 5.6, 5.7 và 5.8 và các phân tử đối chứng. Các tế bào báo cáo HeLa biểu hiện 4-1BB người được ủ trong 6 giờ khi có hoặc không có dòng tế bào ung thư dạ dày ở người MKN-45 biểu hiện CEA người liên kết ngang. Tỷ lệ tế bào là một tế bào báo cáo HeLa biểu hiện 4-1BB với ba tế bào khối u.

Trên các hình vẽ Fig.46A và Fig.46B thể hiện các thành phần để lắp ráp phối tử OX40 người dạng trime đã chia tách hướng đích FAP hóa trị một (cấu trúc 6.1). Fig.46A thể hiện phối tử dime được dung hợp với miền IgG1-CL của người, Fig.46B thể hiện phối tử monome được dung hợp với miền IgG1-CH1 của người. Fig.46C thể hiện phân tử gắn kết kháng nguyên chứa OX40L-trime hướng đích FAP Cấu trúc 6.1. Trên Fig.46D được thể hiện là IgG1 PGLALA của người "không hướng đích" DP47 (đối chứng F).

Fig.47A thể hiện sự gắn kết của Ox40L trime người đã chia tách hướng đích FAP với các tế bào WM-266-4 dương tính với FAP. Các tế bào WM-266-4 biểu hiện protein hoạt hóa nguyên bào sợi ở người (huFAP) với mức cao. Chỉ các cấu trúc Fc (kih) của phối tử OX4O hướng đích FAP (hình vuông đặc) mà không phải đối chứng 5 (hình thoi đặc) được gắn kết với các tế bào WM-266-4. Được thể hiện trên hình vẽ là mức gắn kết dưới dạng mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) của mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người được đánh dấu Floresxein isothioxyanat (FITC) mà được sử dụng làm kháng thể phát hiện thứ cấp. MFI được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy. Trục x thể hiện nồng độ của các cấu trúc kháng thể. Fig.47B thể hiện sự gắn kết của cấu trúc Fc (kih) của phối tử OX4O hướng đích FAP với các tế bào A549 NucLight Red âm tính với Ox40 người. Cấu trúc Fc (kih) của phối tử OX4O hướng đích FAP cho thấy không gắn kết với tế bào khối u A549 âm tính với OX40 âm tính với FAP. Được thể hiện trên hình vẽ là mức gắn kết dưới dạng mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) của mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người được đánh dấu FITC mà được sử dụng làm kháng thể phát hiện thứ cấp. MFI được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy và đường cơ sở được hiệu chuẩn bằng cách trừ đi MFI của mẫu đối chứng trống.

Trên Fig.48A là sự gắn kết của FAP-Ox40L với các tế bào T CD4 người đang nghỉ và được hoạt hóa được thể hiện. Ox40 không được biểu hiện trên các tế bào T CD4 nghỉ ở người (bên trái). Khi không có các tế bào biểu hiện Ox40 người thì không quan sát thấy gắn kết (các biểu đồ bên trái). Sau khi hoạt hóa các PBMC người thì Ox40 được

điều hòa tăng trên các tế bào T CD4+ (phía bên phải). FAP-Ox40L được gắn kết với các tế bào T CD4 đã được hoạt hóa Ox40^{+}. Được thể hiện trên hình vẽ là mức gắn kết dưới dạng mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) của mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người được đánh dấu FITC mà được sử dụng làm kháng thể phát hiện thứ cấp. MFI được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy và đường cơ sở được hiệu chuẩn bằng cách trừ đi MFI của mẫu đối chứng trống. Trục x thể hiện nồng độ của các cấu trúc kháng thể. Fig.48B thể hiện rằng Ox40 không được biểu hiện trên các tế bào T CD8 nghỉ ở người (bên trái). Khi không có các tế bào biểu hiện Ox40 người thì không quan sát thấy gắn kết (các biểu đồ bên trái). Sau khi hoạt hóa các PBMC người thì Ox40 được điều hòa tăng trên các tế bào T CD8+ (phía bên phải). Mức biểu hiện Ox40 trên các tế bào T CD8+ người thấp hơn so với trên các tế bào T CD4+ và thay đổi giữa các đối tượng cho và các thời điểm. Mức biểu hiện của Ox40 thấp trên các tế bào T CD8 được mô tả. FAp-Ox40L gắn kết với các tế bào T CD8 đã được hoạt hóa dương tính với Ox40. Được thể hiện trên hình vẽ là mức gắn kết dưới dạng mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) của mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng IgG người được đánh dấu FITC mà được sử dụng làm kháng thể phát hiện thứ cấp. MFI được xác định bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy và đường cơ sở được hiệu chuẩn bằng cách trừ đi MFI của mẫu đối chứng trống. Trục x thể hiện nồng độ của các cấu trúc kháng thể

Trên Fig.49 là sự hoạt hóa của con đường truyền tín hiệu NFκB bởi phân tử gắn kết kháng nguyên OX40L trime người đã chia tách hướng đích FAP (FAP-OX40L) trong các tế bào báo cáo HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 được thể hiện. Được thấy trên hình vẽ là sự hoạt hóa có (biểu đồ bên phải) hoặc không có (biểu đồ bên trái) liên kết ngang bằng kháng thể thứ cấp. Các tế bào báo cáo được nuôi cấy trong 5 giờ với sự có mặt của FAP-OX40L ở các nồng độ đã định có hoặc không có liên kết ngang mảnh F(ab)2 của IgG dê đặc hiệu với Fcγ kháng huIgG1 đa dòng thứ cấp theo tỷ lệ 1:2. Hoạt tính luciferaza được đánh giá như được mô tả trong Ví dụ 6.1. Hoạt tính được đặc trưng bằng cách vẽ biểu đồ các đơn vị ánh sáng phát ra (URL) xác định được trong khoảng thời gian 0,5 giây so với nồng độ tính theo nM của cấu trúc thử nghiệm. Các URL được phát xạ do sự oxy hóa qua trung gian luciferaza của luciferin thành oxyluciferin.

Sự hoạt hóa của NFκB bởi FAP-OX40L trong các tế bào báo cáo HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 khi có mặt các tế bào FAP+ được thể hiện trên Fig.50A.

Được thấy trên hình vẽ là sự hoạt hóa của con đường truyền tín hiệu NFκB trong các tế bào báo cáo bởi FAP-OX40L khi có mặt các tế bào FAP người biểu hiện NIH-3T3 biểu hiện FAP ở mức thấp (tỷ lệ 3 tế bào khối u FAP+ với 1 tế bào báo cáo). Hoạt tính luciferaza qua trung gian NFκB được đặc trưng bằng cách vẽ biểu đồ các đơn vị ánh sáng phát ra (URL), được xác định trong khoảng thời gian 0,5 giây, so với nồng độ tính theo nM của các hợp chất thử nghiệm. Các URL được phát xạ do sự oxy hóa qua trung gian luciferaza của luciferin thành oxyluciferin. Các giá trị là đường cơ sở được hiệu chuẩn bằng cách trừ đi URL của các mẫu đối chứng trống. Để so sánh tốt hơn, diện tích dưới đường cong của các đường cong đáp ứng liều lượng đã được vẽ biểu đồ tương ứng được định lượng dưới dạng chỉ thị cho khả năng chủ vận của từng cấu trúc. Việc so sánh được minh họa trên Fig.50B. Diện tích này được tính bằng cách sử dụng GraphPad Prism. Các giá trị là đường cơ sở được hiệu chuẩn bằng cách trừ đi trị số của mẫu đối chứng trống.

Fig.51 thể hiện sự đồng kích thích qua trung gian OX40 của PBMC nghỉ của người khởi động bởi TCR cận tối ưu (Ví dụ 15.5). Siêu liên kết ngang của FAP -Ox40L bởi sự có mặt của các tế bào NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39 đã thúc đẩy mạnh khả năng sống và tăng sinh trong các tế bào T CD4 và CD8 của người. Được thấy trên hình vẽ là số lượng sự kiện của các tế bào T CD4+ (trái) và CD8+ (phải) còn sống. Các giá trị đường cơ sở của các mẫu chỉ chứa CD3 kháng người (dòng vô tính V9, huIgG1), PBMC nghỉ của người và NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39 được trừ đi. Như vậy, tác dụng tăng cường sự đồng kích thích OX40 mà không phải tác dụng kích thích kháng CD3 cận tối ưu tự được thể hiện ở đây. Trên các hình vẽ này sự giải thoát kích thích TCR cận tối ưu của PBMC nghỉ ở người với sự tăng sinh FAP-Ox40L bất động trên bề mặt tế bào được thể hiện ở cuối trang.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như thường được sử dụng trong lĩnh vực mà sáng chế này có liên quan. Nhằm mục đích diễn giải bản mô tả này, các định nghĩa dưới đây sẽ được áp dụng và bất cứ khi nào phù hợp thì các thuật ngữ được sử dụng ở dạng số ít cũng sẽ bao gồm cả dạng số nhiều và ngược lại.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "phân tử gắn kết kháng nguyên" theo nghĩa rộng nhất của nó đề cập đến phân tử gắn kết đặc hiệu với thể quyết định kháng nguyên. Các ví dụ về phân tử gắn kết kháng nguyên là các kháng thể, mảnh kháng thể và protein gắn kết kháng nguyên khung.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích" đề cập đến phân tử polypeptit gắn kết đặc hiệu với thể quyết định kháng nguyên. Theo một khía cạnh, gốc gắn kết kháng nguyên này có khả năng hoạt hóa sự truyền tín hiệu thông qua kháng nguyên tế bào đích của nó. Theo một khía cạnh cụ thể, gốc gắn kết kháng nguyên này có thể định hướng đối tượng mà nó gắn vào (ví dụ trime phối tử họ TNF) đến điểm đích, ví dụ, đến loại cụ thể của tế bào khối u hoặc mô đỡ khối u mang thể quyết định kháng nguyên. Các gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm các kháng thể và các mảnh của chúng như cũng được định nghĩa trong bản mô tả. Ngoài ra, các gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm các protein gắn kết kháng nguyên khung như cũng được định nghĩa trong bản mô tả, ví dụ các miền gắn kết dựa trên các protein lặp được thiết kế hoặc các miền lặp được thiết kế (ví dụ xem WO 2002/020565).

Liên quan đến kháng thể hoặc mảnh của nó, thuật ngữ "gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích" đề cập đến phần phân tử mà bao gồm vùng gắn kết đặc hiệu với và bổ sung với một phần hoặc tất cả kháng nguyên. Gốc có khả năng gắn kết kháng nguyên đặc hiệu có thể được tạo ra, ví dụ, bằng một hoặc nhiều miền biến đổi kháng thể (còn được gọi là vùng biến đổi kháng thể). Cụ thể là, gốc có khả năng gắn kết kháng nguyên đặc hiệu bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH).

Thuật ngữ "kháng thể" trong bản mô tả này được sử dụng với nghĩa rộng nhất và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, các kháng thể một đặc hiệu và nhiều đặc hiệu (chẳng hạn, kháng thể hai đặc hiệu), và các mảnh kháng thể miễn là chúng có hoạt tính gắn kết kháng nguyên mong muốn.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến kháng thể thu được từ quần thể gồm các kháng thể gần như đồng nhất, tức là, từng kháng thể riêng lẻ trong quần thể giống hệt và/hoặc gắn kết với cùng một epitop, trừ các kháng

thể biến thể có thể có, chẳng hạn chứa những đột biến có trong tự nhiên hoặc phát sinh trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể này thường có mặt với lượng nhỏ. Trái với các chế phẩm kháng thể đa dòng mà thường chứa các kháng thể khác nhau được định hướng kháng các thể quyết định (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng được định hướng kháng một thể quyết định duy nhất trên kháng nguyên.

Thuật ngữ kháng thể "một đặc hiệu" như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ kháng thể có một hoặc nhiều điểm gắn kết, mỗi điểm này gắn kết với cùng một epitop của cùng một kháng nguyên. Thuật ngữ "hai đặc hiệu" có nghĩa là phân tử gắn kết kháng nguyên có khả năng gắn kết đặc hiệu với ít nhất hai thể quyết định kháng nguyên riêng biệt. Thông thường, phân tử gắn kết kháng nguyên hai đặc hiệu bao gồm hai điểm gắn kết kháng nguyên, mỗi điểm đó đặc hiệu đối với thể quyết định kháng nguyên khác nhau. Theo một số phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên hai đặc hiệu có khả năng gắn kết đồng thời hai thể quyết định kháng nguyên, đặc biệt là hai thể quyết định kháng nguyên biểu hiện trên hai tế bào riêng biệt.

Thuật ngữ "hóa trị" như được sử dụng trong sáng chế biểu thị sự có mặt của một số lượng cụ thể của các điểm gắn kết trong phân tử gắn kết kháng nguyên. Như vậy, các thuật ngữ "hóa trị hai", "hóa trị bốn", và "hóa trị sáu" lần lượt dùng để chỉ sự có mặt của hai điểm gắn kết, bốn điểm gắn kết, và sáu điểm gắn kết trong phân tử gắn kết kháng nguyên.

Các thuật ngữ "kháng thể có độ dài đầy đủ", "kháng thể nguyên vẹn", và "kháng thể đầy đủ" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả đề cập đến kháng thể có cấu trúc về cơ bản tương tự với cấu trúc kháng thể tự nhiên. "Kháng thể tự nhiên" đề cập đến các phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên có các cấu trúc thay đổi. Ví dụ, các kháng thể lớp IgG tự nhiên là các glycoprotein dạng heterotetrame khoảng 150.000 dalton, bao gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng được gắn kết bằng disulfua. Từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, tiếp theo là ba miền hằng định (CH1, CH2, và CH3), còn được gọi là vùng hằng định chuỗi nặng. Tương tự, từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, tiếp theo là miền hằng định chuỗi nhẹ (CL), còn được gọi là vùng hằng định chuỗi nhẹ. Chuỗi nặng của kháng thể có thể được gán vào một trong

năm loại, được gọi là α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG), hoặc μ (IgM), một số trong số các chuỗi nặng này có thể được chia tiếp thành các kiểu phụ, ví dụ, γ1 (IgG1), γ2 (IgG2), γ3 (IgG3), γ4 (IgG4), α1 (IgA1) và α2 (IgA2). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được gán vào một trong hai loại, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa vào trình tự axit amin của miền hằng định của nó.

"Mảnh kháng thể" đề cập đến phân tử khác với kháng thể nguyên vẹn mà bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn gắn kết với kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn này gắn kết với. Các ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm nhưng không bị giới hạn ở Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; kháng thể thể đôi, kháng thể thể ba, kháng thể thể bốn, mảnh Fab chữ thập; kháng thể thẳng; phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ scFv); và kháng thể miền đơn. Để có thêm thông tin về một số mảnh kháng thể nhất định, xem tài liệu Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Để có thêm thông tin về các mảnh scFv, xem tài liệu, ví dụ, Plückthun, trong The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, các trang 269-315 (1994); đồng thời xem tài liệu: WO 93/16185; và patent Mỹ số 5571894 và 5587458. Để bàn luận về các mảnh Fab và F(ab')2 gồm các gốc epitop gắn kết thụ thể cứu và có thời gian bán hủy *in vivo* tăng, xem patent Mỹ số 5869046. Kháng thể thể đôi là các mảnh kháng thể có hai điểm gắn kết kháng nguyên mà có thể có hóa trị hai hoặc hai đặc hiệu, ví dụ, xem các tài liệu EP 404097; 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 tài liệu Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Các 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 kháng thể. Theo một số phương án nhất định, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn ở người (Domantis, Inc., Waltham, MA; ví dụ, xem patent Mỹ số 6248516 B1). Các mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở phân hủy phân giải protein của kháng thể nguyên vẹn cũng như sản xuất bởi tế bào vật chủ tái tổ hợp (ví dụ E. coli hoặc thể thực khuẩn), như được mô tả trong bản mô tả này.

Việc phân hủy papain của kháng thể nguyên vẹn tạo ra hai mảnh gắn kết kháng nguyên giống nhau, được gọi là các mảnh "Fab" mỗi mảnh chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng và cả miền hằng định của chuỗi nhẹ và miền hằng định thứ nhất (CH1)

của chuỗi nặng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, như vậy, thuật ngữ "mảnh Fab" đề cập đến mảnh kháng thể bao gồm mảnh chuỗi nhẹ bao gồm miền VL và miền hằng định của chuỗi nhẹ (CL), và miền VH và miền hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Các mảnh Fab' khác với mảnh Fab bằng cách bổ sung vài gốc ở đầu tận carboxy của miền CH1 chuỗi nặng bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề kháng thể. Fab'-SH là các mảnh Fab' trong đó (các) gốc xystein của miền hằng định mang nhóm thiol tự do. Việc xử lý bằng pepsin tạo ra mảnh $F(ab')_2$ có hai điểm kết hợp kháng nguyên (hai mảnh Fab) và một phần của vùng Fc.

Thuật ngữ "mảnh Fab chữ thập" hoặc "mảnh xFab" hoặc "mảnh Fab lai chéo" đề cập đến mảnh Fab, trong đó vùng biến đổi hoặc vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được trao đổi. Hai hợp phần chuỗi khác nhau của phân tử Fab lai chéo là có thể có và có trong kháng thể hai đặc hiệu theo sáng chế: Một mặt, các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi, tức là phân tử Fab lai chéo bao gồm chuỗi peptit gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng hằng định chuỗi nặng (CH1), và chuỗi peptit gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng hằng định chuỗi nhẹ (CL). Phân tử Fab lai chéo này còn được gọi là $CrossFab_{(VLVH)}$. Mặt khác, khi vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab được trao đổi, phân tử Fab chéo bao gồm chuỗi peptit gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng hằng định chuỗi nhẹ (CL), và chuỗi peptit gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng hằng định chuỗi nặng (CH1). Phân tử Fab lai chéo này còn được gọi là $CrossFab_{(CLCH1)}$.

"Mảnh Fab chuỗi đơn" hoặc "scFab" là polypeptit gồm miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH), miền hằng định kháng thể 1 (CH1), miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL), miền hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể (CL) và tác nhân liên kết, trong đó các miền kháng thể và tác nhân liên kết nêu trên có một trong các trật tự sau theo hướng từ đầu tận N đến đầu tận C: a) VH-CH1-tác nhân liên kết-VL-CL, b) VL-CL-tác nhân liên kết-VH-CH1, c) VH-CL-tác nhân liên kết-VL-CH1 hoặc d) VL-CH1-tác nhân liên kết-VH-CL; và trong đó tác nhân liên kết nêu trên là polypeptit có ít nhất 30 axit amin, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 32 đến 50 axit amin. Các mảnh Fab chuỗi đơn nêu trên được ổn định thông qua liên kết disulfua tự nhiên giữa miền CL và miền CH1. Ngoài ra, các phân tử Fab chuỗi đơn này còn có thể được ổn định bằng cách tạo ra liên kết disulfua liên chuỗi thông qua việc chèn các gốc xystein (ví dụ vị trí 44 trong chuỗi nặng biến đổi và vị trí 100 trong vùng chuỗi nhẹ biến đổi theo đánh số Kabat).

"Mảnh Fab chuỗi đơn lai chéo" hoặc "x-scFab" là polypeptit gồm miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH), miền hằng định của kháng thể 1 (CH1), miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL), miền hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể (CL) và tác nhân liên kết, trong đó các miền kháng thể và tác nhân liên kết nêu trên có một trong các trật tự sau theo hướng từ đầu tận N đến đầu tận C: a) VH-CL-tác nhân liên kết-VL-CH1 và b) VL-CH1-tác nhân liên kết-VH-CL; trong đó VH và VL cùng nhau tạo thành điểm gắn kết kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên và trong đó tác nhân liên kết nêu trên là polypeptit có ít nhất 30 axit amin. Ngoài ra, các phân tử x-scFab này còn có thể được ổn định bằng cách tạo ra liên kết disulfua liên chuỗi thông qua việc chèn các gốc xystein (ví dụ vị trí 44 trong chuỗi nặng biến đổi và vị trí 100 trong vùng chuỗi nhẹ biến đổi theo đánh số Kabat).

"Mảnh biến đổi chuỗi đơn (scFv)" là protein dung hợp của các vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) và chuỗi nhẹ (V_L) của kháng thể, nối với peptit liên kết ngắn có từ mười đến khoảng 25 axit amin. Tác nhân liên kết này thường giàu glyxin để mềm dẻo, cũng như serin hoặc threonin để hòa tan, và có thể nối với đầu tận N của V_H với đầu tận C của V_L, hoặc ngược lại. Protein này giữ được tính đặc hiệu của kháng thể ban đầu, bất chấp việc loại bỏ các vùng hằng định và đưa tác nhân liên kết vào. Các kháng thể scFv được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-96). Ngoài ra, mảnh kháng thể bao gồm các polypeptit chuỗi đơn có các đặc tính của miền VH, cụ thể là có khả năng lắp ráp cùng với miền VL, hoặc miền VL, đặc biệt là có khả năng lắp ráp cùng với miền VH vào điểm gắn kết kháng nguyên chức năng và nhờ đó có được đặc tính gắn kết kháng nguyên của kháng thể có độ dài đầy đủ.

"Protein gắn kết kháng nguyên khung" đã được biết trong lĩnh vực liên quan, ví dụ, fibronectin và protein lặp ankyrin được thiết kế (DARPin) đã được dùng làm khung thay thế cho miền gắn kết kháng nguyên, xem các tài liệu, chẳng hạn, Gebauer and Skerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antigen therapeutics. Curr Opin Chem Biol 13:245-255 (2009) và Stumpp et al., Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today 13: 695-701 (2008). Theo một khía cạnh của sáng chế, protein gắn kết kháng nguyên khung được chọn từ nhóm bao gồm CTLA-4 (Evibody), các Lipocalin (Anticalin), phân tử thu được từ Protein A như miền Z của Protein A (Affibody), miền A (Avimer/Maxibody), transferin huyết thanh (thể *trans*); protein lặp ankyrin được thiết kế (DARPin), miền biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi

nặng của kháng thể (kháng thể miền đơn, sdAb), miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể thể (thể nano, aVH), các mảnh V_{NAR}, fibronectin (AdNectin), miền lectin kiểu C (Tetranectin); miền biến đổi của beta-lactamaza của thụ thể kháng nguyên mới (mảnh V_{NAR}), gama-crystallin hoặc ubiquitin ở người (phân tử Affilin); miền loại kunitz của các chất ức chế proteaza ở người, các vi thể như protein từ họ knottin, các aptame peptit và fibronectin (adnectin).

CTLA-4 (Kháng nguyên 4 liên quan đến lympho bào gây độc tế bào T - Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4) là thụ thể họ CD28 được biểu hiện chủ yếu trên các tế bào T CD4+. Miền ngoại bào của nó có nếp gấp Ig giống miền biến đổi. Các vòng xoắn tương ứng với các CDR của kháng thể có thể được thay thế bằng trình tự khác loại để đem lại các tính chất gắn kết khác nhau. Các phân tử CTLA-4 được xử lý kỹ thuật để có các tính chất gắn kết khác nhau cũng được biết đến là Evibody (ví dụ US7166697B1). Các Evibody có kích thước tầm giống như vùng biến đổi được phân lập của kháng thể (ví dụ kháng thể miền). Để có thêm thông tin chi tiết, xem tài liệu Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001).

Các lipocalin là họ protein ngoại bào vận chuyển các phân tử kỵ nước nhỏ như steroit, bilin, retinoit và lipit. Chúng có cấu trúc thứ cấp dạng tấm beta cứng có một vài vòng xoắn ở đầu mở của cấu trúc hình nón mà có thể được xử lý kỹ thuật để gắn kết với các kháng nguyên đích khác nhau. Các anticalin có kích thước nằm trong khoảng từ 160 đến 180 axit amin, và có nguồn gốc từ lipocalin. Để có thêm thông tin chi tiết, xem các tài liệu Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), US7250297B1 và US20070224633.

Affibody là khung thu được từ Protein A của *Staphylococcus aureus* mà có thể được xử lý kỹ thuật để gắn kết với kháng nguyên. Miền này gồm bó ba xoắn ốc có khoảng 58 axit amin. Các thư viện đã được tạo ra bằng cách sắp xếp ngẫu nhiên các gốc bề mặt. Để có thêm thông tin chi tiết, xem tài liệu: Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004) và EP 1641818A1.

Avime là các protein đa miền thu được từ họ khung miền A. Các miền tự nhiên có khoảng 35 axit amin chấp nhận cấu trúc gắn kết bằng disulfua đã xác định. Tính đa dạng được tạo ra bằng cách xáo trộn biến thể tự nhiên được biểu hiện bởi họ các miền A. Để

có thêm thông tin chi tiết, xem tài liệu: Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005) và Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (Tháng 6 năm 2007).

Transferin là glycoprotein vận chuyển huyết thanh monome. Các transferin có thể được xử lý kỹ thuật để gắn kết các kháng nguyên đích khác nhau bằng cách chèn các trình tự peptit trong vòng xoắn bề mặt cho phép. Các ví dụ về khung transferin đã được xử lý kỹ thuật bao gồm thể *Trans*. Để có thêm thông tin chi tiết, xem tài liệu: J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999).

Các protein lặp ankyrin được thiết kế (DARPin) có nguồn gốc từ Ankyrin là họ các protein điều tiết việc gắn protein màng nguyên vẹn vào bộ khung tế bào. Đơn vị lặp ankyrin đơn là môtip 33 gốc gồm hai xoắn alpha và một cuộn beta. Chúng có thể được xử lý kỹ thuật để gắn kết các kháng nguyên đích khác nhau bằng cách sắp xếp ngẫu nhiên các gốc trong xoắn alpha thứ nhất và cuộn beta của mỗi đơn vị lặp. Giao diện gắn kết của chúng có thể tăng lên bằng cách làm tăng số lượng môđun (phương pháp trưởng thành ái lực). Để có thêm thông tin chi tiết, xem tài liệu: J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) và J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) và US20040132028A1.

Kháng thể miền đơn là mảnh kháng thể gồm miền kháng thể biến đổi dạng monome đơn. Miền đơn thứ nhất có nguồn gốc từ miền biến đổi chuỗi nặng kháng thể từ họ lạc đà (thể nano hoặc mảnh V_HH). Ngoài ra, thuật ngữ kháng thể miền đơn bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng tự chủ ở người (aVH) hoặc các mảnh V_{NAR} thu được từ cá mập.

Fibronectin là khung có thể được xử lý kỹ thuật để gắn kết với kháng nguyên. Các adnectin gồm mạch chính của trình tự axit amin tự nhiên của miền thứ 10 gồm 15 đơn vị lặp của fibronectin người typ III (FN3). Ba vòng xoắn ở một đầu của kẹp .beta. có thể được xử lý kỹ thuật để làm cho Adnectin nhận diện đặc hiệu đích trị liệu đang quan tâm. Để có thêm thông tin chi tiết, xem tài liệu: Protein Eng. Des. Sel. 18, 435- 444 (2005), US20080139791, WO2005056764 và US6818418B1.

Các aptame peptit là phân tử nhận diện kết hợp gồm protein khung hằng định, thường là thioredoxin (TrxA) chứa vòng xoắn peptit biến đổi bị ràng buộc được chèn vào điểm hoạt tính. Để có thêm thông tin chi tiết, xem tài liệu: Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005).

Các vi thể có nguồn gốc từ vi protein có trong tự nhiên có độ dài từ 25 đến 50 axit amin chứa từ 3 đến 4 cầu xystein - các ví dụ về vi protein bao gồm KalataBI và conotoxin và knottin. Các vi protein có vòng xoắn có thể được xử lý kỹ thuật để bao gồm đến 25 axit amin mà không gây ảnh hưởng đến toàn bộ nếp gấp của vi protein đó. Để có thêm thông tin chi tiết về miền knottin được xử lý kỹ thuật, xem tài liệu WO2008098796.

"Phân tử gắn kết kháng nguyên gắn kết với cùng một epitop" làm phân tử tham chiếu đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên ngăn chặn sự gắn kết của phân tử tham chiếu với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh ở mức lớn hơn hoặc bằng 50%, và ngược lại, phân tử tham chiếu ngăn chặn sự gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh ở mức lớn hơn hoặc bằng 50%.

Thuật ngữ "miền gắn kết kháng nguyên" đề cập đến một phần của phân tử gắn kết kháng nguyên mà bao gồm vùng gắn kết đặc hiệu với và bổ sung với một phần hoặc tất cả kháng nguyên. Khi kháng nguyên lớn thì phân tử gắn kết kháng nguyên có thể chỉ gắn kết với một phần cụ thể của kháng nguyên đó, phần này được gọi là epitop. Miền gắn kết kháng nguyên có thể được tạo ra bởi, ví dụ, một hoặc nhiều miền biến đổi (còn được gọi là vùng biến đổi). Tốt hơn là, miền gắn kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể (VH).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "thể quyết định kháng nguyên" đồng nghĩa với "kháng nguyên" và "epitop", và đề cập đến điểm (ví dụ đoạn duỗi liền kề của các axit amin hoặc cấu hình cấu dạng tạo nên từ các vùng khác nhau của axit amin không liền 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. Các thể quyết định kháng nguyên hữu ích có thể được tìm thấy, ví dụ, trên bề mặt của các tế bào khối u, trên bề mặt của các tế bào nhiễm virut, 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 cơ chất ngoại bào (ECM). Các protein hữu ích để làm kháng nguyên ở đây có thể là protein dạng tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ người) và loài gặm nhấm (ví dụ chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Theo một phương án cụ thể, kháng nguyên là protein người. Khi đề cập đến protein cụ thể trong bản mô tả thì thuật ngữ này bao hàm cả protein không được xử lý có "độ dài đầy đủ" cũng như dạng protein bất kỳ thu được từ quá trình xử lý trong tế

bào. Thuật ngữ này còn bao hàm cả các biến thể có trong tự nhiên của protein, ví dụ các biến thể ghép nối hoặc các biến thể alen.

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" có nghĩa là sự gắn kết có chọn lọc đối với kháng nguyên và có thể được phân biệt với các tương tác không mong muốn hoặc không đặc hiệu. Khả năng của phân tử gắn kết kháng nguyên trong việc gắn kết với kháng nguyên cụ thể có thể được xác định bằng thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan, ví dụ, kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance -SPR) (được phân tích trên công 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 phân tử gắn kết kháng nguyên với protein không liên quan ít hơn khoảng 10% so với mức gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên với kháng nguyên như đã được xác định, ví dụ bằng SPR. Theo một số phương án nhất định, phân tử gắn kết với kháng nguyên có hằng số phân ly (Kd) là ≤ 1 µM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, $\leq 0,1$ nM, $\leq 0,01$ nM, hoặc $\leq 0,001$ nM (ví dụ 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, ví dụ từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M).

"Ái lực" hoặc "ái lực gắn kết" đề cập đến cường độ của tổng toàn bộ các tương tác không cộng hóa trị giữa một điểm gắn kết đơn lẻ của phân tử (ví dụ kháng thể) và thành phần gắn kết đi cùng của nó (ví dụ kháng nguyên). 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 nội tại phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp gắn kết (ví dụ kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với thành phần Y đi cùng của nó nhìn chung có thể được trình bày bằng hằng số phân ly (Kd), là tỷ lệ giữa hằng số tốc độ phân ly và liên kết (koff và kon, một cách tương ứng). Do vậy, các ái lực tương đương có thể bao gồm các hằng số tốc độ khác nhau, với điều kiện là tỷ lệ giữa các hằng số tốc độ vẫn y nguyên. Ái lực có thể được đo bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực liên quan, bao gồm các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Một phương pháp cụ thể để đo ái lực là cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

"Kháng nguyên tế bào đích" như được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến thể quyết định kháng nguyên có mặt 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 số phương án nhất định, kháng nguyên tế bào đích là kháng nguyên trên bề mặt của tế bào khối u. Theo một

phương án, kháng nguyên tế bào đích được chọn từ nhóm bao gồm protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), kháng nguyên caxinom phôi (CEA), Chondroitin Sulfat Proteoglycan liên quan đến u hắc sắc tố (MCSP), thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR), CD19, CD20 và CD33. Đặc biệt, kháng nguyên tế bào đích là protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP).

Thuật ngữ "protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP)", còn được biết đến là Prolyl endopeptidaza FAP hoặc Sepraza (EC 3.4.21), đề cập đến FAP tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ người), động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ đuôi dài) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ này bao gồm FAP chưa được xử lý có "độ dài đầy đủ" cũng như dạng FAP bất kỳ thu được từ quá trình xử lý trong tế bào. Thuật ngữ này còn bao gồm các biến thể có trong tự nhiên của FAP, chẳng hạn, các biến thể ghép nối hoặc các biến thể alen. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP của người, chuột nhắt và/hoặc khỉ đuôi dài. Trình tự axit amin của FAP người được thể hiện trong UniProt (www.uniprot.org) số tiếp cận Q12884 (phiên bản 149, SEQ ID NO:20), hoặc NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2. Miền ngoại bào (ECD) của FAP người kéo dài từ vị trí axit amin 26 đến vị trí axit amin 760. Trình tự axit amin và trình tự nucleotit của ECD của FAP người có đuôi His lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO 15 và SEQ ID NO 16. Trình tự axit amin của FAP chuột nhắt được thể hiện trong UniProt số tiếp cận P97321 (phiên bản 126, SEQ ID NO:23), hoặc NCBI RefSeq NP_032012.1. Miền ngoại bào (ECD) của FAP chuột nhắt kéo dài từ vị trí axit amin 26 đến vị trí axit amin 761. Các trình tự SEQ ID NO 24 và SEQ ID NO 25 lần lượt thể hiện trình tự axit amin và trình tự nucleotit của ECD của FAP chuột nhắt có đuôi His. Các trình tự SEQ ID NO 26 và SEQ ID NO 27 lần lượt thể hiện trình tự axit amin và trình tự nucleotit của ECD của FAP khỉ đuôi dài có đuôi His. Tốt hơn là, phân tử gắn kết kháng FAP theo sáng chế gắn kết với miền ngoại bào của FAP. Phân tử gắn kết kháng FAP lấy làm ví dụ được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/020006 A2.

Thuật ngữ "kháng nguyên caxinom phôi (CEA)", còn được biết đến là phân tử bám dính tế bào 5 liên quan đến kháng nguyên caxinom phôi (CEACAM5), đề cập đến CEA tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ người), động vật linh trưởng không phải người (ví dụ,

khỉ đuôi dài) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Trình tự axit amin của CEA người được thể hiện trong UniProt số tiếp cận P06731 (phiên bản 151, SEQ ID NO:28). CEA từ lâu đã được nhận biết là kháng nguyên liên quan đến khối u (Gold and Freedman, J Exp Med., 121:439-462, 1965; Berinstein N. L., J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002). Ban đầu CEA được phân loại là protein chỉ được biểu hiện trong mô bào thai, nhưng hiện nay nó còn được nhận biết trong một vài mô bình thường của người trưởng thành. Các mô này chủ yếu có nguồn gốc trong biểu mô, bao gồm các tế bào của dải dạ dày ruột non, đường hô hấp, và đường niệu-sinh dục, và các tế bào của ruột kết, cổ tử cung, tuyến mồ hôi, và tuyến tiền liệt (Nap et al., Tumour Biol., 9(2-3):145-53, 1988; Nap et al., Cancer Res., 52(8):2329-23339, 1992). Các khối u nguồn gốc biểu mô, cũng như dạng di căn của chúng, chứa CEA dưới dạng kháng nguyên liên quan đến khối u. Mặc dù sự có mặt của chính CEA không cho thấy sự biến đổi thành tế bào ung thư, nhưng sự phân bố của CEA mang tính chỉ báo. Trong mô bình thường, CEA thường được biểu hiện trên bề mặt đỉnh của tế bào (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)), khiến cho nó không thể tiếp cận với kháng thể trong dòng máu. Trái với mô bình thường, CEA có xu hướng được biểu hiện trên toàn bộ bề mặt của các tế bào ung thư (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)). Sự thay đổi kiểu biểu hiện này khiến CEA có thể tiếp cận với kháng thể gắn kết trong các tế bào ung thư. Ngoài ra, sự biểu hiện CEA cũng gia tăng trong các tế bào ung thư. Ngoài ra, sự biểu hiện CEA gia tăng này thúc đẩy sự bám dính tăng trong tế bào, điều này có thể dẫn đến di căn (Marshall J., Semin Oncol., 30(a Suppl. 8):30-6, 2003). Tỷ lệ biểu hiện hiện hành của CEA trong các khối u khác nhau nhìn chung là rất cao. Theo các số liệu đã công bố, chính các phân tích được thực hiện trong các mẫu mô đã xác nhận tỷ lệ hiện hành cao của nó, với khoảng 95% trong caxinom ruột kết trực tràng (CRC), 90% ở bệnh ung thư tuyến tụy, 80% ở bệnh ung thư dạ dày, 60% ở bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC, ở đó nó được đồng biểu hiện với HER3), và 40% ở bệnh ung thư vú; mức độ biểu hiện thấp được tìm thấy ở bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ và u nguyên bào thần kinh đệm.

CEA được phân cắt dễ dàng khỏi bề mặt tế bào và đi từ khối u vào dòng máu, trực tiếp hoặc thông qua mạch bạch huyết. Vì tính chất này, nồng độ CEA trong huyết thanh được sử dụng làm dấu ấn lâm sàng để chẩn đoán ung thư và sàng lọc khả năng tái phát ung thư, đặc biệt là ung thư trực tràng ruột kết (Goldenberg D M., The International

Journal of Biological Markers, 7:183-188, 1992; Chau I., et al., J Clin Oncol., 22:1420-1429, 2004; Flamini et al., Clin Cancer Res; 12(23):6985-6988, 2006).

Thuật ngữ "Chondroitin Sulfat Proteoglycan liên quan đến u hắc sắc tố (Melanoma associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan (MCSP)", còn được biết đến là Chondroitin Sulfat Proteoglycan 4 (CSPG4) đề cập đến MCSP tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ người), động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ đuôi dài) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Trình tự axit amin của MCSP người được thể hiện trong UniProt số tiếp cận Q6UVK1 (phiên bản 103, SEQ ID NO:29). Thuật ngữ "thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR)", còn được gọi là gen sinh ung thư c-ErbB-1 hoặc tyrosin-protein kinaza của thụ thể erbB-1, đề cập đến EGFR tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ người), động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ đuôi dài) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Trình tự axit amin của EGFR người được thể hiện trong UniProt số tiếp cận P00533 (phiên bản 211, SEQ ID NO:30).

Thuật ngữ "CD19" đề cập đến kháng nguyên lympho bào B CD19, còn được biết đến là kháng nguyên bề mặt lympho bào B B4 hoặc kháng nguyên bề mặt tế bào T Leu-12 và bao gồm CD19 tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, người), động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ đuôi dài) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Trình tự axit amin của CD19 người được thể hiện trong Uniprot số tiếp cận P15391 (phiên bản 160, SEQ ID NO:31). Thuật ngữ này bao gồm CD19 người chưa được xử lý có "độ dài đầy đủ" cũng như dạng bất kỳ của CD19 người mà thu được từ quá trình xử lý trong tế bào với điều kiện là kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này gắn kết vào đó. CD19 là thụ thể bề mặt tế bào riêng biệt về mặt cấu trúc được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào B của người, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tế bào tiền B, các tế bào B trong giai đoạn phát triển sớm {tức là, các tế bào B chưa trưởng thành), các tế bào B trưởng thành thông qua sự biệt hóa cuối cùng vào các tương bào, và các tế bào B ác tính. CD19 được biểu hiện ở hầu hết bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính tiền B (ALL), u lympho không phải Hodgkin, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính tế bào B (CLL), bệnh bạch cầu tiền lympho bào, bệnh bạch

cầu tế bào tóc, bệnh bạch cầu lympho bào cấp tính thông thường, và một số bệnh bạch cầu nguyên bào lympho không cấp tính. Sự biểu hiện của CD19 trên các tương bào còn gợi ý rằng nó có thể được biểu hiện trên các khối u tế bào B đã biệt hóa như đa u tủy. Do đó, kháng nguyên CD19 là đích cho trị liệu miễn dịch để điều trị u lympho không phải Hodgkin, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính và/hoặc bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính.

"CD20" chỉ kháng nguyên lympho bào B CD20, còn được biết đến là thành viên 1 của phân họ A gồm 4 miền kéo dài màng (MS4A1), kháng nguyên bề mặt lympho bào B B1 hoặc kháng nguyên bề mặt tế bào bạch cầu Leu-16, và bao gồm CD20 tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, người), động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ đuôi dài) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Trình tự axit amin của CD20 người được thể hiện trong Uniprot số tiếp cận P11836 (phiên bản 149, SEQ ID NO:32). "CD33" đề cập đến kháng nguyên bề mặt tế bào tủy CD33, còn được biết đến là SIGLEC3 hoặc gp67, và bao gồm CD33 tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, người), động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ đuôi dài) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Trình tự axit amin của CD33 người được thể hiện trong Uniprot số tiếp cận P20138 (phiên bản 157, SEQ ID NO:33).

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" đề cập đến miền của chuỗi nặng kháng thể hoặc chuỗi nhẹ kháng thể liên quan đến sự gắn kết giữa phân tử gắn kết kháng nguyên 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, trong đó mỗi miền bao gồm bốn vùng khung (FR) bảo toàn và ba vùng siêu biến (HVR). Xem tài liệu, chẳng hạn, Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., trang 91 (2007). Một miền VH hoặc VL đơn lẻ có thể là đủ để đem đến tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "HVR", như được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến mỗi trong số các vùng của miền biến đổi kháng thể mà siêu biến về trình tự và/hoặc tạo ra các vòng xoắn xác định về mặt cấu trúc ("vòng xoắn siêu biến"). Nhìn chung, các kháng thể bốn chuỗi tự nhiên gồm sáu HVR; ba trong VH (H1, H2, H3), và ba trong VL (L1, L2, L3). Các HVR thường bao gồm các gốc axit amin từ các vòng

xoắn siêu biến và/hoặc từ các "vùng xác định tính bổ sung" (CDR), các vùng xác định tính bổ sung có độ biến đổi trình tự cao nhất và/hoặc liên quan đến sự nhận diện kháng nguyên. Các vòng xoắn siêu biến lấy làm ví dụ có ở các gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3). (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).) Các CDR lấy làm ví dụ (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3) có ở các gốc axit amin 24-34 của L1, 50-56 của L2, 89-97 của L3, 31-35B của H1, 50-65 của H2, và 95-102 của H3. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) Vùng siêu biến (HVR) còn được gọi là vùng xác định tính bổ sung (CDR), và các thuật ngữ này được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này khi đề cập đến các phần của vùng biến đổi mà tạo thành vùng gắn kết kháng nguyên. Vùng cụ thể này đã được mô tả trong tài liệu Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) và trong tài liệu Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), trong đó định nghĩa này bao gồm tập chồng lặp hoặc tập hợp con của các gốc axit amin khi được so sánh với nhau. Tuy nhiên, việc sử dụng định nghĩa để đề cập đến CDR của kháng thể hoặc các biến thể của nó được dự định là nằm trong phạm vi của thuật ngữ như được định nghĩa và sử dụng trong bản mô tả. Các gốc axit amin thích hợp bao gồm các CDR như được định nghĩa trong mỗi trong các tài liệu tham khảo được trích dẫn ở trên được nêu dưới đây trong Bảng A dưới dạng so sánh. Số lượng gốc chính xác bao gồm cả CDR cụ thể sẽ thay đổi tùy thuộc vào trình tự và kích thước của CDR đó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định theo cách thông thường được gốc bao gồm CDR cụ thể nào sẽ tạo ra trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể.

Bảng A. Định nghĩa CDR[1]

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

[2] "AbM" với chữ in thường "b" như được sử dụng trong Bảng A đề cập đến các CDR như được định nghĩa bởi phần mềm xây dựng mô hình kháng thể "AbM" của Oxford Molecular.

Kabat *et al.* cũng đã xác định hệ thống đánh số cho các trình tự vùng biến đổi mà có thể áp dụng được cho kháng thể bất kỳ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan có thể không nghi ngờ gì mà gán hệ thống "đánh số theo Kabat" này cho trình tự vùng biến đổi bất kỳ, không cần dựa vào bất cứ số liệu thử nghiệm nào khác ngoài chính trình tự đó. Như được sử dụng trong bản mô tả, "đánh số theo Kabat" đề cập đến hệ thống đánh số nêu trong Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Trừ khi có quy định khác, đề cập đến việc đánh số các vị trí gốc axit amin cụ thể trong vùng biến đổi kháng thể là đều theo hệ thống đánh số Kabat.

Ngoại trừ CDR1 trong VH, các CDR thường bao gồm các gốc axit amin mà tạo thành vòng xoắn siêu biến. Các CDR còn bao gồm "các gốc quyết định tính đặc hiệu", hoặc "các SDR" mà là các gốc tiếp xúc với kháng nguyên. Các SDR có trong các vùng của CDR được viết tắt là - CDR, hoặc a-CDR. A-CDR lấy làm ví dụ (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, và a-CDR-H3) có ở các gốc axit amin 31-34 của L1, 50-55 của L2, 89-96 của L3, 31-35B của H1, 50-58 của H2, và 95-102 của H3. (Xem tài liệu: Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008).) Trừ khi có quy định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (chẳng hạn, các gốc FR) được đánh số trong bản mô tả này theo Kabat et al., nêu trên.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "trưởng thành ái lực" trong ngữ cảnh nói về phân tử gắn kết kháng nguyên (chẳng hạn, kháng thể) đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên thu được từ phân tử gắn kết kháng nguyên tham chiếu, chẳng hạn, bằng cách đột biến, gắn kết với cùng một kháng nguyên, tốt hơn là gắn kết với cùng một epitop, dưới dạng kháng thể tham chiếu; và có ái lực đối với kháng nguyên cao hơn so

với ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên tham chiếu. Sự trưởng thành ái lực thường liên quan đến sự biến đổi của một hoặc nhiều gốc axit amin trong một hoặc nhiều CDR của phân tử gắn kết kháng nguyên. Thông thường, phân tử gắn kết kháng nguyên trưởng thành ái lực gắn kết với cùng epitop giống như phân tử gắn kết kháng nguyên tham chiếu ban đầu.

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

Đối với các mục đích của sáng chế, "khung thể nhận ở người" là khung chứa trình tự axit amin của khung miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền biến đổi chuỗi nặng (VH) thu được từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người, như được định nghĩa dưới đây. Khung thể nhận ở người "thu được từ" khung globulin miễn dịch ở người hoặc khung liên ứng ở người có thể bao gồm cùng trình tự axit amin của nó, hoặc nó có thể chứa các thay đổi trình tự axit amin. Theo một số phương án, số lần thay đổi axit amin là nhỏ hơn hoặc bằng 10, nhỏ hơn hoặc bằng 9, nhỏ hơn hoặc bằng 8, nhỏ hơn hoặc bằng 7, nhỏ hơn hoặc bằng 6, nhỏ hơn hoặc bằng 5, nhỏ hơn hoặc bằng 4, nhỏ hơn hoặc bằng 3, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 2. Theo một số phương án, khung thể nhận ở người của VL là giống hệt về trình tự với trình tự khung globulin miễn dịch ở người của VL hoặc trình tự khung liên ứng ở người của VL.

Thuật ngữ kháng thể "khảm" đề cập đến kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ thu được từ nguồn hoặc loài cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ thu được từ nguồn hoặc loài khác.

"Lớp" kháng thể đề cập đến loại miền hằng định hoặc vùng hằng định mà chuỗi nặng của nó sở hữu. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài lớp trong số này có thể được chia tiếp thành các phân lớp (isotyp), ví dụ IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, và IgA_2. Các miền hằng 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.

Kháng thể "được biến đổi giống như của người" đề cập đến kháng thể khảm bao gồm các gốc axit amin từ các HVR không phải của người và các gốc axit amin từ các FR người. Theo một số phương án nhất định, kháng thể được biến đổi giống như của

người sẽ bao gồm gần như tất cả ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các HVR (chẳng hạn, các CDR) tương ứng với các HVR của kháng thể không phải của người, và tất cả hoặc gần như tất cả các FR tương ứng với các FR của kháng thể người. Kháng thể được biến đổi giống như của người tùy ý có thể bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể người. "Dạng được biến đổi giống như của người" của kháng thể, chẳng hạn, kháng thể không phải của người, đề cập đến kháng thể đã qua quá trình biến đổi giống như của người. Các dạng khác của "các kháng thể được biến đổi giống như của người" được bao gồm trong sáng chế là các dạng trong đó vùng hằng định đã được cải biến hoặc thay đổi thêm so với vùng hằng định của kháng thể ban đầu để tạo ra các tính chất theo sáng chế, đặc biệt là về việc gắn kết C1q và/hoặc gắn kết thụ thể Fc (FcR).

Kháng thể "của người" là kháng thể có trình tự axit amin tương ứng với trình tự axit amin của kháng thể sản sinh bởi người hoặc tế bào người hoặc thu được từ nguồn không phải người mà sử dụng các kho kháng thể người hoặc các trình tự mã hóa kháng thể người khác. Định nghĩa này về kháng thể người đặc biệt là không bao gồm kháng thể được biến đổi giống như của người bao gồm các gốc gắn kết kháng nguyên không phải của người.

Thuật ngữ "miền Fc" hoặc "vùng Fc" trong bản mô tả được sử dụng để xác định vùng đầu tận C của chuỗi nặng kháng thể chứa ít nhất một phần của vùng hằng định. Thuật ngữ này bao gồm các vùng Fc trình tự tự nhiên và các vùng Fc biến thể. Vùng Fc của IgG bao gồm miền CH2 của IgG và miền CH3 của IgG. "Miền CH2" của vùng Fc của IgG người thường kéo dài từ gốc axit amin ở khoảng vị trí 231 đến gốc axit amin ở khoảng vị trí 340. Theo một phương án, mạch hydrat cacbon được gắn vào miền CH2 này. Miền CH2 trong bản mô tả có thể là miền CH2 trình tự tự nhiên hoặc miền CH2 biến thể. "Miền CH3" bao gồm đoạn duỗi từ các gốc đầu tận C đến miền CH2 trong vùng Fc (tức là từ gốc axit amin ở khoảng vị trí 341 đến gốc axit amin ở khoảng vị trí 447 của IgG). Vùng CH3 trong bản mô tả có thể là miền CH3 trình tự tự nhiên hoặc miền CH3 biến thể (ví dụ miền CH3 có "phần nhô" ("khóa" được đưa vào trong một chuỗi của nó và "phần hốc" ("ổ") tương ứng được đưa vào trong chuỗi còn lại của nó; xem patent Mỹ số 5821333, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Các miền CH3 biến thể này có thể được sử dụng để thúc đẩy sự heterodime hóa của hai chuỗi nặng kháng thể không giống hệt nhau như được mô tả trong bản mô tả. Theo một phương án,

vùng Fc của chuỗi nặng IgG người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận C (Lys447) của vùng Fc có thể có mặt hoặc có thể không có mặt. 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 thống đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong tài liệu Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Công nghệ "tra khóa vào ổ" được mô tả trong các tài liệu, ví dụ, US 5731168; US 7695936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) và Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Nhìn chung, phương pháp này bao gồm việc đưa phần nhô ("khóa") ở giao diện của polypeptit thứ nhất và hốc tương ứng ("ổ") trong giao diện của polypeptit thứ hai, sao cho phần nhô có thể được định vị vào trong hốc nhằm thúc đẩy sự hình thành heterodime và sự hình thành homodime cản trở. Các phần nhô được tạo kết cấu bằng cách thay thế các chuỗi bên axit amin nhỏ từ giao diện của polypeptit thứ nhất bằng chuỗi bên lớn hơn (ví dụ tyrosin hoặc tryptophan). Các hốc bù có kích cỡ giống hệt hoặc tương tự với các phần nhô được tạo ra ở giao diện của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế các chuỗi bên axit amin lớn bằng các chuỗi bên axit amin nhỏ hơn (ví dụ alanin hoặc threonin). Phần nhô và hốc có thể được tạo ra bằng cách thay đổi axit nucleic mã hóa các polypeptit, ví dụ bằng cách tạo đột biến đặc hiệu điểm, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Theo một phương án cụ thể, cải biến khóa bao gồm cải biến thay thế axit amin T366W ở một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc, và cải biến ổ bao gồm cải biến thay thế axit amin T366S, L368A và Y407V ở một trong hai cấu trúc siêu phân tử còn lại của miền Fc. Theo một phương án cụ thể khác, cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bao gồm cải biến khóa còn bao gồm cải biến thay thế axit amin S354C, và cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bao gồm cải biến ổ còn bao gồm cải biến thay thế axit amin Y349C. Việc đưa hai gốc xystein này vào làm hình thành cầu disulfua giữa hai cấu trúc siêu phân tử của vùng Fc, như vậy, làm ổn định thêm dime (Carter, J Immunol Các phương pháp 248, 7-15 (2001)). Việc đánh số là theo chỉ số EU trong tài liệu Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch" được dự định là bao gồm các biến thể alen có trong tự nhiên của vùng Fc của globulin miễn dịch cũng như các

biến thể có các thay đổi mà tạo ra các cải biến thay thế, thêm vào, hoặc làm khuyết nhưng về cơ bản không làm giảm khả năng của globulin miễn dịch trong việc điều tiết các chức năng tác động (như độ gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể). Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có thể được là khuyết từ đầu tận N hoặc đầu tận C của vùng Fc của globulin miễn dịch mà không làm mất đáng kể chức năng sinh học. Các biến thể này có thể được chọn lọc theo các quy tắc chung đã biết trong lĩnh vực liên quan sao cho có tác động nhỏ nhất đến hoạt tính (xem tài liệu, chẳng hạn, Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-10 (1990)).

Thuật ngữ "chức năng tác động" dùng để chỉ các hoạt tính sinh học có thể quy cho vùng Fc của kháng thể mà thay đổi tùy lớp kháng thể. Các ví dụ về chức năng tác động của kháng thể bao gồm: chức năng gắn kết với C1q và gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC); chức năng gắn kết với thụ thể Fc; chức năng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC); chức năng thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP); chức năng tiết xytokin, chức năng hấp phụ kháng nguyên qua trung gian phức miễn dịch bởi các tế bào trình diện kháng nguyên, chức năng điều hòa giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B), và chức năng hoạt hóa tế bào B.

"Thụ thể Fc hoạt hóa" là thụ thể Fc mà sau khi gắn kết bằng vùng Fc của kháng thể thì tạo ra các sự kiện truyền tín hiệu kích thích tế bào mang thụ thể để thực hiện các chức năng tác động. Thụ thể Fc hoạt hóa bao gồm FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), và FcαRI (CD89). Thụ thể Fc hoạt hóa đặc biệt là FcγRIIIa người (xem UniProt số tiếp cận P08637, phiên bản 141).

Thuật ngữ "thành viên họ phối tử TNF" hoặc "phối tử họ TNF" đề cập đến xytokin tiền viêm. Xytokin nói chung, và cụ thể là các thành viên của họ phối tử TNF này, đóng vai trò chính trong việc kích thích và phối hợp của hệ miễn dịch. Hiện tại, mười chín xytokin đã được xác định là các thành viên của siêu họ phối tử TNF (yếu tố hoại tử khối u) trên cơ sở độ tương tự về trình tự, chức năng, và cấu trúc. Tất cả các phối tử này là protein xuyên màng typ II có miền ngoại bào (miền ngoài) đầu tận C, miền nội bào đầu tận N và miền xuyên màng đơn. Miền ngoại bào đầu tận C, được biết đến là miền tương đồng TNF (THD), có độ đồng nhất axit amin là 20-30% giữa các thành viên siêu họ và chịu trách nhiệm cho việc gắn kết với thụ thể. Miền ngoài TNF cũng chịu trách nhiệm đối với các phối tử TNF trong việc tạo thành các phức trime được nhận diện bởi các thụ thể đặc thù của chúng.

Các thành viên của họ phối tử TNF này được chọn từ nhóm bao gồm Lymphotoxin α (còn được biết đến là LTA hoặc TNFSF1), TNF (còn được biết đến là TNFSF2), LTβ (còn được biết đến là TNFSF3), OX40L (còn được biết đến là TNFSF4), CD40L (còn được biết đến là CD154 hoặc TNFSF5), FasL (còn được biết đến là CD95L, CD178 hoặc TNFSF6), CD27L (còn được biết đến là CD70 hoặc TNFSF7), CD30L (còn được biết đến là CD153 hoặc TNFSF8), 4-1BBL (còn được biết đến là TNFSF9), TRAIL (còn được biết đến là APO2L, CD253 hoặc TNFSF10), RANKL (còn được biết đến là CD254 hoặc TNFSF11), TWEAK (còn được biết đến là TNFSF12), APRIL (còn được biết đến là CD256 hoặc TNFSF13), BAFF (còn được biết đến là CD257 hoặc TNFSF13B), LIGHT (còn được biết đến là CD258 hoặc TNFSF14), TL1A (còn được biết đến là VEGI hoặc TNFSF15), GITRL (còn được biết đến là TNFSF18), EDA-A1 (còn được biết đến là ectodysplasin A1) và EDA-A2 (còn được biết đến là ectodysplasin A2). Thuật ngữ này đề cập đến phối tử họ TNF tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ, người), động vật linh trưởng không phải người (ví dụ, khỉ đuôi dài) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Theo các phương án cụ thể của sáng chế, thành viên họ phối tử TNF này được chọn từ nhóm bao gồm OX40L, FasL, CD27L, TRAIL, 4-1BBL, CD40L và GITRL. Theo phương án cụ thể, thành viên họ phối tử TNF này được chọn từ 4-1BBL và OX40L.

Thông tin khác, cụ thể là trình tự, của các thành viên họ phối tử TNF có thể được thu thập từ các cơ sở dữ liệu có thể tiếp cận được công khai như Uniprot (www.uniprot.org). Ví dụ, các phối tử TNF người có các trình tự axit amin sau: Lymphotoxin β người (UniProt số tiếp cận P01374, SEQ ID NO:34), TNF người (UniProt số tiếp cận P01375, SEQ ID NO:35), Lymphotoxin β người (UniProt số tiếp cận Q06643, SEQ ID NO:36), OX40L người (UniProt số tiếp cận P23510, SEQ ID NO:37), CD40L người (UniProt số tiếp cận P29965, SEQ ID NO:38), FasL người (UniProt số tiếp cận P48023, SEQ ID NO:39), CD27L người (UniProt số tiếp cận P32970, SEQ ID NO:40), CD30L người (UniProt số tiếp cận P32971, SEQ ID NO:41), 4-1BBL (UniProt số tiếp cận P41273, SEQ ID NO:42), TRAIL (UniProt số tiếp cận P50591, SEQ ID NO:43), RANKL (UniProt số tiếp cận O14788, SEQ ID NO:44), TWEAK (UniProt số tiếp cận O43508, SEQ ID NO:45), APRIL (UniProt số tiếp cận O75888, SEQ ID NO:46), BAFF (UniProt số tiếp cận Q9Y275, SEQ ID NO:47), LIGHT

(UniProt số tiếp cận O43557, SEQ ID NO:48), TL1A (UniProt số tiếp cận O95150, SEQ ID NO:49), GITRL (UniProt số tiếp cận Q9UNG2, SEQ ID NO:50) và ectodysplasin A (UniProt số tiếp cận Q92838, SEQ ID NO:51).

"Miền ngoài" là miền của protein màng kéo dài vào khoảng trống ngoại bào (tức là khoảng trống bên ngoài tế bào đích). Các miền ngoài thường là các phần của protein mà khởi đầu sự tiếp xúc với bề mặt, dẫn đến tải nạp tín hiệu. Do vậy, miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF như được định nghĩa trong bản mô tả đề cập đến phần protein của phối tử TNF kéo dài vào khoảng trống ngoại bào (miền ngoại bào) mà còn bao gồm các phần ngắn hơn hoặc các phân mảnh của nó mà chịu trách nhiệm cho việc trime hóa và việc gắn kết với thụ thể TNF tương ứng. Do vậy, thuật ngữ "miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc mảnh của nó" đề cập đến miền ngoại bào của thành viên họ phối tử TNF mà tạo nên miền ngoại bào hoặc đề cập đến các phần của nó mà vẫn có thể gắn kết với thụ thể (miền gắn kết thụ thể).

Thuật ngữ "thành viên họ phối tử TNF đồng kích thích" hoặc "phối tử họ TNF đồng kích thích" đề cập đến phân nhóm của các thành viên họ phối tử TNF, mà có khả năng đồng kích thích sự tăng sinh và sự sản sinh xytokin của các tế bào T. Các phối tử họ TNF này có thể đồng kích thích các tín hiệu TCR khi tương tác với các thụ thể TNF tương ứng của chúng và tương tác với các thụ thể của chúng dẫn đến việc lấy thêm các yếu tố liên quan đến TNFR (TRAF), làm khởi động các thác tín hiệu mà làm hoạt hóa tế bào T. Phối tử họ TNF đồng kích thích được chọn từ nhóm bao gồm 4-1BBL, OX40L, GITRL, CD70, CD30L và LIGHT, cụ thể hơn là thành viên họ phối tử TNF đồng kích thích được chọn từ 4-1BBL và OX40L.

Như được mô tả trên đây, 4-1BBL là protein xuyên màng typ II và là một thành viên của họ phối tử TNF này. 4-1BBL hoàn chỉnh hoặc có độ dài đầy đủ có trình tự axit amin của SEQ ID NO:42 đã được mô tả để tạo thành các trime trên bề mặt của tế bào. Sự hình thành các trime được cho phép bởi những chuyển động đặc thù của miền ngoài của 4-1BBL. Những chuyển động này được quy định trong bản mô tả là "vùng trime hóa". Các axit amin 50-254 của trình tự 4-1BBL người (SEQ ID NO:52) tạo thành miền ngoại bào của 4-1BBL, mà thậm chí cả các mảnh của nó cũng có thể tạo thành trime. Theo các phương án cụ thể của sáng chế, thuật ngữ "miền ngoài của 4-1BBL hoặc mảnh của nó" đề cập đến polypeptit có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:4 (axit amin 52-254 của 4-1BBL người), SEQ ID NO:1 (axit amin 71-254 của 4-1BBL người),

SEQ ID NO:3 (axit amin 80-254 của 4-1BBL người) và SEQ ID NO:2 (axit amin 85-254 của 4-1BBL người) hoặc polypeptit có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:96 (axit amin 71-248 của 4-1BBL người), SEQ ID NO:375 (axit amin 52-248 của 4-1BBL người), SEQ ID NO:374 (axit amin 80-248 của 4-1BBL người) và SEQ ID NO:373 (axit amin 85-248 của 4-1BBL người), nhưng cả các mảnh khác của miền ngoài có khả năng trime hóa cũng được bao gồm trong bản mô tả.

Như được mô tả trên đây, OX40L là một protein xuyên màng typ II khác và là thành viên khác của họ phối tử TNF. OX40L người hoàn chỉnh hoặc có độ dài đầy đủ có trình tự axit amin của SEQ ID NO:37. Các axit amin 51-183 của trình tự OX40L người (SEQ ID NO:53) tạo thành miền ngoại bào của OX40L, mà thậm chí cả các mảnh của nó cũng có thể tạo thành trime. Theo các phương án cụ thể của sáng chế, thuật ngữ "miền ngoài của OX40L hoặc mảnh của nó" đề cập đến polypeptit có trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:53 (axit amin 51-183 của OX40L người) hoặc SEQ ID NO:54 (axit amin 52-183 của OX40L người), nhưng cả các mảnh khác của miền ngoài có khả năng trime hóa cũng được bao gồm trong bản mô tả.

Thuật ngữ "tác nhân liên kết peptit" đề cập đến peptit bao gồm một hoặc nhiều axit amin, thường là trong khoảng từ 2 đến 20 axit amin. Các tác nhân liên kết peptit là đã biết trong lĩnh vực liên quan hoặc được mô tả trong bản mô tả này. Các tác nhân liên kết peptit thích hợp không sinh miễn dịch là, ví dụ, các tác nhân liên kết peptit $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ hoặc $G_4(SG_4)_n$, trong đó "n" thường là số nằm trong khoảng từ 1 đến 10, thường nằm trong khoảng từ 1 đến 4, đặc biệt 2, tức là các peptit được chọn từ nhóm bao gồm GGGGS (SEQ ID NO:128), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:13), SGGGGSGGGG (SEQ ID NO:55) và GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO:56), nhưng cũng bao gồm cả các trình tự GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:57), GSGSGSGS (SEQ ID NO:58), GSGSGNGS (SEQ ID NO:59), GGSGSGSG (SEQ ID NO:60), GGSGSG (SEQ ID NO:61), GGSG (SEQ ID NO:62), GGSGNGSG (SEQ ID NO:63), GGNGSGSG (SEQ ID NO:64) và GGNGSG (SEQ ID NO:65). Các tác nhân liên kết peptit đặc biệt quan tâm là $(G4S)_1$ hoặc GGGGS (SEQ ID NO:128), $(G4S)_2$ hoặc GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:13) và GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:57), cụ thể hơn $(G4S)_2$ hoặc GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:13) và GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:57).

Thuật ngữ "axit amin" như được sử dụng trong đơn này dùng để chỉ nhóm axit α-amin carboxy có trong tự nhiên bao gồm alanin (mã ba chữ cái: ala, mã một chữ cái: A),

arginin (arg, R), asparagin (asn, N), axit aspartic (asp, D), xystein (cys, C), glutamin (gln, Q), axit glutamic (glu, E), glyxin (gly, G), histidin (his, H), isoloxin (ile, I), loxin (leu, L), lysin (lys, K), methionin (met, M), phenylalanin (phe, F), prolin (pro, P), serin (ser, S), threonin (thr, T), tryptophan (trp, W), tyrosin (tyr, Y), và valin (val, V).

"Protein dung hợp chuỗi đơn" như được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến polypeptit chuỗi đơn gồm một hoặc hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu được dung hợp với một phần của gốc gắn kết kháng nguyên hoặc phần Fc. Sự dung hợp có thể diễn ra bằng cách gắn kết trực tiếp axit amin đầu tận N hoặc đầu tận C của gốc gắn kết kháng nguyên này với axit amin đầu tận C hoặc đầu tận N của miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu qua tác nhân liên kết peptit.

Thuật ngữ "được dung hợp" hoặc "được nối" có nghĩa là các thành phần (ví dụ polypeptit và miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu) được liên kết bằng các liên kết peptit, trực tiếp hoặc thông qua một hoặc nhiều tác nhân liên kết peptit.

"Phần trăm (%) đồng nhất trình tự axit amin" đối với trình tự polypeptit (protein) tham chiếu được xác định là phần trăm các gốc axit amin trong trình tự ứng viên giống hệt với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi căn thẳng các trình tự này và đưa các đoạn trống vào, nếu cần, để đạt được phần trăm đồng nhất trình tự lớn nhất, và không coi cải biến thay thế bảo toàn bất kỳ là một phần của độ đồng nhất trình tự. Việc căn thẳng nhằm mục đích xác định phần trăm đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được theo nhiều cách khác nhau thuộc phạm vi hiểu biết trong lĩnh vực liên quan, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính có sẵn như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN. SAWI hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định được các thông số thích hợp để căn thẳng các trình tự, bao gồm giải thuật bất kỳ cần để đạt được mức căn thẳng tối đa trên toàn bộ độ dài đầy đủ của trình tự được so sánh. Tuy nhiên, vì các mục đích ở đây, các giá trị % đồng nhất trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genentech, Inc., và mã nguồn được nộp với tài liệu sử dụng tại Cục Bản quyền Mỹ, Washington D.C., 20559, được đăng ký dưới số đăng ký bản quyền Mỹ là TXU510087. Chương trình ALIGN-2 có thể mua được trên thị trường từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được dịch từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 này nên được dịch để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX V4.0D số. Tất cả

các thông số so sánh trình tự được thiết lập bằng chương trình ALIGN-2 và không thay đổi. Trong trường hợp ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, thì % đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin A cho trước so với, với, hoặc dựa trên trình tự axit amin B cho trước (có thể được biến đổi câu chữ thay thế thành trình tự axit amin A cho trước có hoặc bao gồm % đồng nhất trình tự axit amin nhất định so với, với, hoặc dựa trên trình tự axit amin B cho trước) được tính như sau:

100 lần phân số X/Y

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

Theo một số phương án nhất định, các biến thể trình tự axit amin của các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF nêu trong bản mô tả được bao gồm trong sáng chế. Ví dụ, có thể mong muốn là cải thiện được ái lực gắn kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF đó. Các biến thể trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF có thể được tạo ra bằng cách đưa các cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa phân tử, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến này bao gồm, ví dụ, cải biến làm khuyết từ, và/hoặc cài xen vào và/hoặc thay thế các gốc trong trình tự axit amin của kháng thể. Sự kết hợp bất kỳ các cải biến làm khuyết, cài xen, và thay thế có thể được thực hiện để thu được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng này có các đặc tính mong muốn, chẳng hạn như khả năng gắn kết kháng nguyên. Các điểm quan tâm để gât đột biến thay thế bao gồm các HVR và khung (FR). Các cải biến thay thế bảo toàn được nêu trong Bảng B dưới đề mục "cải biến thay thế ưu tiên" và được mô tả thêm dưới đây khi đề cập đến các chuỗi bên axit amin từ nhóm (1) đến nhóm (6). Cải biến thay thế axit amin có thể được đưa vào phân tử đang quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc về hoạt tính mong muốn, chẳng hạn, khả năng gắn kết kháng nguyên được duy trì/cải thiện, khả năng tạo miễn dịch giảm, hoặc ADCC hoặc CDC cải thiện.

Bảng B

Gốc ban đầu	Cải biến thay thế lấy làm ví dụ	Cải biến thay thế ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norlơxin	Leu
Leu (L)	Norlơxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr

Gốc ban đầu	Cải biến thay thế lấy làm ví dụ	Cải biến thay thế ưu tiên
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norloxin	Leu

Các axit amin có thể được phân nhóm theo các tính chất chuỗi bên chung:

(1) kỵ nước: Norloxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) có tính axit: Asp, Glu;

(4) có tính kiềm: His, Lys, Arg;

(5) các gốc ảnh hưởng đến sự định hướng chuỗi: Gly, Pro;

(6) có tính thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các cải biến thay thế không bảo toàn sẽ đòi hỏi sự trao đổi thành viên của một trong các nhóm này cho một nhóm khác.

Thuật ngữ "biến thể trình tự axit amin" bao gồm các biến thể cơ bản trong đó có các cải biến thay thế axit amin ở một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của phân tử gắn kết kháng nguyên ban đầu (ví dụ, kháng thể được biến đổi giống như của người hoặc kháng thể người). Nhìn chung, (các) biến thể tạo ra được chọn để nghiên cứu tiếp sẽ có những biến đổi (chẳng hạn, cải thiện) về một số tính chất sinh học nhất định (chẳng hạn, ái lực tăng, khả năng tạo miễn dịch giảm) so với các phân tử gắn kết kháng nguyên ban đầu và/hoặc về cơ bản sẽ giữ được một số tính chất sinh học nhất định của phân tử gắn kết kháng nguyên ban đầu. Biến thể thay thế lấy làm ví dụ là kháng thể trưởng thành ái lực, mà có thể được tạo ra dễ dàng, chẳng hạn, bằng cách sử dụng công nghệ trưởng thành ái lực dựa vào biểu hiện thể thực khuẩn như các công nghệ được mô tả trong bản mô tả này. Tóm lại, một hoặc nhiều gốc HVR được đột biến và phân tử gắn kết kháng nguyên biến thể được biểu hiện trên thể thực khuẩn và được thử nghiệm về hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực gắn kết). Theo một số phương án nhất định, các cải biến thay thế, cài xen, hoặc làm khuyết có thể diễn ra trong một hoặc nhiều HVR miễn là các cải biến này không làm giảm đáng kể khả năng của phân tử gắn kết kháng nguyên trong việc gắn

kết kháng nguyên. Ví dụ, các cải biến biến đổi bảo toàn (chẳng hạn, cải biến thay thế bảo toàn được nêu trong bản mô tả) mà không làm giảm đáng kể ái lực gắn kết có thể được tạo ra trong các HVR. Phương pháp hữu ích để nhận biết các gốc hoặc vùng của kháng thể mà có thể được hướng đích để tạo đột biến được gọi là "tạo đột biến quét alanin" như được mô tả trong tài liệu Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Trong phương pháp này, gốc hoặc nhóm các gốc đích (chẳng hạn, các gốc mang điện như Arg, Asp, His, Lys, và Glu) được nhận biết và thay thế bằng axit amin trung tính hoặc có điện tích âm (chẳng hạn, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem liệu tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Những cải biến thay thế khác có thể được đưa vào các vị trí axit amin cho thấy độ nhạy chức năng đối với các cải biến thay thế ban đầu. Theo cách khác hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức kháng nguyên-phân tử gắn kết kháng nguyên để xác định các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận có thể được hướng đích hoặc được loại bỏ như là các ứng viên cho cải biến thay thế. Có biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem chúng có chứa các tính chất mong muốn hay không.

Cải biến cài xen trình tự axit amin bao gồm thể dung hợp đầu tận amino và/hoặc carboxyl có độ dài nằm trong khoảng từ một gốc đến nhiều polypeptit chứa hàng trăm gốc, cũng như cải biến cài xen trong trình tự của một hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về cải biến cài xen tận cùng bao gồm phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF có gốc methionyl đầu tận N. Các biến thể cài xen khác của phân tử này bao gồm sự dung hợp với đầu tận N hoặc đầu tận C với polypeptit mà làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF.

Theo một số phương án nhất định, các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF nêu trong bản mô tả được biến đổi để làm tăng hoặc làm giảm mức độ mà kháng thể được glycosyl hóa. Các biến thể glycosyl hóa của các phân tử này có thể thu được một cách dễ dàng bằng cách biến đổi trình tự axit amin sao cho tạo ra hoặc loại bỏ một hoặc nhiều điểm glycosyl hóa. Khi phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF bao gồm vùng Fc, thì hydrat cacbon được gắn vào đó có thể được biến đổi. Các kháng thể tự nhiên sản sinh bởi các tế bào động vật có vú thường bao gồm oligosacarit phân thành hai nhánh mà thường được gắn bởi liên kết N vào Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Xem tài liệu, chẳng hạn, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Oligosacarit này có thể bao gồm các hydrat cacbon khác nhau, chẳng hạn,

manoza, N-axetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn vào GlcNAc trong "gốc" của cấu trúc oligosacarit hai nhánh. Theo một số phương án, các cải biến của oligosacarit này trong phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF có thể được thực hiện để tạo ra các biến thể có một số tính chất được cải thiện. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các biến thể của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF có cấu trúc hydrat cacbon thiếu fucoza đã gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) vào vùng Fc. Các biến thể fucosyl hóa này có thể có chức năng ADCC cải thiện, ví dụ, xem Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2003/0157108 (Presta, L.) hoặc US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Các biến thể khác của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm các biến thể có oligosacarit được tách làm đôi, chẳng hạn, trong đó oligosacarit hai nhánh đã gắn vào vùng Fc được tách làm đôi bởi GlcNAc. Các biến thể này có thể có mức fucosyl hóa giảm và/hoặc chức năng ADCC cải thiện, xem tài liệu, ví dụ, WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); Patent Mỹ số 6602684 (Umana et al.); và US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Các biến thể có ít nhất một gốc galactoza trong oligosacarit đã gắn vào vùng Fc cũng được đề cập. Các biến thể kháng thể này có thể có chức năng CDC cải thiện và được mô tả, chẳng hạn, trong WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); và WO 1999/22764 (Raju, S.).

Theo một số phương án nhất định, có thể mong muốn tạo ra các biến thể được xử lý kỹ thuật bằng xystein của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, chẳng hạn, "thioMAbs", trong đó một hoặc nhiều gốc của phân tử này được thay thế bằng các gốc xystein. Theo các phương án cụ thể, các gốc được thay thế xuất hiện ở các vị trí dễ tiếp cận của phân tử. Bằng cách thay thế các gốc này bằng xystein, theo đó các nhóm thiol phản ứng được định vị ở các vị trí dễ tiếp cận này của kháng thể và có thể được sử dụng để liên hợp kháng thể này với các gốc khác, như các gốc thuốc hoặc các gốc tác nhân liên kết-thuốc, để tạo ra thể liên hợp miễn dịch. Theo một số phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc bất kỳ trong số các gốc sau có thể được thay thế bằng xystein: V205 (đánh số theo Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng; và S400 (đánh số theo EU) của vùng Fc chuỗi nặng. Phân tử gắn kết kháng nguyên được xử lý kỹ thuật bằng xystein có thể được tạo ra như được mô tả, chẳng hạn, trong patent Mỹ số 7521541.

Theo một số khía cạnh nhất định, các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF nêu trong bản mô tả có thể được cải biến thêm để chứa các gốc bổ sung không chứa protein đã biết trong lĩnh vực liên quan và đã có sẵn. Các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất kháng thể bao gồm nhưng không bị giới hạn ở các polyme tan được trong nước. Các ví dụ không giới hạn về các polyme tan được trong nước bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), các copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinylic, polyvinyl pyrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit maleic, axit polyamin (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrolidon)polyetylen glycol, homopolyme propropylen glycol, co-polyme prolypropylen oxit/etylen oxit, polyol được polyoxyetyl hóa (chẳng hạn, glyxerol), rượu polyvinylic, và các hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có lợi thế đối với việc sản xuất do độ ổn định của nó trong nước. Polyme này có thể có phân tử lượng bất kỳ, và có thể được phân nhánh hoặc không phân nhánh. Số lượng polyme gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn, thì chúng có thể là các phân tử giống nhau hoặc khác nhau. Nói chung, số lượng và/hoặc loại polyme dùng để tạo dẫn xuất có thể xác định được dựa vào các yếu tố cần xem xét bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần được cải thiện, liệu dẫn xuất kháng thể hai đặc hiệu có được sử dụng trong trị liệu trong các điều kiện đã định hay không, v.v.. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thể liên hợp của kháng thể và gốc không chứa protein mà có thể được gia nhiệt chọn lọc bằng cách cho tiếp xúc với bức xạ. Theo một phương án, gốc không chứa protein là ống nano cacbon (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Bức xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, những bước sóng không gây hại các tế bào bình thường, nhưng gia nhiệt gốc không chứa protein này đến nhiệt độ mà ở đó các tế bào gần với gốc kháng thể không chứa protein được tiêu diệt.

Theo một khía cạnh khác, các thể liên hợp miễn dịch của các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime cuae phối tử họ TNF nêu trong bản mô tả có thể thu được. "Thể liên hợp miễn dịch" là kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều (các) phân tử khác loại, bao gồm nhưng không giới hạn ở tác nhân gây độc tế bào.

Thuật ngữ "polynucleotit" đề cập đến phân tử hoặc cấu trúc axit nucleic đã được phân lập, ví dụ ARN thông tin (mARN), ARN có nguồn gốc virut, hoặc ADN plasmit (pADN). Polynucleotit có thể bao gồm liên kết phosphodieste thông thường hoặc liên kết không thông thường (ví dụ, liên kết amit, như được tìm thấy trong axit nucleic peptit (PNA). Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" đề cập đến một hoặc nhiều phân đoạn axit nucleic bất kỳ, ví dụ, mảnh ADN hoặc mảnh ARN, có mặt trong polynucleotit.

Thuật ngữ phân tử axit nucleic hoặc polynucleotit "đã được phân lập" được dùng để chỉ phân tử axit nucleic, ADN hoặc ARN đã được loại bỏ khỏi môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, polynucleotit tái tổ hợp mã hóa polypeptit có trong vectơ được xem là đã được phân lập theo các mục đích của sáng chế. Các ví dụ khác về polynucleotit đã được phân lập bao gồm các polynucleotit tái tổ hợp được duy trì trong các tế bào vật chủ khác loại hoặc các polynucleotit đã được tinh chế (một phần hoặc phần lớn) trong dung dịch. Polynucleotit đã được phân lập bao gồm phân tử polynucleotit có trong các tế bào mà thường chứa phân tử polynucleotit này, nhưng phân tử polynucleotit này có mặt bên ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí nhiễm sắc thể khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó. Các phân tử ARN đã được phân lập bao gồm các bản phiên mã ARN *in vivo* hoặc *in vitro* theo sáng chế, cũng như các dạng sợi dương và âm, và các dạng sợi đôi. Các polynucleotit đã được phân lập hoặc các axit nucleic theo sáng chế còn bao gồm các phân tử được tạo ta bằng cách tổng hợp. Ngoài ra, polynucleotit hoặc axit nucleic có thể là hoặc có thể bao gồm phần tử điều hòa như gen khởi đầu, điểm gắn kết ribosom, hoặc gen kết thúc phiên mã.

Thuật ngữ axit nucleic hoặc polynucleotit có trình tự nucleotit "giống hệt" ít nhất, ví dụ, 95% với trình tự nucleotit tham chiếu theo sáng chế, được dùng để chỉ rằng trình tự nucleotit của polynucleotit này giống hệt với trình tự tham chiếu ngoại trừ việc trình tự polynucleotit này có thể bao gồm tối đa năm đột biến điểm trong mỗi 100 nucleotit của trình tự nucleotit tham chiếu. Nói cách khác, để thu được polynucleotit có trình tự nucleotit giống hệt ít nhất 95% với trình tự nucleotit tham chiếu, thì tối đa 5% nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được làm khuyết hoặc được thay thế bằng một nucleotit khác, hoặc số lượng nucleotit lên đến 5% tổng số nucleotit trong trình tự tham chiếu có thể được cài xen vào trình tự tham chiếu. Những biến đổi này ở trình tự tham chiếu có thể xảy ra ở các vị trí tận cùng 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit tham chiếu hoặc bất kỳ vị trí nào giữa các vị trí tận cùng này, được xen vào một cách riêng lẻ giữa các gốc trong

trình tự tham chiếu hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liền kề trong trình tự tham chiếu đó. Trên thực tế, việc liệu trình tự polynucleotit cụ thể bất kỳ có giống hệt ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nucleotit theo sáng chế hay không có thể xác định được theo cách thông thường sử dụng các chương trình máy tính đã biết, như các chương trình đã được thảo luận ở trên đối với polypeptit (ví dụ, ALIGN-2).

Thuật ngữ "caxet biểu hiện" đề cập đến polynucleotit được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp hoặc tổng hợp, với một loạt các phần tử axit nucleic cụ thể cho phép phiên mã một axit nucleic cụ thể trong tế bào đích. Caxet biểu hiện tái tổ hợp có thể được hợp nhất vào plasmit, nhiễm sắc thể, ADN ty thể, ADN thể hạt, virut, hoặc mảnh axit nucleic. Thông thường, phần caxet biểu hiện tái tổ hợp của vectơ biểu hiện bao gồm, trong số các trình tự khác, trình tự axit nucleic cần được phiên mã và gen khởi đầu. Theo một số phương án nhất định, caxet biểu hiện theo sáng chế bao gồm các trình tự polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên hai đặc hiệu theo sáng chế hoặc các mảnh của nó.

Thuật ngữ "vectơ" hoặc "vectơ biểu hiện" là đồng nghĩa với "cấu trúc biểu hiện" và đề cập đến phân tử ADN được sử dụng để đưa hoặc định hướng sự biểu hiện của một gen cụ thể mà nó gắn kết điều khiển được trong tế bào đích vào đó. Thuật ngữ này bao gồm vectơ dưới dạng cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vectơ được hợp nhất vào hệ gen của tế bào vật chủ vào mà nó đã được đưa vào. Vectơ biểu hiện theo sáng chế bao gồm caxet biểu hiện. Các vectơ biểu hiện cho phép phiên mã mARN ổn định với số lượng lớn. Ngay khi vectơ biểu hiện ở bên trong tế bào đích, thì phân tử axit ribonucleic hoặc protein được mã hóa bởi gen này được tạo ra nhờ cơ chế phiên mã và/hoặc dịch mã tế bào. Theo một phương án, vectơ biểu hiện theo sáng chế bao gồm caxet biểu hiện bao gồm các trình tự polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên hai đặc hiệu theo sáng chế hoặc các mảnh của nó.

Các thuật ngữ "tế bào vật chủ", "dòng tế bào vật chủ", và "giống cấy tế bào vật chủ" được sử dụng thay thế lẫn nhau và đề cập đến các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh đã được đưa vào đó, bao gồm cả thế hệ con của các tế bào này. Các tế bào vật chủ bao gồm "các thể biến nạp" và "các tế bào được biến nạp", bao gồm tế bào được biến nạp cấp một và thế hệ con thu được từ đó mà không cần để ý đến số lần cấy chuyển. Thế hệ con có thể không hoàn toàn giống hệt về hàm lượng axit nucleic so với tế bào ban đầu,

mà có thể chứa đột biến. Thế hệ con đột biến mà có chức năng hoặc hoạt tính sinh học giống như được sàng lọc hoặc chọn lọc trong tế bào đã được biến nạp ban đầu thuộc phạm vi của sáng chế. Tế bào vật chủ là loại hệ tế bào bất kỳ mà có thể được sử dụng để tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên hai đặc hiệu theo sáng chế. Các tế bào vật chủ bao gồm các tế bào được nuôi cấy, ví dụ, các tế bào động vật có vú được nuôi cấy, như các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào NS0, các tế bào SP2/0, các tế bào u tủy YO, các tế bào u tủy chuột nhắt P3X63, các tế bào PER, các tế bào PER.C6 hoặc các tế bào lai, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, và các tế bào thực vật, chỉ là một số được nêu tên, và cả các tế bào có trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc thực vật được nuôi cấy hoặc mô động vật.

"Lượng hữu hiệu" của một chất đề cập đến lượng cần để đem lại sự thay đổi sinh lý trong tế bào hoặc mô mà được sử dụng lượng đó.

"Lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh" của một chất, ví dụ, dược phẩm, đề cập đến lượng hữu hiệu, ở liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị hoặc phòng ngừa bệnh mong muốn. Lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh của của chất, ví dụ, làm thuyên giảm, làm giảm, trì hoãn, giảm thiểu hoặc ngăn ngừa các tác động có hại của bệnh.

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Các động vật có vú bao gồm, nhưng không bị 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" được dùng để chỉ chế phẩm ở dạng nhằm cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính có trong đó sẽ hữu hiệu, và không chứa các thành phần bổ sung gây độc không chấp nhận được cho đối tượng dùng dược phẩm này.

"Tá dược dược dụng" được dùng để chỉ thành phần trong dược phẩm, ngoài thành phần hoạt tính, không gây độc cho đối tượng, tá dược dược dụng này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch đệm, chất ổn định, hoặc chất bảo quản.

Thuật ngữ "tờ rời kèm trong bao gói" được sử dụng để chỉ các chỉ dẫn thường có trong bao gói chứa sản phẩm điều trị bệnh bán trên thị trường, chứa thông tin về chỉ

định, cách sử dụng, liều lượng, việc 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.

Như được sử dụng trong bản mô tả, "sự điều trị" (và các dạng biến đổi ngữ pháp của nó như "điều trị" hoặc "việc điều trị") được dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng với nỗ lực nhằm làm thay đổi tiến trình tự nhiên ở cá thể được điều trị, và có thể được thực hiện nhằm phòng bệnh hoặc trong tiến trình bệnh lý lâm sàng. Các tác dụng điều trị mong muốn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngăn ngừa mắc bệnh hoặc tái phát bệnh, giảm nhẹ các triệu chứng, giảm bớt hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, ngăn chặn di căn, làm chậm tốc độ tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc giảm nhẹ trạng thái bệnh, và làm thuyên giảm hoặc cải thiện sự chẩn đoán bệnh. Theo một số phương án, phân tử theo sáng chế được sử dụng để trì hoãn sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh.

Thuật ngữ "bệnh ung thư" như được sử dụng trong bản mô tả đề cập đến các bệnh tăng sinh, như u lympho, caxinom, u lympho, u nguyên bào, sacôm, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu lympho, bào, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCL), bệnh ung thư phổi tế bào phế quản-phế nang, bệnh ung thư xương, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư da, bệnh ung thư đầu hoặc cổ, u hắc sắc tố dưới da hoặc trong mắt, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư vùng hậu môn, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư thuộc dạ dày, bệnh ung thư trực tràng ruột kết (CRC), bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư vú bộ ba âm tính, bệnh ung thư tử cung, caxinom ống dẫn chứng, caxinom nội mạc tử cung, caxinom cổ, caxinom âm đạo, caxinom âm hộ, bệnh Hodgkin, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột non, bệnh ung thư hệ nội tiết, bệnh ung thư tuyến giáp, bệnh ung thư tuyến cận giáp, bệnh ung thư tuyến thượng thận, sacôm mô mềm, bệnh ung thư niệu đạo, bệnh ung thư dương vật, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thận hoặc niệu quản, caxinom tế bào thận, caxinom bể thận, u trung biểu mô, bệnh ung thư tế bào gan, bệnh ung thư mật, u hệ thần kinh trung ương (CNS), u trục cột sống, u thần kinh đệm gốc não, u nguyên bào thần kinh đệm đa hình, u tế bào hình sao, u bao sợi thần kinh, u màng não thất, u nguyên bào tủy, u màng não, caxinom tế bào vảy, u tuyến tiết niêm dịch và sacôm Ewings, u hắc sắc tố, đa u tủy, bệnh ung thư tế bào B (u lympho), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu tế bào tóc, bệnh bạch cầu nguyên bào tủy cấp tính, kể cả các dạng

khó chữa của bệnh bất kỳ trong số các bệnh ung thư nêu trên, hoặc tổ hợp của một hoặc nhiều bệnh ung thư nêu trên.

Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế

Sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF mới có các tính chất đặc biệt có lợi như khả năng sản sinh, độ ổn định, ái lực gắn kết, hoạt tính sinh học, hiệu suất hướng đích và độ độc giảm.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên naày khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó, và

(c) miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai có khả năng liên kết ổn định.

Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó, trong đó thành viên họ phối tử TNF này đồng kích thích sự hoạt hóa tế bào T người.

Theo một khía cạnh cụ thể khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó, trong đó các miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF này giống hệt nhau trong mọi trường hợp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm 1, bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ,

(i) polypeptit thứ nhất chứa miền CH1 hoặc miền CL và polypeptit thứ hai chứa miền CL hoặc miền CH1, một cách tương ứng, trong đó polypeptit thứ hai được gắn kết với polypeptit thứ nhất bằng liên kết disulfua giữa miền CH1 và miền CL, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với

nhau và với miền CH1 hoặc miền CL bằng tác nhân liên kết peptit và trong đó polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối với miền CL hoặc miền CH1 của polypeptit nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit, hoặc

(ii) polypeptit thứ nhất chứa miền CH3 và polypeptit thứ hai chứa miền CH3, một cách tương ứng, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với đầu tận C của miền CH3 bằng tác nhân liên kết peptit và trong đó polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của miền CH3 của polypeptit nêu trên, hoặc

(iii) polypeptit thứ nhất chứa miền VH-CL hoặc miền VL-CH1 và polypeptit thứ hai chứa miền VL-CH1 hoặc miền VH-CL, một cách tương ứng, trong đó polypeptit thứ hai được gắn kết với polypeptit thứ nhất bằng liên kết disulfua giữa miền CH1 và CL, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với VH hoặc VL bằng tác nhân liên kết peptit và trong đó polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với VL hoặc VH của polypeptit đã nêu.

Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm thành viên họ phối tử TNF đồng kích thích sự hoạt hóa tế bào T người được chọn từ 4-1BBL và OX40L. Đặc biệt hơn, thành viên họ phối tử TNF này là 4-1BBL.

Theo một khía cạnh khác, trong đó miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO:374 và SEQ ID NO:375, đặc biệt là trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:96. Theo một khía cạnh, miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc phân mảnh của nó chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 và SEQ ID NO:96, đặc biệt là trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 hoặc

SEQ ID NO:96. Theo một khía cạnh cụ thể, miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc phân mảnh của nó chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:96.

Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4. Theo một khía cạnh cụ thể, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:97 và polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:96.

Theo một khía cạnh, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:5 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:6.

Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:5 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:183.

Theo một khía cạnh khác nữa, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:97 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:184 hoặc SEQ ID NO:185.

Theo một khía cạnh khác, thành viên họ phối tử TNF này là OX40L. Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF này chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54, đặc biệt là trình tự axit amin của SEQ ID NO:53.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:371 hoặc SEQ ID:372 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54, một cách tương ứng.

Theo một khía cạnh, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) polypeptit thứ nhất chứa miền CH1 hoặc miền CL và polypeptit thứ hai chứa miền CL hoặc miền CH1, một cách tương ứng, trong đó polypeptit thứ hai được gắn kết với polypeptit thứ nhất bằng liên kết disulfua giữa miền CH1 và miền CL, và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao

gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với miền CH1 hoặc miền CL bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với miền CL hoặc miền CH1 của polypeptit đã nêu.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) polypeptit thứ nhất chứa miền CH1 và polypeptit thứ hai chứa miền CL, trong đó polypeptit thứ hai được gắn kết với polypeptit thứ nhất bằng liên kết disulfua giữa miền CH1 và miền CL,

và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với miền CH1 bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với miền CL của polypeptit đã nêu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) polypeptit thứ nhất chứa miền CL và polypeptit thứ hai chứa miền CH1, trong đó polypeptit thứ hai được gắn kết với polypeptit thứ nhất bằng liên kết disulfua giữa miền CH1 và miền CL,

và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với miền CL bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với miền CH1 của polypeptit đã nêu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) trên một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với polypeptit nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa miền CH3 và polypeptit thứ hai chứa miền CH3, một cách tương ứng, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với đầu tận C của miền CH3 bằng tác nhân liên kết peptit và trong đó polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của miền CH3 của polypeptit đã nêu. Cụ thể là, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF này bao gồm hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó, trong đó hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích gắn kết với hai kháng nguyên tế bào đích khác nhau.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được xác định trên đây, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể, mảnh kháng thể và protein gắn kết kháng nguyên khung.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích được chọn từ nhóm bao gồm mảnh kháng thể, phân tử Fab, phân tử Fab lai chéo, phân tử Fab chuỗi đơn, phân tử Fv, phân tử scFv, kháng thể miền đơn, protein gắn kết aVH và kháng nguyên khung. Theo một khía cạnh, gốc có khả năng

gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là aVH hoặc protein gắn kết kháng nguyên khung. Theo một khía cạnh, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là protein gắn kết kháng nguyên khung có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm một hoặc hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là phân tử Fab hoặc phân tử Fab lai chéo có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích. Đặc biệt, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó kháng nguyên tế bào đích được chọn từ nhóm bao gồm protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), Chondroitin Sulfat Proteoglycan liên quan đến u hắc sắc tố (MCSP), thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR), kháng nguyên caxinom phôi (CEA), CD19, CD20 và CD33.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, trong đó peptit bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai và trong đó một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL trên chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, trong đó peptit bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai và trong đó một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 trên chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế liên quan đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, trong đó peptit bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL của chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai và trong đó một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả ở trên, trong đó tác nhân liên kết peptit là $(G4S)_2$. Theo một khía cạnh, tác nhân liên kết peptit thứ nhất là $(G4S)_2$ (SEQ ID NO:13), tác nhân liên kết peptit thứ hai là GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:57) và tác nhân liên kết peptit thứ ba là $(G4S)_2$ (SEQ ID NO:13). Cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF như được mô tả ở trên, trong đó tác nhân liên kết peptit thứ nhất là $(G4S)_2$ (SEQ ID NO:13), tác nhân liên kết peptit thứ hai là $(G4S)_2$ (SEQ ID NO:13), và tác nhân liên kết peptit thứ ba là $(G4S)_2$ (SEQ ID NO:13).

Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây bao gồm miền Fc gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai có khả năng liên kết ổn định.

Cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm (a) phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, trong đó chuỗi nặng Fab được dung hợp ở đầu tận C với đầu tận N của miền CH2 trong miền Fc và (c) miền Fc gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai có khả năng liên kết ổn định.

Theo một khía cạnh khác, miền Fc này là IgG, cụ thể là miền Fc của IgG1 hoặc miền Fc của IgG4. Đặc biệt hơn, miền Fc này là miền Fc của IgG1. Theo một khía cạnh cụ thể, miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự liên kết của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc.

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

Miền Fc của các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm 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 miền này bao gồm các miền hằng định chuỗi nặng IgG CH2 và CH3. Hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc có khả năng liên kết ổn định với nhau.

Miền Fc đem lại các tính chất dược động học tốt cho phân tử gắn kết kháng nguyên theo sáng chế, bao gồm thời gian bán hủy trong huyết thanh dài góp phần giúp tích tụ tốt trong mô đích và tỷ lệ phân bố mô-máu thích hợp. Tuy nhiên, đồng thời nó có thể gây hiện tượng hướng đích không mong muốn các kháng thể hai đặc hiệu theo sáng chế đến các tế bào biểu hiện thụ thể Fc thay vì đến các tế bào mang kháng nguyên được ưu tiên. Do vậy, theo các khía cạnh cụ thể, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế có ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và/hoặc chức năng tác động giảm, khi so với miền Fc IgG1 tự nhiên. Theo một khía cạnh, Fc hầu như không gắn kết với thụ thể Fc và/hoặc không cảm ứng chức năng tác động. Theo một khía cạnh cụ thể, thụ thể Fc là thụ thể Fcγ. Theo một khía cạnh, thụ thể Fc là thụ thể Fc người. Theo một khía cạnh cụ thể, thụ thể Fc này là thụ thể Fcγ người hoạt hóa, đặc biệt hơn nữa là FcγRIIIa, FcγRI hoặc FcγRIIa của người, đặc biệt nhất là FcγRIIIa của người. Theo một khía cạnh, miền Fc không cảm ứng chức năng tác động. Chức năng tác động giảm có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều chức năng sau đây: chức năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) giảm, chức năng gây độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) giảm, chức năng thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP) giảm, chức năng tiết xytokin giảm, chức năng hấp phụ kháng nguyên qua trung gian phức miễn dịch giảm bởi các tế bào trình diện kháng nguyên, chức năng gắn kết với các tế bào NK giảm, chức năng gắn kết với các đại thực bào giảm, chứa năng gắn kết với các bạch cầu đơn nhân giảm, chức năng gắn kết với các tế bào bạch cầu hạt giảm, chức năng báo hiệu trực tiếp cảm ứng sự chết tế bào theo chương trình giảm, chức năng trưởng thành tế bào tua giảm, hoặc chức năng mồi tế bào T giảm.

Theo một số khía cạnh nhất định, một hoặc nhiều cải biến axit amin có thể được đưa vào trong vùng Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF nêu trong bản mô tả, nhờ đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc này có thể chứa trình tự vùng Fc của người (chẳng hạn, vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) bao gồm cải biến axit amin (ví dụ, cải biến thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó, và

(c) miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai có khả năng liên kết ổn định, trong đó miền Fc này bao gồm một hoặc nhiều cải biến thay thế axit amin làm giảm khả năng gắn kết với thụ thể Fc, đặc biệt là đối với thụ thể Fcγ.

Theo một khía cạnh, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế 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 trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Cụ thể, miền Fc này bao gồm cải biến thay thế axit amin ở vị trí E233, L234, L235, N297, P331 và P329 (đánh số theo EU). Cụ thể, miền Fc bao gồm cải biến thay thế axit amin ở các vị trí 234 và 235 (đánh số theo EU) và/hoặc 329 (đánh số theo EU) của chuỗi nặng IgG. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa phối tử họ trime TNF theo sáng chế mà bao gồm miền Fc có các cải biến thay thế axit amin L234A, L235A và P329G ("P329G LALA", đánh số theo EU) trong chuỗi nặng IgG. Các cải biến thay thế axit amin L234A và L235A đề cập đến đột biến gọi là đột biến LALA. Sự kết hợp "P329G LALA" của các cải biến thay thế axit amin gần như loại bỏ hoàn toàn sự gắn kết thụ thể Fcγ của miền Fc IgG1 người và được mô tả trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO 2012/130831 A1 mà cũng mô tả phương pháp tạo ra miền Fc đột biến này và phương pháp xác định các tính chất của nó như chức năng gắn kết thụ thể Fc hoặc chức năng tác động. "Đánh số theo EU" đề cập đến việc đánh số theo chỉ số EU trong Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Các miền Fc có chức năng gắn kết thụ thể Fc và/hoặc chức năng tác động giảm còn bao gồm miền Fc có cải biến thay thế một hoặc nhiều gốc miền Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (patent Mỹ số 6737056). Các thể đột biến Fc này bao gồm các thể đột biến Fc có cải biến thay thế ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm thể đột biến gọi là thể đột biến Fc "DANA" có cải biến thay thế ở gốc 265 và gốc 297 bằng alanin (patent Mỹ số 7332581).

Theo một khía cạnh khác, miền Fc là miền Fc của IgG4. Các kháng thể IgG4 có ái lực gắn kết với thụ thể Fc giảm và chức năng tác động giảm khi so với các kháng thể IgG1. Theo khía cạnh cụ thể hơn, miền Fc này là miền Fc của IgG4 bao gồm cải biến thay thế axit amin ở vị trí S228 (đánh số theo Kabat), đặc biệt là cải biến thay thế axit amin S228P. Theo một khía cạnh cụ thể hơn, miền Fc này là miền Fc của IgG4 bao gồm các cải biến thay thế axit amin L235E và S228P và P329G (đánh số theo EU). Các thể đột biến miền Fc của IgG4 này và các tính chất gắn kết thụ thể Fcγ của chúng cũng được mô tả trong WO 2012/130831.

Các miền Fc đột biến có thể được tạo ra bằng cách làm khuyết, thay thế, cài xen hặc cải biến axit amin bằng cách sử dụng các phương pháp di truyền hoặc hóa học đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Các phương pháp di truyền có thể bao gồm tạo đột biến đặc hiệu điểm cho trình tự ADN mã hóa, PCR, tổng hợp gen, và phương pháp tương tự. Các thay đổi nucleotit chính xác có thể được kiểm tra bằng cách giải trình tự chẳng hạn.

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

Chức năng tác động của miền Fc, hoặc các kháng thể hai đặc hiệu theo sáng chế có miền Fc, có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Thử

nghiệm thích hợp để đo ADCC được mô tả trong bản mô tả. Các ví dụ khác về các thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm được mô tả trong patent Mỹ số 5500362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) và Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); patent Mỹ số 5821337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). Theo cách khác, có thể sử dụng các phương pháp thử nghiệm không có hoạt tính phóng xạ (ví dụ, xem thử nghiệm gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACTI™ để đếm 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 cho các thử nghiệm này bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào diệt tự nhiên (NK). Theo cách khác hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mô hình động vật như mô hình động vật được mô tả trong tài liệu 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 thể, đặc biệt là với C1q, được làm giảm. Do vậy, theo một số phương án trong đó miền Fc được xử lý kỹ thuật để có chức năng tác động giảm, thì chức năng tác động giảm này bao gồm CDC giảm. Thử nghiệm gắn kết C1q có thể được tiến hành để xác định xem các kháng thể hai đặc hiệu theo sáng chế có thể gắn kết với C1q hay không và theo vậy có hoạt tính CDC hay không. Ví dụ, xem mục Gắn kết C1q và C3c theo ELISA trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, có thể tiến hành thử nghiệm CDC (ví dụ, xem tài liệu 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)).

Theo một khía cạnh cụ thể, miền Fc bao gồm cải biến thúc đẩy sự liên kết của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc.

Cải biến miền Fc thúc đẩy sự heterodime hóa

Theo một khía cạnh, các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm (a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, (b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai

phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai chỉ bao gồm duy nhất một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó, và (c) miền Fc bao gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai có khả năng liên kết ổn định, trong đó miền Fc này bao gồm một hoặc nhiều cải biến thay thế axit amin làm giảm khả năng gắn kết với thụ thể Fc, đặc biệt là đối với thụ thể Fcγ. Do vậy, chúng bao gồm các gốc khác nhau, được dung hợp với một cấu trúc siêu phân tử hoặc cấu trúc siêu phân tử kia trong số hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc mà thường gồm hai chuỗi polypetit ("chuỗi nặng") không giống hệt nhau. Sự đồng biểu hiện tái tổ hợp của các polypeptit này và sự dime hóa sau đó tạo ra một vài tổ hợp có thể có của hai polypeptit đó. Nhằm cải thiện hiệu suất và độ tinh khiết của các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF trong sản xuất tái tổ hợp, theo đó sẽ có lợi nếu đưa cải biến thúc đẩy sự liên kết của các polypeptit mong muốn vào trong miền Fc của các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế.

Do vậy, miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm cải biến thúc đẩy sự liên kết của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc này. Vị trí tương tác protein-protein rộng nhất giữa hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc IgG người là trong miền CH3 của miền Fc. Do vậy, cụ thể, cải biến này là trong miền CH3 của miền Fc.

Theo một khía cạnh cụ thể, cải biến nêu trên còn được gọi là cải biến "tra khóa vào ổ", bao gồm cải biến "khóa" ở một trong hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc và cải biến "ổ" ở cấu trúc siêu phân tử con lại trong số hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Như vậy, theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trên đây mà bao gồm phân tử IgG, trong đó phần Fc của chuỗi nặng thứ nhất bao gồm môđun đime hóa thứ nhất và phần Fc của chuỗi nặng thứ hai bao gồm mô đun hóa thứ hai cho phép heterodime hóa hai chuỗi nặng của phân tử IgG và môđun đime hóa thứ nhất chứa khóa và môđun đime hóa thứ hai chứa ổ theo công nghệ tra khóa vào ổ.

Công nghệ tra khóa vào ổ được mô tả trong, ví dụ, US 5731168; US 7695936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) và Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Nhìn chung, phương pháp này bao gồm việc đưa phần nhô ("khóa") ở giao diện của polypeptit thứ nhất và hốc tương ứng ("ổ") ở giao diện của polypeptit thứ hai, sao cho

phần nhô có thể được định vị trong hốc nhằm thúc đẩy sự hình thành heterodime và sự hình thành homodime cảm trở. Các phần nhô được tạo kết cấu bằng cách thay thế các chuỗi bên axit amin nhỏ từ giao diện của polypeptit thứ nhất bằng chuỗi bên lớn hơn (ví dụ, tyrosin hoặc tryptophan). Các hốc bù có kích cỡ giống hệt hoặc tương tự với các phần nhô được tạo ra ở giao diện của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế các chuỗi bên axit amin lớn bằng các chuỗi bên axit amin nhỏ hơn (ví dụ, alanin hoặc threonin).

Do vậy, theo một khía cạnh cụ thể, trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có dung lượng chuỗi bên lớn hơn, nhờ đó tạo ra phần nhô bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất mà có thể định vị trong hốc bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai, và trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có dung lượng chuỗi bên nhỏ hơn, nhờ đó tạo ra hốc bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai trong đó phần nhô bên trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất có thể định vị được.

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

Theo một khía cạnh cụ thể, trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc threonin ở vị trí 366 được thay thế bằng gốc tryptophan (T366W), và trong miền CH3 của cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc tyrosin ở vị trí 407 được thay thế bằng gốc valin (Y407V). Ngoài ra, đặc biệt hơn, 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 lơxin ở vị trí 368 được thay thế bằng gốc alanin (L368A). Ngoài ra, đặc biệt hơn, trong cấu trúc siêu phân tử thứ nhất của miền Fc, gốc serin ở vị trí 354 được thay thế bằng gốc xystein (S354C), và ngoài ra, trong cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc, gốc tyrosin ở vị trí 349 được thay thế bằng gốc xystein (Y349C). Việc đưa hai gốc xystein này vào làm hình thành cầu disulfua giữa hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc. Cầu disulfua này còn làm ổn định dime (Carter, J Immunol Các phương pháp 248, 7-15 (2001)).

Theo một khía cạnh thay thế, cải biến thúc đẩy sự liên kết của cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai của miền Fc bao gồm cải biến điều tiết tác động điều khiển tĩnh điện, ví dụ như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO

2009/089004. Nhìn chung, phương pháp này bao gồm việc thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin ở giao diện của hai cấu trúc siêu phân tử của miền Fc bằng các gốc axit amin mang điện sao cho sự hình thành homodime trở nên không thích hợp về mặt tĩnh điện nhưng sự heterodime hóa thì thích hợp về mặt tĩnh điện.

Cải biến trong miền CH1/CL

Để cải thiện hơn nữa khả năng ghép cặp chính xác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF có thể chứa cải biến thay thế axit amin mang điện khác nhau (còn được gọi là "các gốc mang điện"). Những cải biến này được đưa vào trong miền CH1 và miền CL lai chéo hoặc không lai chéo. Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó ở một trong các miền CL, axit amin ở vị trí 123 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng arginin (R) và axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo EU) đã được thế bằng lysin (K) và trong đó ở một trong các miền CH1, các axit amin ở vị trí 147 (đánh số theo EU) và ở vị trí 213 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng axit glutamic (E).

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó ở miền CL liền kề với thành viên họ phối tử TNF này, axit amin ở vị trí 123 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng arginin (R) và axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng lysin (K), và trong đó ở miền CH1 liền kề với thành viên họ phối tử TNF này, các axit amin ở vị trí 147 (đánh số theo EU) và ở vị trí 213 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng axit glutamic (E).

Các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF cụ thể

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

peptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ thứ hai bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai,

và peptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu được dung hợp ở đầu tận C của nó lần lượt với chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng thứ hai bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó peptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 là một phần của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai, và peptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL là một phần của chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó peptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL là một phần của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai,

và peptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó mà được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 là một phần của chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó peptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền VH là một phần của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai,

và peptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền VL là một phần của chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo các điểm từ 21 đến 23, trong đó ở miền CL liền kề với thành viên họ phối tử TNF này, axit amin ở vị trí 123 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng arginin (R) và axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng lysin (K), và trong đó ở miền CH1 liền kề với thành viên họ phối tử TNF này, các axit amin ở vị

trí 147 (đánh số theo EU) và ở vị trí 213 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng axit glutamic (E). Những cải biến này tạo ra gốc gọi là gốc mang điện có các tính chất có lợi mà tránh được các tác dụng không mong muốn chẳng hạn như bắt cặp lỗi.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó kháng nguyên tế bào đích này được chọn từ nhóm bao gồm protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), Chondroitin Sulfat Proteoglycan liên quan đến u hắc sắc tố (MCSP), thụ thể yếu tố phát triển biểu mô (EGFR), kháng nguyên caxinom phôi (CEA), CD19, CD20 và CD33.

Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó kháng nguyên tế bào đích là FAP

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó kháng nguyên tế bào đích là protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:100, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:101, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:102, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:103, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:11 hoặc SEQ ID NO:104, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:105.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP và bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:9, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:10, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:11và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:12.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với

kháng nguyên tế bào đích là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP và bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:100, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:101 và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:102, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:103, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:104và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:105.

Theo một khía cạnh khác, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:17.

Theo một khía cạnh khác, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:107.

Theo một khía cạnh, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107.

Theo một khía cạnh cụ thể, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17. Theo một khía cạnh cụ thể khác, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107. Theo một khía cạnh cụ thể, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm miền VH gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và miền VL gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:107.

Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.

Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:97 và polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:96.

Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin

được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.

Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:97 và polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:96.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất mà được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba, và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:111 và SEQ ID NO:113, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112 và SEQ ID NO:114.

Theo một khía cạnh cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó mà được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba, và trong đó phân tử này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119 và SEQ ID NO:173, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120 và SEQ ID NO:174.

Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, trong đó chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ thứ nhất này bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107, và

(b) chuỗi nặng thứ hai bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được

dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó mà được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba, trong đó chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 hoặc SEQ ID NO:173, và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120 hoặc SEQ ID NO:174. Cụ thể, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa miền CH3 và polypeptit thứ hai chứa miền CH3, một cách tương ứng, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với đầu tận C của miền CH3 bằng tác nhân liên kết peptit và ở chỗ polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của miền CH3 của polypeptit đã nêu.

Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên này chứa trime phối tử họ TNF bao gồm hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Cụ thể hơn, phân tử gắn kết kháng nguyên này chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:121, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:122, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:19, hoặc

(ii) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:123, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:124, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, hoặc

(iii) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:126, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:127, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, được chọn từ nhóm bao gồm:

a) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:19, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:14 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:15;

b) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:19, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:115 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:116;

c) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:135, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:136, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:108 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:109;

d) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:19, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:139 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:140;

e) phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:19, chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:121 và chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:122;

f) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:19, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:108 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:110;

g) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:145, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:19, chuỗi nặng thứ

hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:115 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:116;

h) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:19, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:148 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:149;

i) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:19, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:111 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:112; và

j) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:19, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:113 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:114.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, được chọn từ nhóm bao gồm:

a) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:164, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:115 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:116;

b) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:164, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:117 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:118;

c) phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:123 và chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:124;

d) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:164, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng

thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120;

e) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:164, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:173 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:174; và

f) phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:126 và chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:127.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:164, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó thành viên họ phối tử TNF là OX40L và trong đó kháng nguyên tế bào đích là protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP) và gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:100, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:101, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:102, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:103, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:11 hoặc SEQ ID NO:104, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:105.

Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:355, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:356.

Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó kháng nguyên tế bào đích là CD19

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó kháng nguyên tế bào đích là CD19.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:195 hoặc SEQ ID NO:252, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:196 hoặc SEQ ID NO:253, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:197 hoặc SEQ ID NO:254, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:198 hoặc SEQ ID NO:249, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:199 hoặc SEQ ID NO:250, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:200 hoặc SEQ ID NO:251.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 và bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:195, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:196 và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:197, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:198, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:199 và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:200.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 và bao

gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:252, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:253 và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:254, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:249, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:250 và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:251.

Theo một khía cạnh khác, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:202.

Theo một khía cạnh khác, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:358.

Theo một khía cạnh, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202 hoặc trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358.

Theo một khía cạnh cụ thể, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202. Theo một khía cạnh cụ thể khác, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358.

Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.

Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:97 và polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:96.

Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.

Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:97 và polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:96.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất mà được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba, và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:111 và SEQ ID NO:113, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112 và SEQ ID NO:114.

Theo một khía cạnh cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó mà được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba, và trong đó phân tử này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119 và SEQ ID NO:173, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120 và SEQ ID NO:174.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa miền CH3 và polypeptit thứ hai chứa miền CH3, một cách tương ứng, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với đầu tận C của miền CH3 bằng tác nhân liên kết peptit và trong đó polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ

phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của miền CH3 của polypeptit đã nêu.

Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên này chứa trime phối tử họ TNF bao gồm hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Cụ thể hơn, phân tử gắn kết kháng nguyên này chứa trime phối tử họ TNF này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:209, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:210, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:206, hoặc

(ii) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:213, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:214, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:206, hoặc

(iii) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:309, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:310, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:279, hoặc

(iv) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:313, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:314, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:279.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, được chọn từ nhóm bao gồm:

a) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:205, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:206, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:115 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:116;

b) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:205, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:206, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:117 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:118;

c) phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:206, chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:209 và chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:210;

d) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:205, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:206, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120;

e) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:205, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:206, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:173 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:174; và

f) phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:206, chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:213 và chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:214.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:205, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:206, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, được chọn từ nhóm bao gồm:

a) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:115 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:116;

b) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:117 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:118;

c) phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358, chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:209 và chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:210;

d) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120;

e) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:173 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:174; và

f) phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358, chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:213 và chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:214.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120.

Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó kháng nguyên tế bào đích là CEA

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó kháng nguyên tế bào đích là CEA.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:321, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:322, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:323, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:324, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:325, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:326.

Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích là phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA và bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:321, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:322 và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:323, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:324, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:325 và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:326.

Theo một khía cạnh khác, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:327 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:328.

Theo một khía cạnh, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:327 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:328.

Theo một khía cạnh khác, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:330.

Theo một khía cạnh, gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:330.

Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:330, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.

Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:330, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:97 và polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:96.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất mà được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba, và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:330,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:111 và SEQ ID NO:113, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112 và SEQ ID NO:114.

Theo một khía cạnh cụ thể khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, và trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm:

chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

chuỗi nặng thứ hai bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai, và chuỗi nhẹ thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó mà được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba, và trong đó phân tử này bao gồm:

i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:330,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119 và SEQ ID NO:173, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120 và SEQ ID NO:174.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, bao gồm:

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua,

trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa miền CH3 và polypeptit thứ hai chứa miền CH3, một cách tương ứng, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó mà được nối với nhau và với đầu tận C của miền CH3 bằng tác nhân

liên kết peptit và trong đó polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó được nối thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của miền CH3 của polypeptit đã nêu.

Theo một khía cạnh cụ thể, phân tử gắn kết kháng nguyên này chứa trime phối tử họ TNF bao gồm hai gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích.

Cụ thể hơn, phân tử gắn kết kháng nguyên này chứa trime phối tử họ TNF này bao gồm:

(i) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:337, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:338, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334, hoặc

(ii) chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:341, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:342, và hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, được chọn từ nhóm bao gồm:

a) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:333, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:115 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:116;

b) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:333, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:117 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:118;

c) phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334, chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:337 và chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:338;

d) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:333, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120;

e) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:333, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:173 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:174; và

f) phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334, chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:341 và chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:342.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:333, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120.

Polynucleotit

Sáng chế còn đề cập đến các polynucleotit đã được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trong bản mô tả này hoặc phân mảnh của nó.

Polynucleotit đã được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF theo sáng chế có thể được biểu hiện dưới dạng một polynucleotit duy nhất mã hóa toàn bộ phân tử gắn kết kháng nguyên hoặc dưới dạng nhiều (chẳng hạn, hai hoặc nhiều hơn hai) polynucleotit được đồng biểu hiện. Polypeptit mã hóa bởi các polynucleotit đồng biểu hiện có thể kết hợp thông qua, chẳng hạn, liên kết disulfua hoặc các phương tiện khác để tạo thành phân tử gắn kết kháng nguyên chức năng. Ví dụ, phần chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có thể được mã hóa bằng polynucleotit tách biệt khỏi phần chuỗi nặng của globulin miễn dịch đó. Khi được đồng biểu hiện, các polypeptit chuỗi nặng sẽ kết hợp với các polypeptit chuỗi nhẹ để tạo thành globulin miễn dịch.

Theo một số khía cạnh, polynucleotit đã được phân lập mã hóa toàn bộ phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này. Cụ thể, polynucleotit đã được phân lập mã hóa polypeptit có trong phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polynucleotit đã được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF, trong đó polynucleotit này chứa (a) trình tự mã hóa gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, (b) trình tự mã hóa polypeptit bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và (c) trình tự mã hóa polypeptit bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit đã được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử 4-1BB, trong đó polynucleotit này chứa (a) trình tự mã hóa gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, (b) trình tự mã hóa polypeptit bao gồm hai miền ngoài của 4-1BBL hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và (c) trình tự mã hóa polypeptit bao gồm một miền ngoài của 4-1BBL hoặc phân mảnh của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit đã được phân lập chứa trình tự mã hóa polypeptit bao gồm hai mảnh 4-1BBL chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 90%, 95%, 98% hoặc 100% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:96, và đề cập đến polynucleotit chứa trình tự mã hóa polypeptit bao gồm một mảnh 4-1BBL chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 90%, 95%, 98% hoặc 100% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:96.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến polynucleotit đã được phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử OX40, trong đó polynucleotit này chứa (a) trình tự mã hóa gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, (b) trình tự mã hóa polypeptit bao gồm hai miền ngoài của OX40L hoặc hai phân mảnh của nó mà được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit và (c) trình tự mã hóa polypeptit bao gồm một miền ngoài của OX40L hoặc phân mảnh của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit đã được phân lập chứa trình tự mã hóa polypeptit bao gồm hai mảnh 4-1BBL chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 90%, 95%, 98% hoặc 100% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54, và đề cập đến polynucleotit chứa trình tự mã hóa

polypeptit bao gồm một mảnh 4-1BBL chứa trình tự axit amin giống hệt ít nhất khoảng 90%, 95%, 98% hoặc 100% với trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các polynucleotit chứa trình tự giống hệt ít nhất khoảng 90%, 95%, 98% hoặc 100% với trình tự ADN bổ sung đặc hiệu được mô tả trong bản mô tả. Theo một khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến polynucleotit chứa trình tự giống hệt với một trong các trình tự ADN bổ sung đặc hiệu bộc lộ trong bản mô tả.

Theo các khía cạnh khác, phân tử axit nucleic bao gồm hoặc chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin như được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 5, 6, 97, 98, 99, 183, 184 hoặc 185. Theo một khía cạnh khác, phân tử axit nucleic bao gồm hoặc chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin như được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO:14, 15, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115,116, 117, 118, 119, 120, 173 hoặc 174.

Theo các khía cạnh khác nữa, phân tử axit nucleic bao gồm hoặc chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 66, 67, 68, 69, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 137, 138, 141, 142, 143, 144, 146, 147, 150, 151, 152, 153, 162, 163, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 203, 204, 207, 208, 211, 212, 215, 216, 273, 274, 277, 278, 281, 282, 285, 286, 289, 290, 293, 294, 297, 298, 301, 302, 305, 307, 308, 311, 312, 315, 316, 331, 332, 335, 336, 339, 340, 343, 344, 347, 348, 353 hoặc 354.

Theo một số khía cạnh nhất định, polynucleotit hoặc axit nucleic là ADN. Theo các phương án khác, polynucleotit theo sáng chế là ARN, ví dụ, ở dạng ARN thông tin (mARN). ARN theo sáng chế có thể có dạng sợi đơn hoặc sợi đôi.

Phương pháp tái tổ hợp

Các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế có thể thu được, ví dụ, bằng phương pháp tổng hợp peptit ở trạng thái rắn (ví dụ, phương pháp tổng hợp pha rắn Merrifield) hoặc phương pháp sản xuất tái tổ hợp. Đối với phương pháp sản xuất tái tổ hợp, một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF hoặc các mảnh polypeptit của chúng, chẳng hạn, như được mô tả ở trên, được phân lập và cài xen vào một hoặc nhiều vectơ để tách dòng

và/hoặc biểu hiện thêm trong tế bào vật chủ. Polynucleotit này có thể dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường. Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề cập đến vectơ, tốt hơn là vectơ biểu hiện, bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit theo sáng chế. Các phương pháp mà đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để tạo cấu trúc cho các vectơ biểu hiện chứa trình tự mã hóa của phân tử (mảnh) gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF 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 kỹ thuật tái tổ hợp *in vivo*/tái tổ hợp di truyền. Ví dụ, xem các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); và Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). Vectơ biểu hiện có thể là một phần của plamit, virut, hoặc có thể là mảnh axit nucleic. Vectơ biểu hiện bao gồm caxet biểu hiện mà polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF hoặc các mảnh polypeptit của nó (tức là vùng mã hóa) được tách dòng vào đó theo kiểu kết hợp điều khiển được với gen khởi đầu và/hoặc các phần tử 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 mà bao 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 vẫn có thể được coi là một phần của vùng mã hóa, nếu có, nhưng các trình tự bên bất kỳ, ví dụ, các gen khởi đầu, các điểm gắn kết ribosom, các gen kết thúc phiên mã, các intron, các vùng không được dịch mã ở đầu 5' và 3', và các vùng tương tự, không phải là một phần của vùng mã hóa. Hai hoặc nhiều hơn hai vùng mã hóa có thể có mặt trong một cấu trúc polynucleotit duy nhất, ví dụ, trên một vectơ duy nhất, hoặc trong các cấu trúc polynucleotit tách biệt, ví dụ, trên các vectơ tách biệt (khác nhau). Ngoài ra, vectơ bất kỳ có thể chứa một vùng mã hóa duy nhất, hoặc có thể bao gồm hai hoặc nhiều hơn hai vùng mã hóa, ví dụ, vectơ theo sáng chế có thể mã hóa một hoặc nhiều polypeptit, mà được tách sau dịch mã hoặc đồng thời với dịch mã thành các protein cuối cùng thông qua phân cắt phân giải protein. Ngoài ra, vectơ, polynucleotit, hoặc axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa các vùng mã hóa khác loại, được dung hợp hoặc không được dung hợp với polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế hoặc các mảnh

polypeptit của nó, hoặc các biến thể hoặc các dẫn xuất của nó. Các vùng mã hóa khác loại bao gồm không giới hạn ở các phần tử hoặc môtip đặc trưng, như peptit tín hiệu bài tiết hoặc miền chức năng khác loại. Sự kết hợp điều khiển được là khi vùng mã hóa cho sản phẩm gen, ví dụ, polypeptit, được kết hợp với một hoặc nhiều trình tự điều hòa theo cách sao cho đặt sự biểu hiện của sản phẩm gen dưới sự tác động hoặc kiểm soát của (các) trình tự điều hòa. Hai mảnh ADN (như vùng mã hóa polypeptit và gen khởi đầu có kết hợp với vùng này) "được kết hợp điều khiển được" nếu sự cảm ứng chức năng gen khởi đầu dẫn đến việc phiên mã mARN mã hóa sản phẩm gen mong muốn và nếu bản chất của liên kết giữa hai mảnh ADN này không cản trở khả năng của các trình tự điều hòa biểu hiện trong việc định hướng sự biểu hiện của sản phẩm gen hoặc cản trở khả năng của khuôn mẫu ADN cần được phiên mã. Do vậy, vùng gen khởi đầu có thể được kết hợp điều khiển được với axit nucleic mã hóa polypeptit nếu như gen khởi đầu này có khả năng ảnh hưởng đến sự phiên mã của axit nucleic đó. 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 định trước. Các phần tử kiểm soát phiên mã khác, bên cạnh gen khởi đầu, ví dụ, các gen tăng cường, các gen điều khiển, các gen kìm hãm, và các tín hiệu kết thúc phiên mã, có thể được kết hợp điều khiển được với polynucleotit này 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 mô tả trong bản mô tả. Nhiều vùng kiểm soát phiên mã đa dạng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các vùng này bao gồm, không giới hạn, các vùng kiểm soát phiên mã thực hiện chức năng trong các tế bào động vật có xương sống, như, nhưng không giới hạn ở, các đoạn gen khởi đầu và gen tăng cường từ các cytomegalovirut (ví dụ, gen khởi đầu ngay sớm, kết hợp với intron-A), simian virut 40 (ví dụ, gen khởi đầu sớm), và retrovirut (như, ví dụ, virut sacôm Rous). Các vùng kiểm soát phiên mã khác bao gồm các vùng thu được từ các gen động vật có xương sống như actin, protein sốc nhiệt, hocmon sinh trưởng của bò và â-globin của thỏ, cũng như các trình tự khác có khả năng kiểm soát sự biểu hiện gen trong các tế bào nhân điển hình. Các vùng kiểm soát phiên mã thích hợp khác bao gồm các gen khởi đầu đặc hiệu mô và các gen tăng cường cũng như các gen khởi đầu dễ cảm ứng (ví dụ, các gen khởi đầu dễ cảm ứng tetraxyclin). Tương tự, nhiều phần tử kiểm soát dịch mã đa dạng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan. Các phần tử này bao gồm, nhưng không bị giới hạn

ở các điểm gắn kết ribosom, codon bắt đầu và kết thúc dịch mã, và các phần tử thu được từ hệ virut (cụ thể là điểm vào ribosom bên trong, hoặc IRES, còn được biết đến là trình tự CITE). Caxet biểu hiện có thể còn bao gồm các dấu hiệu khác như nguồn gốc sao chép, và/hoặc các phần tử hợp nhất nhiễm sắc thể như các đoạn lặp tận cùng dài của retrovirut (LTR), hoặc các đoạn lặp tận cùng ngược (ITR) của virut liên quan đến adeno (AAV).

Các vùng mã hóa polynucleotit và axit nucleic theo sáng chế có thể kết hợp với các vùng mã hóa bổ sung mà mã hóa peptit bài tiết hoặc peptit tín hiệu và định hướng sự tiết ra polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit theo sáng chế. Ví dụ, nếu mong muốn tiết ra phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF hoặc các mảnh polypeptit của nó, thì ADN mã hóa trình tự tín hiệu có thể được đặt ở phía trước axit nucleic mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó. Theo giả thiết tín hiệu, các protein tiết ra từ các tế bào động vật có vú có peptit tín hiệu hoặc trình tự dẫn đầu bài tiết mà được phân cắt từ protein trưởng thành ngay khi việc xuất chuỗi protein đang phát triển qua lưới nội bào thô đã được bắt đầu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết được rằng các polypeptit tiết ra từ các tế bào động vật có xương sống thường có peptit tín hiệu dung hợp với đầu tận N của polypeptit, được phân cắt từ polypeptit đã được dịch mã để tạo ra 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 chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch được sử dụng, hoặc dẫn xuất chức năng của trình tự đó mà giữ được khả năng định hướng sự tiết ra của polypeptit kết hợp điều khiển được với peptit. Theo cách khác, peptit tín hiệu ở động vật có vú khác loại, hoặc dẫn xuất chức năng của nó, có thể được sử dụng. Ví dụ, trình tự dẫn đầu kiểu dại có thể được thay thế bằng trình tự dẫn đầu của chất hoạt hóa plasminogen mô người (TPA) hoặc β-glucuronidaza chuột nhắt.

ADN mã hóa trình tự protein ngắn mà có thể được dùng để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế sau đó (ví dụ, đuôi histidin) hoặc trợ giúp việc đánh dấu protein dung hợp có thể được bao gồm trong hoặc nằm ở cuối của polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit theo sáng chế. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến tế bào vật chủ bao gồm một hoặc nhiều vectơ theo sáng chế. Các polynucleotit và vectơ có thể kết hợp dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu, riêng lẻ hoặc tổ hợp, được mô tả trong bản mô tả liên quan đến các polynucleotit và vectơ, một cách tương ứng. Theo một khía cạnh, tế bào vật chủ bao gồm (ví dụ, đã được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng) vectơ bao gồm polynucleotit mã hóa (một phần của) phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "tế bào vật chủ" đề cập đến loại hệ tế bào bất kỳ mà có thể được xử lý kỹ thuật để tạo ra các protein dung hợp theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng. Các tế bào vật chủ thích hợp để sao chép và để hỗ trợ sự biểu hiện của phân tử gắn kết kháng nguyên là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các tế bào này có thể được chuyển nhiễm hoặc tải nạp khi cần bằng vectơ biểu hiện cụ thể và một lượng lớn tế bào chứa vectơ có thể được cho phát triển để gieo các chất lên men trên quy mô lớn để thu được lượng phân tử gắn kết kháng nguyên đủ cho các ứng dụng 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 điển hình khác nhau, như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary cells - CHO), các tế bào côn trùng, hoặc các tế bào tương tự. Ví dụ, các polypeptit có thể được sản sinh trong vi khuẩn cụ thể khi không cần sự glycosyl hóa. Sau khi biểu hiện, polypeptit này có thể được phân lập từ bột nhão tế bào vi khuẩn trong phân đoạn tan được và có thể được tinh thế thêm. Ngoài các sinh vật nhân rải rác, sinh vật nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp cho vectơ mã hóa polypeptit, bao gồm các chủng nấm và nấm men có con đường glycosyl hóa đã được "biến đổi giống như của người", dẫn đến việc tạo ra polypeptit có kiểu glycosyl hóa một phần hoặc hoàn toàn ở người. Xem tài liệu: Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004), và Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006).

Các tế bào vật chủ thích hợp cho sự biểu hiện của polypeptit (được glycosyl hóa) cũng thu được từ các sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Các ví dụ về các tế bào động vật không xương sống bao gồm các tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Một số chủng baculovirut đã được nhận biết mà có thể được sử dụng kết hợp với các tế bào côn trùng, cụ thể là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*. Giống cấy tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, xem

các patent Mỹ số 5959177, 6040498, 6420548, 7125978, và 6417429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để sản sinh các kháng thể trong thực vật chuyển gen). Các tế bào động vật có xương sống cũng có thể được dùng làm vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú được biến đổi thích hợp để phát triển trong huyền phù có thể là hữu ích. Các ví dụ khác về dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bằng SV40 (COS-7); dòng phôi thận người (tế bào 293 hoặc tế bào 293T như được mô tả, chẳng hạn, trong tài liệu: Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977)), các tế bào thận chuột đồng con (BHK), các tế bào nguyên sinh chuột nhắt (các tế bào TM4 như được mô tả, chẳng hạn, trong Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980)), các tế bào thận khỉ (CV1), các tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76), các tế bào caxinom cổ tử cung người (HELA), các tế bào thận chó (MDCK), các tế bào gan chuột chù (BRL 3A), các tế bào phổi người (W138), các tế bào gan người (Hep G2), tế bào u vú chuột nhắt (MMT 060562), các tế bào TRI (như được mô tả, chẳng hạn, trong Mather et al., Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), các tế bào MRC 5, và các tế bào FS4. Các dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO), bao gồm các tế bào dhfr-CHO (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); và các dòng tế bào u tủy như YO, NS0, P3X63 và Sp2/0. Để có thêm thông tin về một số dòng tế bào vật chủ động vật có vú thích hợp để sản xuất protein, xem tài liệu, chẳng hạn, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), các trang 255-268 (2003). Các tế bào vật chủ bao gồm các tế bào được nuôi cấy, chẳng hạn, các tế bào động vật có vú được nuôi cấy, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, các tế bào vi khuẩn và các tế bào thực vật, chỉ là một số được nêu tên, và cả các tế bào có trong động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen, thực vật được nuôi cấy hoặc mô động vật. Theo một phương án, tế bào vật chủ này là tế bào nhân điển hình, tốt hơn là tế bào động vật có vú, như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO), tế bào phôi thận người (HEK) hoặc tế bào dạng lympho (chẳng hạn, các tế bào Y0, NS0, Sp20). Các công nghệ tiêu chuẩn là đã biết trong lĩnh vực này để biểu hiện các gen lạ trong các hệ này. Các tế bào biểu hiện polypeptit bao gồm chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, có thể được xử lý kỹ thuật để cũng biểu hiện chuỗi còn lại trong số các chuỗi của globulin miễn dịch khác sao cho sản phẩm được biểu hiện là globulin miễn dịch có cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ bao gồm các polynucleotit mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó, như được nêu trong bản mô tả, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó, và bước thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế hoặc các mảnh polypeptit của nó từ tế bào vật chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào vật chủ).

Trong phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, các thành phần (ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích, một polypeptit bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó và polypeptit bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu hoặc phân mảnh của nó) không được dung hợp di truyền với nhau. Các polypeptit này được thiết kế sao cho các thành phần của nó (hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF hoặc các phân mảnh của nó và các thành phần khác như CH hoặc CL) được dung hợp với nhau một cách trực tiếp hoặc qua trình tự của tác nhân liên kết. Hợp phần và độ dài của tác nhân liên kết này có thể được xác định theo các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được thử nghiệm về độ hiệu quả. Các ví dụ về các trình tự của tác nhân liên kết giữa các thành phần khác nhau của phân tử gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được tìm thấy trong các trình tự nêu trong bản mô tả. Các trình tự khác cũng có thể được bao gồm để hợp nhất điểm 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, các gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích (ví dụ, mảnh Fab) tạo ra một phần phân tử gắn kết kháng nguyên bao gồm ít nhất vùng biến đổi globulin miễn dịch có khả năng gắn kết với kháng nguyên. Vùng biến đổi có thể tạo thành một phần của và thu được từ các kháng thể có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên và các mảnh của nó. Các phương pháp để sản xuất các kháng thể đa dòng và các kháng thể đơn dòng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ xem Harlow and Lane, “Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Các kháng thể không có trong tự nhiên có thể được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn, có thể được sản xuất bằng phương

pháp tái tổ hợp (ví dụ như được mô tả trong patent Mỹ số 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 (ví dụ xem patent Mỹ số 5969108 cấp cho McCafferty).

Các loại globulin miễn dịch của động vật bất kỳ có thể được sử dụng trong sáng chế. Các globulin miễn dịch không giới hạn hữu ích trong sáng chế có thể có nguồn gốc từ chuột, động vật linh trưởng, hoặc người. Nếu protein dung hợp được dự định là sử dụng cho người, thì dạng khảm của globulin miễn dịch có thể được sử dụng trong đó vùng hằng định của globulin miễn dịch là từ người. Dạng được biến đổi giống như của người hoặc ở người đầy đủ của globulin miễn dịch cũng có thể được tạo ra theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ xem patent Mỹ số 5565332 cấp cho Winter). Việc biến đổi giống như của người có thể đạt kết quả bằng các phương pháp khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở (a) ghép các CDR không phải của người (chẳng hạn, kháng thể cho) lên trên khung ở người (ví dụ, kháng thể nhận) và các vùng hằng định có hoặc không có sự lưu lại của các gốc khung quyết định (ví dụ, các vùng quan trọng để giữ được ái lực kháng nguyên gắn kết tốt hoặc các chức năng kháng thể tốt), (b) chỉ ghép các vùng quyết định tính đặc hiệu không phải của người (các SDR hoặc các a-CDR; các gốc quan trọng đối với tương tác kháng thể-kháng nguyên) lên trên các vùng khung và vùng hằng định, hoặc (c) cấy chuyển toàn bộ miền biến đổi không phải của người nhưng "che giấu" chúng bằng phần như ở người bằng cách thay thế các gốc bề mặt. Các kháng thể được biến đổi giống như của người và các phương pháp sản xuất chúng được xem xét, chẳng hạn, trong tài liệu: Almagro and Fransson, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008), và được mô tả thêm, chẳng hạn, trong tài liệu: Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); các 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 việc ghép SDR (a-CDR)); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991) (mô tả việc " tạo lại bề mặt"); Dall'Acqua et al., Methods 36, 43-60 (2005) (mô tả việc "xáo trộn FR"); và Osbourn et al., Methods 36, 61-68 (2005) và Klimka et al., Br J Cancer 83, 252-260 (2000) (mô tả phương pháp "chọn lọc theo chỉ dẫn" để xáo trộn FR). Các globulin miễn dịch cụ thể theo sáng chế là các globulin miễn dịch người. Các kháng

thể người và vùng biến đổi ở người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực liên quan. Các kháng thể người được mô tả tổng quát trong tài liệu 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 ở người có thể tạo thành một phần của và thu được từ các kháng thể người đơn dòng tạo ra bằng phương pháp lai (ví dụ, xem tài liệu Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, các trang 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Các kháng thể người và vùng biến đổi ở người cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chất kháng nguyên cho động vật chuyển gen mà đã được biến đổi để sản xuất các kháng thể người nguyên vẹn hoặc các kháng thể nguyên vẹn có vùng biến đổi ở người đáp ứng với thách thức kháng nguyên (ví dụ xem Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005). Các kháng thể người và vùng biến đổi ở người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập các trình tự vùng biến đổi của dòng vô tính Fv được chọn từ các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn thu được từ người (ví dụ xem tài liệu, Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); và McCafferty et al., Nature 348, 552-554; Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)). Thể thực khuẩn thường biểu hiện các mảnh kháng thể, hoặc dưới dạng các mảnh chuỗi đơn Fv (scFv) hoặc dưới dạng các mảnh Fab.

Theo một số khía cạnh nhất định, các gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích (ví dụ, mảnh Fab) có trong phân tử gắn kết kháng nguyên của sáng chế được xử lý kỹ thuật để có ái lực gắn kết tăng cường theo, ví dụ, các phương pháp được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2012/020006 (xem các ví dụ liên quan đến sự trưởng thành ái lực) hoặc Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004/0132066. Khả năng của phân tử gắn kết kháng nguyên theo sáng chế trong việc gắn kết với thể quyết định kháng nguyên đặc hiệu có thể được xác định thông qua thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA) hoặc các kỹ thuật khác quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan, ví dụ, kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (Liljeblad, et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)), và các 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 phân tử gắn kết kháng nguyên mà cạnh tranh với kháng thể tham chiếu để gắn kết với một kháng nguyên cụ thể. Theo một số phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên cạnh tranh này gắn kết với cùng một epitop (ví dụ, epitop thẳng

hoặc epitop cấu dạng) mà được gắn kết bởi phân tử gắn kết kháng nguyên tham chiếu. Các phương pháp lấy làm ví dụ chi tiết để lập bản đồ epitop mà phân tử gắn kết kháng nguyên gắn kết vào đó được đề cập trong tài liệu: Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Trong thử nghiệm cạnh tranh lấy làm ví dụ, kháng nguyên đã bất động được ủ trong dung dịch chứa phân tử gắn kết kháng nguyên được đánh dấu thứ nhất mà gắn kết với kháng nguyên này và phân tử gắn kết kháng nguyên không được đánh dấu thứ hai được thử nghiệm về khả năng của nó trong việc cạnh tranh với phân tử gắn kết kháng nguyên thứ nhất để gắn kết với kháng nguyên. Phân tử gắn kết kháng nguyên thứ hai này có thể có mặt trong phần dịch nổi trên bề mặt thể lai. Để làm đối chứng, kháng nguyên đã bất động được ủ trong dung dịch chứa phân tử gắn kết kháng nguyên được đánh dấu thứ nhất nhưng không chứa phân tử gắn kết kháng nguyên không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ trong các điều kiện cho phép kháng thể thứ nhất gắn kết với kháng nguyên, kháng thể không gắn kết dư được loại bỏ, và xác định lượng kháng nguyên đã bất động kết hợp với chất đánh dấu. Nếu lượng kháng nguyên đã bất động kết hợp với chất đánh dấu trong mẫu thử nghiệm về cơ bản là giảm so với mẫu đối chứng, thì điều đó chỉ ra rằng phân tử gắn kết kháng nguyên thứ hai cạnh tranh với phân tử gắn kết kháng nguyên thứ nhất để gắn kết với kháng nguyên. Xem tài liệu: Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF theo sáng chế được tạo ra như được mô tả trong bản mô tả này có thể được tinh chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực như sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký trao đổi ion, điện di gel, sắc ký ái lực, sắc ký loại trừ theo 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 thực, tính kỵ nước, tính ưa nước v.v., và sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan. Để tinh chế bằng phương pháp 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 chứa trime phối tử TNF gắn kết vào đó. Ví dụ, để tinh chế bằng sắc ký ái lực cho các protein dung hợp theo sáng chế, thì cơ chất với protein A hoặc protein G có thể được sử dụng. Phương pháp sắc ký ái lực và sắc ký loại trừ theo kích cỡ tuần tự protein A hoặc protein G có thể được sử dụng để phân lập phân tử gắn kết kháng nguyên về cơ bản như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Độ tinh khiết của phân tử gắn

kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF hoặc các mảnh của nó có thể xác định được bằng một loạt phương pháp phân tích đã được biết rõ bất kỳ bao gồm điện di gel, sắc ký lỏng cao áp, và phương pháp tương tự. Ví dụ, các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF được biểu hiện như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế được thể hiện là nguyên vẹn và được lắp ráp một cách thích hợp như được chứng minh bằng phương pháp SDS-PAGE khử và không khử.

Thử nghiệm

Phân tử gắn kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả có thể được nhận biết, sàng lọc, hoặc mô tả đặc điểm về các tính chất vật lý/hóa học và/hoặc các hoạt tính sinh học của chúng bằng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực liên quan.

1. Thử nghiệm ái lực

Ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF nêu trong bản mô tả đối với thụ thể TNF tương ứng có thể xác định được theo các phương pháp nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), có sử dụng dụng cụ tiêu chuẩn như dụng cụ BIAcore (GE Healthcare), và các thụ thể hoặc các protein đích như vậy có thể thu được bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Ái lực của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF đối với kháng nguyên tế bào đích cũng có thể được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) có sử dụng dụng cụ tiêu chuẩn như dụng cụ BIAcore (GE Healthcare), và các thụ thể hoặc các protein đích như vậy có thể thu được bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Phương án minh họa và lấy làm ví dụ cụ thể để đo ái lực gắn kết được mô tả trong Ví dụ 4. Theo một khía cạnh, K_D được đo bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt có sử dụng máy BIACORE® T100 (GE Healthcare) ở nhiệt độ 25°C.

2. Thử nghiệm gắn kết và các thử nghiệm khác

Sự gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF nêu trong bản mô tả với các tế bào biểu hiện thụ thể tương ứng có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các dòng tế bào biểu hiện thụ thể hoặc kháng nguyên đích cụ thể, ví dụ, bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy (FACS). Theo một khía cạnh, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) sạch biểu hiện thụ thể TNF được sử dụng trong thử nghiệm gắn kết. Các tế bào này được sử dụng trực tiếp sau khi phân lập (các PMBC chưa qua thí nghiệm) hoặc sau khi kích thích (các PMBC được hoạt hóa). Theo một khía cạnh khác, các tế

bào lá lách chuột nhắt được hoạt hóa (biểu hiện phân tử thụ thể TNF) được dùng để chứng minh sự gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế với các tế bào biểu hiện thụ thể TNF tương ứng.

Theo một khía cạnh khác, các dòng tế bào ung thư biểu hiện kháng nguyên tế bào đích, ví dụ FAP, được dùng để chứng minh sự gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên này với kháng nguyên tế bào đích.

Theo một khía cạnh khác, các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để nhận biết phân tử gắn kết kháng nguyên cạnh tranh với kháng thể hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên cụ thể để gắn kết với thụ thể đích hoặc TNF, một cách tương ứng. Theo một số phương án nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên cạnh tranh này gắn kết với cùng một epitop (chẳng hạn, epitop thẳng hoặc epitop cấu dạng) mà được gắn kết với kháng thế kháng đích đặc hiệu hoặc kháng thể kháng thụ thể TNF. Các phương pháp lấy làm ví dụ chi tiết để lập bản đồ epitop mà kháng thể gắn kết vào đó được đề cập trong tài liệu: Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", trong *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

3. Thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các thử nghiệm để nhận biết các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF mà gắn kết với kháng nguyên tế bào đích đặc hiệu và với thụ thể TNF đặc hiệu có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, chẳng hạn, khả năng truyền tín hiệu chủ vận qua thụ thể TNF trên các tế bào biểu hiện kháng nguyên tế bào đích. Các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF được nhận biết bằng các thử nghiệm khi có hoạt tính sinh học này *in vitro* cũng được đề cập đến.

Theo một số khía cạnh nhất định, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính sinh học này. Thử nghiệm để phát hiện hoạt tính sinh học của các phân tử này theo sáng chế là các thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 6. Ngoài ra, thử nghiệm để phát hiện sự phân giải tế bào (ví dụ, bằng cách xác định mức độ giải phóng LDH), động học gây chết tế bào theo chương trình được cảm ứng (ví dụ, bằng cách xác định hoạt tính Caspaza 3/7) hoặc hiện tượng chết tế bào theo chương trình (ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm TUNEL) là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ngoài ra, hoạt tính sinh học của các phức chất này có thể được đánh

giá bằng cách đánh giá các tác dụng của chúng đến khả năng sống sót, tăng sinh và tiết lymphokin của các tiểu quần thể lympho bào khác nhau như các tế bào NK, các tế bào NKT hoặc các tế bào T γδ hoặc đánh giá khả năng của chúng trong việc điều biến kiểu hình và chức năng của các tế bào trình diện kháng nguyên như các tế bào tua, các bạch cầu đơn nhân/đại thực bào hoặc các tế bào B.

Dược phẩm, dạng phối trộn và đường dùng

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF nêu trong bản mô tả, chẳng hạn, để sử dụng trong phương pháp trị liệu bất kỳ trong số các phương pháp trị liệu dưới đây. Theo một phương án, dược phẩm chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF nêu trong bản mô tả và ít nhất một tá dược dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF nêu trong bản mô tả và ít nhất một chất trị liệu bổ sung, chẳng hạn, như được mô tả dưới đây.

Dược phẩm theo sáng chế chứa một lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh của một hoặc nhiều phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF đã được hòa tan hoặc phân tán trong tá dược dược dụng. Cụm từ “dược dụng hoặc có thể chấp nhận về mặt dược lý" đề cập đến các phân tử và hợp phần mà thường không độc đối với đối tượng nhận ở các liều lượng và nồng độ được dùng, tức là không tạo ra phản ứng có hại, dị ứng hoặc phản ứng không mong muốn khác khi được sử dụng cho động vật, như, ví dụ, người, khi cần. Việc bào chế dược phẩm chứa ít nhất một phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF và tùy ý thành phần hoạt tính bổ sung sẽ được biết bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực này khi đọc phần mô tả, như được lấy ví dụ trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Cụ thể, dược phẩm này là dạng phối trộn được làm khô lạnh hoặc dung dịch chứa nước. Như được sử dụng trong bản mô tả, “tá dược dược dụng" bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, dung dịch đệm, môi trường phân tán, lớp phủ, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxi hóa, chất bảo quản (ví dụ, chất kháng khuẩn, chất kháng nấm), chất đẳng trương, muối, chất ổn định và các tổ hợp của chúng, như sẽ được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dược phẩm được thiết kế để dùng bằng cách tiêm, ví dụ, tiêm dưới da, nội bì, trong tổn thương, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong cơ, trong tủy mạc hoặc trong phúc mạc. Để tiêm, các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế có thể được phối trộn trong các dung dịch chứa nước, tốt hơn là trong các dung dịch đệm tương thích về mặt sinh lý như dung dịch Hanks, dung dịch Ringer, hoặc dung dịch đệm muối sinh lý. Dung dịch này có thể chứa các chất phối trộn như chất tạo hỗn dịch, chất ổn định và/hoặc chất phân tán. Theo cách khác, các protein dung hợp có thể ở dạng bột để cấu tạo với chất dẫn thuốc thích hợp, chẳng hạn, nước vô trùng không chứa chất gây sốt, trước khi sử dụng. Các dung dịch tiêm vô trùng được bào chế bằng cách hợp nhất các protein dung hợp theo sáng chế với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với các thành phần khác nhau khác được liệt kê dưới đây, khi cần. Việc vô trùng có thể được tiến hành dễ dàng, chẳng hạn, bằng cách lọc qua các màng lọc vô trùng. Nhìn chung, các thể phân tán được điều chế bằng cách hợp nhất các thành phần hoạt tính đã 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 dạng bột vô trùng để bào chế các dung dịch, hỗn dịch hoặc nhũ tương tiêm vô trùng, phương pháp bào chế được ưu tiên là kỹ thuật làm khô chân không hoặc làm khô lạnh mà tạo ra thành phần hoạt tính dạng bột cộng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ môi trường lỏng được lọc vô trùng từ trước của nó. Môi trường lỏng này cần được đệm thích hợp nếu cần và chất pha loãng lỏng đầu tiên được làm đẳng trương trước khi tiêm với đủ nước muối hoặc glucoza. Dược phẩm này cần phải ổn định trong các điều kiện bào chế và lưu giữ, và được bảo quản chống lại tác dụng nhiễm bẩn của các vi sinh vật, như vi khuẩn hoặc nấm. Biết được rằng sự nhiễm bẩn nội độc tố cần phải được duy trì nhỏ nhất ở mức an toàn, ví dụ, ít nhất bằng 0,5 ng/mg protein. Các tá dược dược dụng thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: các chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxi hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; các chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexametoni clorua; benzalkoni clorua; benzetoni clorua; phenol, rượu butylic hoặc rượu benzylic; các alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit phân tử lượng thấp (nhỏ hơn khoảng 10 gốc); các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin,

arginin, hoặc lysin; các monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, manoza, hoặc các dextrin; các chất chelat hóa như EDTA; các đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion trái dấu tạo muối như natri; các phức kim loại (ví dụ, phức Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Các hỗn dịch tiêm chứa nước có thể chứa các hợp chất mà làm tăng độ nhớt của hỗn dịch như natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, dextran, hoặc các chất tương tự. Tùy ý, hỗn dịch này cũng có thể chứa các chất ổn định hoặc các tác nhân thích hợp mà làm tăng độ hòa tan của các hợp chất để cho phép bào chế được các dung dịch có độ đậm đặc cao. Ngoài ra, hỗn dịch chứa các hợp chất hoạt tính có thể được bào chế dưới dạng hỗn dịch tiêm dạng dầu thích hợp. Các dung môi ưa mỡ hoặc các chất dẫn thuốc thích hợp bao gồm dầu béo như dầu vừng, hoặc este của axit béo tổng hợp, như etyl cleat hoặc triglyxerit, hoặc liposom.

Các thành phần hoạt tính có thể được nhồi trong các vi nang được tạo ra, ví dụ, bằng kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng cách polyme hóa mặt phân cách, ví dụ, hydroxymetylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metylmetacylat), một cách tương ứng, trong hệ thống phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, các liposom, các vi cầu albumin, các vi nhũ tương, các hạt cỡ nano và các nang cỡ nano) hoặc trong các đại nhũ tương. Các kỹ thuật này được mô tả trong tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Các dược phẩm giải phóng kéo dài có thể được bào chế. Các ví dụ thích hợp về dược phẩm giải phóng duy trì bao gồm cơ chất bán thấm của các polyme rắn kỵ nước chứa polypeptit, trong đó cơ chất này ở dạng vật phẩm được tạo hình, ví dụ như màng, hoặc vi nang. Theo các phương án cụ thể, sự hấp phụ kéo dài của dược phẩm tiêm có thể đạt được nhờ việc sử dụng các chất làm chậm hấp phụ trong dược phẩm đó, như, ví dụ, nhôm monostearat, gelatin hoặc tổ hợp của chúng.

Các tá dược dược dụng lấy làm ví dụ trong bản mô tả còn bao gồm chất phân tán thuốc trong kẽ như glycoprotein hyaluronidaza dễ tan có hoạt tính trung tính (sHASEGP), ví dụ, glycoprotein hyaluronidaza PH-20 dễ tan ở người, như rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Một số sHASEGP lấy làm ví dụ nhất định và các phương pháp sử dụng chúng, bao gồm rHuPH20, được mô tả trong công bố đơn patent Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza khác như chondroitinaza.

Các dạng phối trộn kháng thể khô lạnh lấy làm ví dụ được mô tả trong patent Mỹ số 6267958. Các dạng phối trộn kháng thể chứa nước bao gồm các dạng phối trộn được mô tả trong patent Mỹ số 6171586 và WO2006/044908, dạng phối trộn kháng thể chứa nước nêu trong WO2006/044908bao gồm dung dịch đệm histidin-axetat.

Ngoài các dược phẩm được mô tả trước đây, các protein dung hợp cũng có thể được phối trộn dưới dạng chế phẩm depot. Các chế phẩm tác dụng kéo dài như vậy có thể được sử dụng bằng cách cấy dưới da (ví dụ, dưới da hoặc trong cơ) hoặc bằng cách tiêm trong cơ. Như vậy, ví dụ, các protein dung hợp này có thể được phối trộn với các vật liệu dạng polyme hoặc kỵ nước thích hợp (ví dụ, dưới dạng nhũ tương trong dầu có thể chấp nhận được) hoặc nhựa trao đổi ion, hoặc dưới dạng dẫn xuất tan được ít, ví dụ, dưới dạng muối tan được ít.

Dược phẩm chứa các protein dung hợp theo sáng chế có thể được bào chế bằng các quy trình trộn, hòa tan, nhũ hóa, bao nang, nhồi thuốc vào bao nang, làm khô lạnh thông thường. Dược phẩm có thể được phối trộn theo cách thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất phụ trợ sinh lý dụng mà tạo điều kiện thuận lợi cho việc xử lý các protein thành dược phẩm mà có thể được sử dụng trong lĩnh vực dược phẩm. Dạng phối trộn chính xác tùy thuộc vào đường dùng được chọn.

Các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF có thể được phối trộn thành dược phẩm ở dạng axit hoặc bazơ tự do, dạng trung tính hoặc dạng muối. Các muối dược dụng là các muối mà gần như giữ được hoạt tính sinh học của axit hoặc bazơ tự do. Các muối này bao gồm các muối cộng axit, ví dụ, các muối được tạo ra bằng các nhóm amino tự do của hợp phần có protein, hoặc được tạo ra bằng các axit vô cơ như ví dụ, axit clohydric hoặc axit phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như axit axetic, axit oxalic, axit tartric hoặc axit mandelic. Các muối được tạo ra bằng các nhóm carboxyl tự do cũng có thể thu được từ các bazơ vô cơ như ví dụ, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt hydroxit; hoặc các bazơ hữu cơ như isopropylamin, trimetylamin, histidin hoặc procain. Các muối dược phẩm có xu hướng dễ tan trong các dung môi chứa nước và các dung môi proton khác nhiều hơn so với các dạng bazơ tự do tương ứng.

Dược phẩm trong bản mô tả cũng có thể chứa nhiều hơn một thành phần hoạt tính khi cần cho chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn là dược phẩm có các hoạt tính bổ cứu

mà không tác động có hại đến nhau. Các thành phần hoạt tính này có mặt một cách thích hợp trong hỗn hợp với lượng hữu hiệu đối với mục đích dự định.

Các dạng phối trộn được sử dụng để dùng *in vivo* nhìn chung là vô trùng. Việc vô trùng có thể được thực hiện một cách dễ dàng, chẳng hạn, bằng cách lọc qua các màng lọc vô trùng.

Các phương pháp trị liệu và dược phẩm

Phân tử bất kỳ trong số các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF nêu trong bản mô tả có thể được sử dụng trong các phương pháp trị liệu.

Để sử dụng trong các phương pháp trị liệu, các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế có thể được phối trộn, định liều lượng, và sử dụng theo cách phù hợp với thực tiễn y học tốt. Các yếu tố cần xem xét trong trường hợp này bao gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân gây rối loạn, vị trí phân phối chất, phương pháp dùng, lịch dùng, và các yếu tố khác được biết đối với bác sĩ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế để dùng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế để sử dụng để điều trị bệnh, cụ thể là dùng để điều trị bệnh ung thư. Theo một số khía cạnh nhất định, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng để điều trị bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một số khía cạnh nhất định, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh cho cá thể mắc bệnh bao gồm việc cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh của protein dung hợp. Theo một số khía cạnh nhất định, bệnh cần được điều trị là bệnh ung thư. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm các khối u rắn, bệnh ung thư bàng quang, caxinom tế bào thận, bệnh ung thư não, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư cổ trư cung, bệnh ung thư màng trong dạ con, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư trực tràng ruột kết, bệnh ung thư trực tràng, bệnh

ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, bệnh ung thư da, caxinom tế bào vảy, bệnh ung thư xương, và bệnh ung thư thận, u hắc sắc tố, u lympho tế bào B, bệnh bạch cầu tế bào B, u lympho không phải Hodgkin và bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính. Như vậy, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trong bản mô tả này dùng để điều trị bệnh ung thư. Đối tượng, bệnh nhân, hoặc "cá thể" cần điều trị thường là động vật có vú, đặc biệt hơn nữa là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng để điều trị các bệnh lây nhiễm, đặc biệt để điều trị bệnh nhiễm virut. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng để điều trị các bệnh tự miễn chẳng hạn như bệnh Luput.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế để sử dụng để điều trị caxinom tế bào vảy ở đầu và cổ (HNSCC), bệnh ung thư vú, bệnh ung thư trực tràng ruột kết (CRC), bệnh ung thư tuyến tụy (PAC), bệnh ung thư dạ dày, caxinom phổi tế bào không nhỏ (NSCLC) và u trung biểu mô, trong đó kháng nguyên tế bào đích là FAP.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF để sản xuất hoặc bào chế thuốc để điều tri bệnh ở cá thể cần điều trị. Theo một khía cạnh, thuốc này là để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh bao gồm việc cho cá thể mắc bệnh dùng một lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh của thuốc này. Theo một số phương án nhất định, bệnh cần điều trị là rối loạn tăng sinh, cụ thể là ung thư. Như vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế để sản xuất hoặc bào chế thuốc để điều trị bệnh ung thư. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm các khối u rắn, bệnh ung thư bàng quang, caxinom tế bào thận, bệnh ung thư não, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tuyến tụy, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư buồng trứng, bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư cổ trư cung, bệnh ung thư màng trong dạ con, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư trực tràng ruột kết, bệnh ung thư trực tràng, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư máu, bệnh ung thư da, caxinom tế bào vảy, bệnh ung thư xương,

và bệnh ung thư thận, u hắc sắc tố, u lympho tế bào B, bệnh bạch cầu tế bào B, u lympho không phải Hodgkin và bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính. Các rối loạn tăng sinh tế bào khác mà có thể được điều trị bằng cách sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở các khối u nằm ở: bụng, xương, ngực, hệ tiêu hóa, gan, tuyến tụy, màng bụng, tuyến nội tiết (thượng thận, tuyến cận giáp, tuyến yên, tinh hoàn, buồng trứng, tuyến ức, tuyến giáp), mắt, đầu và cổ, hệ thần kinh (trung ương và ngoại biên), hệ bạch huyết, xương chậu, da, mô mềm, lách, vùng ngực, và hệ niệu sinh dục. Cũng được bao gồm là các tình trạng bệnh lý tiền ung thư hoặc thương tổn và ung thư di căn. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ nhóm gồm có bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư da, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư đại trực tràng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư não, bệnh ung thư đầu và cổ. Người có hiểu biết trung bình có thể nhận ra rằng, trong một số trường hợp, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF có thể không chữa khỏi bệnh mà chỉ có thể đem đến một phần lợi ích. Theo một số khía cạnh, sự thay đổi sinh lý có một số lợi ích cũng được coi là lợi ích điều trị bệnh. Do đó, theo một số phương án, lượng phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF tạo ra thay đổi sinh lý được coi là "lượng hữu hiệu" hoặc "lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh".

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF như được mô tả trong bản mô tả này để sản xuất hoặc bào chế thuốc để điều trị các bệnh truyền nhiễm, cụ thể để điều trị bệnh nhiễm virut hoặc để điều trị các bệnh tự miễn, ví dụ, bệnh Luput.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ở cá thể, bao gồm việc cho cá thể đó dùng một lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế. Theo một khía cạnh, dược phẩm được sử dụng cho cá thể này chứa protein dung hợp theo sáng chế ở dạng dược dụng. Theo một số khía cạnh nhất định, bệnh cần điều trị là rối loạn tăng sinh. Theo một khía cạnh cụ thể, bệnh này là bệnh ung thư. Theo một khía cạnh khác, bệnh này là bệnh lây nhiễm hoặc bệnh tự miễn. Theo một số khía cạnh nhất định, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, chất chống ung thư nếu bệnh cần

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

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác) sẽ phụ thuộc vào loại bệnh cần điều trị, đường dùng, trọng lượng cơ thể của bệnh nhân, loại protein dung hợp, mức độ nghiêm trọng và quá trình của bệnh, protein dung hợp được sử dụng cho mục đích ngăn ngừa hay điều trị bệnh, những can thiệp trị liệu trước đây hoặc hiện tại, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với protein dung hợp, và sự kê đơn của bác sĩ điều trị. Bác sĩ chịu trách nhiệm về việc dùng này sẽ, trong trường hợp bất kỳ, xác định nồng độ của (các) thành phần hoạt tính trong dược phẩm và (các) liều dùng thích hợp cho từng đối tượng. Các lịch trình định liều khác nhau bao gồm nhưng không giới hạn ở, dùng một lần hoặc nhiều lần theo từng thời điểm khác nhau, sử dụng liều lớn, và truyền theo xung được dự tính nằm trong bản mô tả.

Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF được dùng một cách thích hợp cho bệnh nhân với một lần hoặc hàng loạt lần điều trị. Tùy thuộc vào loại và độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng từ 1µg/kg đến 15mg/kg (ví dụ, 0,1mg/kg – 10mg/kg) phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF có thể là liều lượng ứng viên ban đầu để dùng cho bệnh nhân, liệu, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần dùng riêng rẽ, hoặc bằng cách truyền liên tục. Một liều lượng hằng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ 1µg/kg đến 100mg/kg hoặc nhiều hơn, tùy thuộc vào các yếu tố nêu trên. Để dùng lặp lại trong một vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh lý, việc điều trị thường được duy trì cho đến khi có được mức ức chế các triệu chứng của bệnh theo ý muốn. Một liều lượng lấy làm ví dụ của protein dung hợp là nằm trong khoảng từ 0,005mg/kg đến 10mg/kg. Trong các ví dụ khác, liều lượng cũng có thể bao gồm từ khoảng 1mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 10mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 50mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 100mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 200mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 350mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 500mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 1mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 5mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 10mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 50mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 100mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 200mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 350mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng 500mg/kg trọng lượng cơ thể, đến

khoảng 1000mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc hơn 1000mg/kg trọng lượng cơ thể trong mỗi lần dùng, và khoảng bất kỳ thu được trong đó. Trong các ví dụ về khoảng thu được từ các giá trị số được liệt kê ở đây, khoảng từ 5mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 100mg/kg trọng lượng cơ thể, khoảng từ 5mg/kg trọng lượng cơ thể đến khoảng 500mg/kg trọng lượng cơ thể, v.v., có thể được dùng, dựa trên các giá trị số được mô tả trên đây. Do đó, một hoặc nhiều liều bằng khoảng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 5,0mg/kg hoặc 10mg/kg (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng) có thể được dùng cho bệnh nhân. Liều lượng này có thể được dùng ngắt quãng, ví dụ, mỗi tuần hoặc mỗi ba tuần (ví dụ, sao cho bệnh nhân nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ, khoảng sáu liều protein dung hợp). Liều lượng tải nạp cao hơn ban đầu, sau đó một hoặc nhiều liều lượng thấp hơn có thể được dùng. Tuy nhiên, các chế độ liều lượng khác có thể hữu ích. Tiến trình của liệu pháp này dễ dàng được theo dõi bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường.

Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế thường được sử dụng ở lượng hữu hiệu để đạt được mục đích được dự định. Để sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế, hoặc dược phẩm của nó, được dùng hoặc được áp dụng ở lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh. Việc xác định lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh thuộc phạm vi kiến thức của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, đặc biệt là theo bản mô tả chi tiết được đề cập ở đây.

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

Liều lượng ban đầu cũng có thể được ước tính từ số liệu *in vivo*, ví dụ, mô hình động vật, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng tối ưu hóa việc dùng cho người dựa trên số liệu ở động vật.

Liều lượng và khoảng cách dùng có thể được điều chỉnh riêng rẽ để tạo ra nồng độ trong huyết tương của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF đủ để duy trì tác dụng điều trị bệnh. Liều lượng thường dùng cho bệnh nhân để dùng bằng

cách tiêm nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50mg/kg/ngày, thường nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1mg/kg/ngày. Nồng độ hữu hiệu trong huyết tương cho tác dụng điều trị bệnh có thể đạt được bằng cách dùng nhiều liều mỗi ngày. Nồng độ trong huyết tương có thể được đo, ví dụ, bằng HPLC.

Trong trường hợp dùng khu trú hoặc hấp thụ chọn lọc, nồng độ khu trú hữu hiệu của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF có thể không liên quan đến nồng độ trong huyết tương. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tối ưu hóa liều lượng khu trú hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh mà không cần có thí nghiệm không đáng.

Liều lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh của phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF được mô tả ở đây thường đem đến lợi ích điều trị bệnh mà không gây ra độ độc hại cơ bản. Độ độc hại và độ hiệu nghiệm điều trị bệnh của protein dung hợp có thể được xác định bằng quy trình dược lý tiêu chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc động vật thử nghiệm. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào và nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng để xác định LD_{50} (liều lượng gây tử vong cho 50% dân số) và ED_{50} (liều lượng hữu hiệu cho tác dụng điều trị bệnh cho 50% dân số). Tỷ lệ liều lượng giữa tác động độc hại và tác dụng điều trị bệnh là chỉ số trị liệu, có thể được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ LD_{50}/ED_{50}. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF có chỉ số trị liệu lớn được ưu tiên hơn. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế có chỉ số trị liệu cao. Số liệu thu được từ thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng để phối trộn các khoảng liều lượng thích hợp để sử dụng ở người. Liều lượng này tốt hơn là nằm trong khoảng nồng độ tuần hoàn mà bao gồm ED_{50} có độ độc hại thấp hoặc không độc hại. Liều lượng có thể thay đổi trong khoảng này tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, ví dụ, dạng liều lượng được sử dụng, đường dùng được sử dụng, tình trạng bệnh lý của đối tượng, và yếu tố tương tự. Dạng phối trộn, đường dùng và liều lượng chính xác có thể được lựa chọn bởi từng bác sĩ xét theo tình trạng bệnh lý của bệnh nhân (xem tài liệu, ví dụ, Fingl et al., 1975, in: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1, được kết hợp toàn bộ vào bản mô tả bằng cách viện dẫn).

Bác sĩ theo dõi bệnh nhân được điều trị bằng protein dung hợp theo sáng chế sẽ biết cách thức và thời điểm kết thúc, ngắt quãng, hoặc điều chỉnh việc dùng do độ độc hại, rối loạn chức năng cơ quan, và dạng tương tự. Ngược lại, bác sĩ theo dõi cũng sẽ

biết điều chỉnh việc điều trị đến mức độ cao hơn nếu đáp ứng lâm sàng không đủ (ngoại trừ độ độc hại). Phạm vi liều được dùng để quản lý rối loạn đáng quan tâm thay đổi tùy thuộc vào độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý cần được điều trị, đường dùng, và yếu tố tương tự. Độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý có thể, ví dụ, được đánh giá, một phần, bằng các phương pháp đánh giá tiên lượng tiêu chuẩn. Hơn nữa, liều lượng và có lẽ là tần suất liều lượng cũng thay đổi theo độ tuổi, trọng lượng cơ thể, và đáp ứng của từng bệnh nhân.

Các chất khác và việc điều trị

Các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chất khác trong trị liệu. Ví dụ, protein dung hợp theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời với ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Thuật ngữ "chất trị liệu" bao gồm chất bất kỳ mà có thể được sử dụng để điều trị triệu chứng hoặc bệnh ở cá thể cần điều trị. Chất trị liệu bổ sung này có thể bao gồm các thành phần hoạt tính bất kỳ thích hợp cho chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn là các chất này có các hoạt tính bổ cứu mà không tác động có hại đến nhau. Theo một số phương án nhất định, chất trị liệu bổ sung là một chất chống ung thư khác.

Các chất khác này có mặt một cách thích hợp kết hợp với lượng hữu hiệu đối với mục đích dự định. Lượng hữu hiệu của các chất khác này phụ thuộc vào lượng protein dung hợp được sử dụng, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được mô tả ở trên. Các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF thường được sử dụng với các liều lượng bằng nhau và bằng các đường dùng như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được mô tả trong bản mô tả, hoặc ở liều lượng bất kỳ và theo đường dùng bất kỳ mà được xác định theo kinh nghiệm/lâm sàng là thích hợp

Các liệu pháp kết hợp nêu ở trên như vậy bao gồm việc dùng kết hợp (khi hai hoặc nhiều hơn hai chất trị liệu được chứa trong cùng một dược phẩm hoặc các dược phẩm riêng rẽ), và dùng riêng, trong trường hợp đó, việc dùng phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo sáng chế có thể diễn ra trước, đồng thời và/hoặc sau khi dùng chất trị liệu bổ sung và/hoặc chất phụ trợ khác.

Vật phẩm

Theo một khía cạnh khác theo sáng chế, sáng chế đề cập đến vật phẩm chứa các vật liệu hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn được mô tả ở trên. Vật phẩm bao gồm vật chứa và nhãn dán hoặc tờ rời kèm 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 IV, v.v.. Vật chứa có thể được làm từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc nhựa dẻo. Vật chứa này giữ dược phẩm có trong chính nó hoặc kết hợp với một dược 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 dùng trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút chặn mà kim tiêm dưới da đâm xuyên qua được). Ít nhất một hoạt chất trong dược phẩm là phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF theo sáng chế.

Nhãn dán hoặc tờ rời kèm trong bao gói chỉ ra rằng dược 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 chứa dược phẩm trong đó, trong đó dược phẩm này chứa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai chứa dược phẩm trong đó, trong đó dược phẩm này chứa chất gây độc tế bào khác hoặc chất trị liệu. Vật phẩm theo phương án này của sáng chế còn có thể bao gồm tờ rời kèm trong bao gói chỉ ra rằng dược phẩm có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý cụ thể.

Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm còn có thể bao gồm vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm dung dịch đệm dược dụng, như nước kìm khuẩn dùng để tiêm (BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó còn có thể bao gồm các vật liệu khác được mong đợi theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm vsvd dung dịch đệm khác, chất pha loãng, thiết bị lọc, kim, và xi lanh.

Bảng C (các trình tự):

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
1	(hu) 4-1BBL (71-254) ở người	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSPRSE

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
2	hu 4-1BBL (85-254)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
3	hu 4-1BBL (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSE
4	hu 4-1BBL (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSE
5	Dime hu 4-1BBL (71-254) được nối bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDG PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL PSPRSE
6	Monome hu 4-1BBL (71-254) cộng với tác nhân liên kết $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGS
7	FAP(28H1) CDR-H1	SHAMS
8	FAP(28H1) CDR-H2	AIWASGEQYYADSVKG
9	FAP(28H1) CDR-H3	GWLGNFDY
10	FAP(28H1) CDR-L1	RASQSVSRSYLA
11	FAP(28H1) CDR-L2	GASTRAT
12	FAP(28H1) CDR-L3	QQGQVIPPT
13	$(G4S)_2$	GGGGSGGGGS
14	Dime hu 4-1BBL (71-254) - CH1 chuỗi khóa Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDG PLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL PSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	Monome hu 4-1BBL (71-254)-CL	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
16	FAP(28H1) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGE QYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLV TVSS
17	FAP(28H1) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVS RSYLAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QGQVIPPTFGQGTKVEIK
18	Chuỗi ổ Fc kháng FAP(28H1)	Xem Bảng 2
19	Chuỗi nhẹ kháng FAP(28H1)	Xem Bảng 2
20	(hu) FAP người	UniProt số Q12884
21	Miền ngoài hu FAP + đuôi poly-lys + đuôi his_6	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYK TFFPNWISGQEYLHQSADNNIVLYNIETGQ SYTILSNRTMKSVNASNYGLSPDRQFVYL ESDYSKLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVRG NELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYL KQRPGDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYE EEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEFNDT DIPVIAYSYYGDEQYPRTINIPYPKAGAKN PVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPVPAMIASS DYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQNVS VLSICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTG WAGGFFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGY KHIHYIKDTVENAIQITSGKWEAINIFRVT QDSLFYSSNEFEEYPGRRNIYRISIGSYPPS KKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYA LVCYGPGIPISTLHDGRTDQEIKILEENKEL ENALKNIQLPKEEIKKLEVDEITLWYKMIL PPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFA

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		VNWISYLASKEGMVIALVDGRGTAFQGD KLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKFIEM GFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTG LFKCGIAVAPVSSWEYYASVYTERFMGLP TKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLL IHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDF QAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHF LKQCFSLSDGKKKKKKGHHHHHH
22	Trình tự nucleotit miền ngoài hu FAP+ đuôi poly-lys + đuôi his_6	CGCCCTTCAAGAGTTCATAACTCTGAAG AAAATACAATGAGAGCACTCACACTGA AGGATATTTAAATG GAACATTTTCTTATAAAACATTTTTTCCA AACTGGATTTCAGGACAAGAATATCTTC ATCAATCTGCAGATAACAATATAGTACT TTATAATATTGAAACAGGACAATCATAT ACCATTTTGAGTAATAGAACCATGAAAA GTGTGAATGCTTCAAATTACGGCTTATC ACCTGATCGGCAATTTGTATATCTAGAA AGTGATTATTCAAAGCTTTGGAGATACT CTTACACAGCAACATATTACATCTATGA CCTTAGCAATGGAGAATTTGTAAGAGG AAATGAGCTTCCTCGTCCAATTCAGTAT TTATGCTGGTCGCCTGTTGGGAGTAAAT TAGCATATGTCTATCAAAACAATATCTA TTTGAAACAAAGACCAGGAGATCCACC TTTTCAAATAACATTTAATGGAAGAGAA AATAAAATATTTAATGGAATCCCAGACT GGGTTTATGAAGAGGAAATGCTTGCTAC AAAATATGCTCTCTGGTGGTCTCCTAAT GGAAAATTTTTGGCATATGCGGAATTTA ATGATACGGATATACCAGTTATTGCCTA TTCCTATTATGGCGATGAACAATATCCT AGAACAATAAATATTCCATACCCAAAG GCTGGAGCTAAGAATCCCGTTGTTCGGA TATTTATTATCGATACCACTTACCCTGC GTATGTAGGTCCCCAGGAAGTGCCTGTT CCAGCAATGATAGCCTCAAGTGATTATT ATTTCAGTTGGCTCACGTGGGTTACTGA TGAACGAGTATGTTTGCAGTGGCTAAAA AGAGTCCAGAATGTTTCGGTCCTGTCTA TATGTGACTTCAGGGAAGACTGGCAGA CATGGGATTGTCCAAAGACCCAGGAGC ATATAGAAGAAAGCAGAACTGGATGGG CTGGTGGATTCTTTGTTTCAACACCAGT

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		TTTCAGCTATGATGCCATTTCGTACTAC AAAATATTTAGTGACAAGGATGGCTAC AAACATATTCACTATATCAAAGACACTG TGGAAAATGCTATTCAAATTACAAGTGG CAAGTGGGAGGCCATAAATATATTCAG AGTAACACAGGATTCACTGTTTTATTCT AGCAATGAATTTGAAGAATACCCTGGA AGAAGAAACATCTACAGAATTAGCATT GGAAGCTATCCTCCAAGCAAGAAGTGT GTTACTTGCCATCTAAGGAAAGAAAGGT GCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCGA CTACGCCAAGTACTATGCACTTGTCTGC TACGGCCCAGGCATCCCCATTTCCACCC TTCATGATGGACGCACTGATCAAGAAAT TAAAATCCTGGAAGAAAACAAGGAATT GGAAAATGCTTTGAAAAATATCCAGCTG CCTAAAGAGGAAATTAAGAAACTTGAA GTAGATGAAATTACTTTATGGTACAAGA TGATTCTTCCTCCTCAATTTGACAGATC AAAGAAGTATCCCTTGCTAATTCAAGTG TATGGTGGTCCCTGCAGTCAGAGTGTAA GGTCTGTATTTGCTGTTAATTGGATATCT TATCTTGCAAGTAAGGAAGGGATGGTC ATTGCCTTGGTGGATGGTCGAGGAACAG CTTTCCAAGGTGACAAACTCCTCTATGC AGTGTATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAA GTTGAAGACCAGATTACAGCTGTCAGA AAATTCATAGAAATGGGTTTCATTGATG AAAAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGT CCTATGGAGGATACGTTTCATCACTGGC CCTTGCATCTGGAACTGGTCTTTTCAAA TGTGGTATAGCAGTGGCTCCAGTCTCCA GCTGGGAATATTACGCGTCTGTCTACAC AGAGAGATTCATGGGTCTCCCAACAAA GGATGATAATCTTGAGCACTATAAGAAT TCAACTGTGATGGCAAGAGCAGAATATT TCAGAAATGTAGACTATCTTCTCATCCA CGGAACAGCAGATGATAATGTGCACTTT CAAAACTCAGCACAGATTGCTAAAGCTC TGGTTAATGCACAAGTGGATTTCCAGGC AATGTGGTACTCTGACCAGAACCACGGC TTATCCGGCCTGTCCACGAACCACTTAT ACACCCACATGACCCACTTCCTAAAGCA GTGTTTCTCTTTGTCAGACGGCAAAAAG

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		AAAAAGAAAAAGGGCCACCACCATCAC CATCAC
23	FAP chuột nhắt	UniProt số P97321
24	Miền ngoài FAP chuột+đuôi poly-lys+đuôi his_6	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYK TYFPNWISEQEYLHQSEDDNIVFYNIETRE SYIILSNSTMKSVNATDYGLSPDRQFVYLE SDYSKLWRYSYTATYYIYDLQNGEFVRG YELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYL KQRPGDPPFQITYTGRENRIFNGIPDWVYE EEMLATKYALWWSPDGKFLAYVEFNDSD IPIIAYSYYGDGQYPRTINIPYPKAGAKNP VVRVFIVDTTYPHHVGPMEVPVPEMIASS DYYFSWLTWVSSERVCLQWLKRVQNVS VLSICDFREDWHAWECPKNQEHVEESRT GWAGGFFVSTPAFSQDATSYYKIFSDKDG YKHIHYIKDTVENAIQITSGKWEAIYIFRV TQDSLFYSSNEFEGYPGRRNIYRISIGNSPP SKKCVTCHLRKERCQYYTASFSYKAKYY ALVCYGPGLPISTLHDGRTDQEIQVLEEN KELENSLRNIQLPKVEIKKLKDGGLTFWY KMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSV KSVFAVNWITYLASKEGIVIALVDGRGTA FQGDKFLHAVYRKLGVYEVEDQLTAVRK FIEMGFIDEERIAIWGWSYGGYVSSLALAS GTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASIYSERFM GLPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVD YLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQ VDFQAMWYSDQNHGILSGRSQNHLYTH MTHFLKQCFSLSDGKKKKKKGHHHHHH
25	Trình tự nucleotit miền ngoài FAP ở chuột+đuôi poly-lys+đuôi his_6	CGTCCCTCAAGAGTTTACAAACCTGAAG GAAACACAAAGAGAGCTCTTACCTTGA AGGATATTTTAAATG GAACATTCTCATATAAAACATATTTTCC CAACTGGATTTCAGAACAAGAATATCTT CATCAATCTGAGGATGATAACATAGTAT TTTATAATATTGAAACAAGAGAATCATA TATCATTTTGAGTAATAGCACCATGAAA AGTGTGAATGCTACAGATTATGGTTTGT CACCTGATCGGCAATTTGTGTATCTAGA AAGTGATTATTCAAAGCTCTGGCGATAT TCATACACAGCGACATACTACATCTACG ACCTTCAGAATGGGGAATTTGTAAGAG

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		G ATACGAGCTCCCTCGTCCAATTCAGTAT CTATGCTGGTCGCCTGTTGGGAGTAAAT TAGCATATGTATATCAAAACAATATTTA TTTGAAACAAAGACCAGGAGATCCACC TTTTCAAATAACTTATACTGGAAGAGAA AATAGAATATTTAATGGAATACCAGACT GGGTTTATGAAGAGGAAATGCTTGCCAC AAAATATGCTCTTTGGTGGTCTCCAGAT GGAAAATTTTTGGCATATGTAGAATTTA ATGATTCAGATATACCAATTATTGCCTA TTCTTATTATGGTGATGGACAGTATCCT AGAACTATAAATATTCCATATCCAAAGG CTGGGGCTAAGAATCCGGTTGTTCGTGT TTTTATTGTTGACACCACCTACCCTCACC ACGTGGGCCCAATGGAAGTGCCAGTTCC AGAAATGATAGCCTCAAGTGACTATTAT TTCAGCTGGCTCACATGGGTGTCCAGTG AACGAGTATGCTTGCAGTGGCTAAAAA GAGTGCAGAATGTCTCAGTCCTGTCTAT ATGTGATTTCAGGGAAGACTGGCATGCA TGGGAATGTCCAAAGAACCAGGAGCAT GTAGAAGAAAGCAGAACAGGATGGGCT GGTGGATTCTTTGTTTCGACACCAGCTT TTAGCCAGGATGCCACTTCTTACTACAA AATATTTAGCGACAAGGATGGTTACAA ACATATTCACTACATCAAAGACACTGTG GAAAATGCTATTCAAATTACAAGTGGCA AGTGGGAGGCCATATATATATTCCGCGT AACACAGGATTCACTGTTTTATTCTAGC AATGAATTTGAAGGTTACCCTGGAAGA AGAAACATCTACAGAATTAGCATTGGA AACTCTCCTCCGAGCAAGAAGTGTGTTA CTTGCCATCTAAGGAAAGAAAGGTGCC AATATTACACAGCAAGTTTCAGCTACAA AGCCAAGTACTATGCACTCGTCTGCTAT GGCCCTGGCCTCCCCATTTCCACCCTCC ATGATGGCCGCACAGACCAAGAAATAC AAGTATTAGAAGAAAACAAAGAACTGG AAAATTCTCTGAGAAATATCCAGCTGCC TAAAGTGGAGATTAAGAAGCTCAAAGA CGGGGGACTGACTTTCTGGTACAAGATG ATTCTGCCTCCTCAGTTTGACAGATCAA AGAAGTACCCTTTGCTAATTCAAGTGTA

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		TGGTGGTCCTTGTAGCCAGAGTGTTAAG TCTGTGTTTGCTGTTAATTGGATAACTTA TCTCGCAAGTAAGGAGGGGATAGTCATT GCCCTGGTAGATGGTCGGGGCACTGCTT TCCAAGGTGACAAATTCCTGCATGCCGT GTATCGAAAACTGGGTGTATATGAAGTT GAGGACCAGCTCACAGCTGTCAGAAAA TTCATAGAAATGGGTTTCATTGATGAAG AAAGAATAGCCATATGGGGCTGGTCCT ACGGAGGTTATGTTTCATCCCTGGCCCT TGCATCTGGAACTGGTCTTTTCAAATGT GGCATAGCAGTGGCTCCAGTCTCCAGCT GGGAATATTACGCATCTATCTACTCAGA GAGATTCATGGGCCTCCCAACAAAGGA CGACAATCTCGAACACTATAAAAATTCA ACTGTGATGGCAAGAGCAGAATATTTCA GAAATGTAGACTATCTTCTCATCCACGG AACAGCAGATGATAATGTGCACTTTCAG AACTCAGCACAGATTGCTAAAGCTTTGG TTAATGCACAAGTGGATTTCCAGGCGAT GTGGTACTCTGACCAGAACCATGGTATA TTATCTGGGCGCTCCCAGAATCATTTAT ATACCCACATGACGCACTTCCTCAAGCA ATGCTTTTCTTTATCAGACGGCAAAAAG AAAAAGAAAAAGGGCCACCACCATCAC CATCAC
26	Miền ngoài FAP khỉ đuôi dài+đuôi poly-lys+đuôi his_6	RPPRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYK TFFPNWISGQEYLHQSADNNIVLYNIETGQ SYTILSNRTMKSVNASNYGLSPDRQFVYL ESDYSKLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVRG NELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYL KQRPGDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYE EEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEFNDT DIPVIAYSYYGDEQYPRTINIPYPKAGAKN PFVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPVPAMIASSD YYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQNVSV LSICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTGW AGGFFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGYK HIHYIKDTVENAIQITSGKWEAINIFRVTQ DSLFYSSNEFEDYPGRRNIYRISIGSYPPSK KCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYAL VCYGPGIPISTLHDGRTDQEIKILEENKELE NALKNIQLPKEEIKKLEVDEITLWYKMILP PQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFA

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		VNWISYLASKEGMVIALVDGRGTAFQGD KLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKFIEM GFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTG LFKCGIAVAPVSSWEYYASVYTERFMGLP TKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLL IHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDF QAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHF LKQCFSLSDGKKKKKKGHHHHHH
27	Trình tự nucleotit miền ngoài FAP khỉ đuôi dài+đuôi poly-lys+đuôi his_6	CGCCCTCCAAGAGTTCATAACTCTGAAG AAAATACAATGAGAGCACTCACACTGA AGGATATTTTAAATG GGACATTTTCTTATAAAACATTTTTTCCA AACTGGATTTCAGGACAAGAATATCTTC ATCAATCTGCAGATAACAATATAGTACT TTATAATATTGAAACAGGACAATCATAT ACCATTTTGAGTAACAGAACCATGAAA AGTGTGAATGCTTCAAATTATGGCTTAT CACCTGATCGGCAATTTGTATATCTAGA AAGTGATTATTCAAAGCTTTGGAGATAC TCTTACACAGCAACATATTACATCTATG ACCTTAGCAATGGAGAATTTGTAAGAG GAAATGAGCTTCCTCGTCCAATTCAGTA TTTATGCTGGTCGCCTGTTGGGAGTAAA TTAGCATATGTCTATCAAAACAATATCT ATTTGAAACAAAGACCAGGAGATCCAC CTTTTCAAATAACATTTAATGGAAGAGA AAATAAAATATTTAATGGAATCCCAGAC TGGGTTTATGAAGAGGAAATGCTTGCTA CAAAATATGCTCTCTGGTGGTCTCCTAA TGGAAAATTTTTGGCATATGCGGAATTT AATGATACAGATATACCAGTTATTGCCT ATTCCTATTATGGCGATGAACAATATCC CAGAACAATAAATATTCCATACCCAAA GGCCGGAGCTAAGAATCCTTTTGTTCGG ATATTTATTATCGATACCACTTACCCTG CGTATGTAGGTCCCCAGGAAGTGCCTGT TCCAGCAATGATAGCCTCAAGTGATTAT TATTTCAGTTGGCTCACGTGGGTTACTG ATGAACGAGTATGTTTGCAGTGGCTAAA AAGAGTCCAGAATGTTTCGGTCTTGTCT ATATGTGATTTCAGGGAAGACTGGCAG ACATGGGATTGTCCAAAGACCCAGGAG CATATAGAAGAAAGCAGAACTGGATGG GCTGGTGGATTCTTTGTTTCAACACCAG

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		TTTTCAGCTATGATGCCATTTCATACTAC
		AAAATATTTAGTGACAAGGATGGCTAC
		AAACATATTCACTATATCAAAGACACTG
		TGGAAAATGCTATTCAAATTACAAGTGG
		CAAGTGGGAGGCCATAAATATATTCAG
		AGTAACACAGGATTCACTGTTTTATTCT
		AGCAATGAATTTGAAGATTACCCTGGAA
		GAAGAAACATCTACAGAATTAGCATTG
		GAAGCTATCCTCCAAGCAAGAAGTGTGT
		TACTTGCCATCTAAGGAAAGAAAGGTG
		CCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCGAC
		TACGCCAAGTACTATGCACTTGTCTGCT
		ATGGCCCAGGCATCCCCATTTCCACCCT
		TCATGACGGACGCACTGATCAAGAAATT
		AAAATCCTGGAAGAAAACAAGGAATTG
		GAAAATGCTTTGAAAAATATCCAGCTGC
		CTAAAGAGGAAATTAAGAAACTTGAAG
		TAGATGAAATTACTTTATGGTACAAGAT
		GATTCTTCCTCCTCAATTTGACAGATCA
		AAGAAGTATCCCTTGCTAATTCAAGTGT
		ATGGTGGTCCCTGCAGTCAGAGTGTAAG
		GTCTGTATTTGCTGTTAATTGGATATCTT
		ATCTTGCAAGTAAGGAAGGGATGGTCA
		TTGCCTTGGTGGATGGTCGGGGAACAGC
		TTTCCAAGGTGACAAACTCCTGTATGCA
		GTGTATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAAG
		TTGAAGACCAGATTACAGCTGTCAGAA
		AATTCATAGAAATGGGTTTCATTGATGA
		AAAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGTC
		CTATGGAGGATATGTTTCATCACTGGCC
		CTTGCATCTGGAACTGGTCTTTTCAAAT
		GTGGGATAGCAGTGGCTCCAGTCTCCAG
		CTGGGAATATTACGCGTCTGTCTACACA
		GAGAGATTCATGGGTCTCCCAACAAAG
		GATGATAATCTTGAGCACTATAAGAATT
		CAACTGTGATGGCAAGAGCAGAATATTT
		CAGAAATGTAGACTATCTTCTCATCCAC
		GGAACAGCAGATGATAATGTGCACTTTC
		AAAACTCAGCACAGATTGCTAAAGCTCT
		GGTTAATGCACAAGTGGATTTCCAGGCA
		ATGTGGTACTCTGACCAGAACCACGGCT
		TATCCGGCCTGTCCACGAACCACTTATA
		CACCCACATGACCCACTTCCTAAAGCAG
		TGTTTCTCTTTGTCAGACGGCAAAAAGA

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		AAAAGAAAAAGGGCCACCACCATCACC ATCAC
28	CEA người	UniProt số P06731
29	MCSP người	UniProt số Q6UVK1
30	EGFR người	UniProt số P00533
31	CD19 người	UniProt số P15391
32	CD20 người	Uniprot số P11836
33	CD33 ở người	UniProt số P20138
34	Lymphotoxin người α	UniProt số P01374
35	TNF người	UniProt số P01375
36	Lymphotoxin người β	UniProt số Q06643
37	OX40L người	UniProt số P23510
38	CD40L người	UniProt số P29965
39	FasL người	UniProt số P48023
40	CD27L người	UniProt số P32970
41	CD30L người	UniProt số P32971
42	4-1BBL người	UniProt số P41273
43	TRAIL người	UniProt số P50591
44	RANKL người	UniProt số O14788
45	TWEAK người	UniProt số O43508
46	APRIL người	UniProt số O75888
47	BAFF người	UniProt số Q9Y275
48	LIGHT người	UniProt số O43557
49	TL1A người	UniProt số O95150
50	GITRL người	UniProt số Q9UNG2

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
51	Ectodysplasin A người	UniProt số Q92838
52	hu 4-1BBL (50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL PSPRSE
53	hu OX40L (51-183)	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQ KEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFS QEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLM VASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNG GELILIHQNPGEFCVL
54	hu OX40L (52-183)	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQK EDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQ EVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMV ASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGG ELILIHQNPGEFCVL
55	Tác nhân liên kết peptit $(SG4)_2$	SGGGGSGGGG
56	Tác nhân liên kết peptit $G4(SG4)_2$	GGGGSGGGGSGGGG
57	Tác nhân liên kết peptit	GSPGSSSSGS
58	Tác nhân liên kết peptit $(G4S)_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
59	Tác nhân liên kết peptit	GSGSGNGS
60	Tác nhân liên kết peptit	GGSGSGSG
61	Tác nhân liên kết peptit	GGSGSG
62	Tác nhân liên kết peptit	GGSG
63	Tác nhân liên kết peptit	GGSGNGSG
64	Tác nhân liên kết peptit	GGNGSGSG

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
65	Tác nhân liên kết peptit	GGNGSG
66	Trình tự nucleotit dime hu 4-1BBL (71-254)-CH1chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 2
67	Trình tự nucleotit monome hu 4-1BBL (71-254)-CL 1	Xem Bảng 2
68	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng FAP(28H1)	Xem Bảng 2
69	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
70	(mu) 4-1BBL chuột	UniProt số Q3U1Z9-1
71	Trình tự nucleotit dime mu 4-1BBL (104-309, C137,160,246S)-CH1 chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 13
72	Trình tự nucleotit monome mu 4-1BBL (104-309, C137,160,246S)-CL	Xem Bảng 13
73	Trình tự nucleotit chuỗi Fc KK kháng FAP	Xem Bảng 13
74	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng FAP	Xem Bảng 13
75	Dime mu 4-1BBL (104-309, C137,160,246S) – CL chuỗi Fc DD	Xem Bảng 13
76	Monome mu 4-1BBL (104-309, C137,160,246S)-CL1	Xem Bảng 13
77	Chuỗi Fc KK kháng FAP	Xem Bảng 13
78	Chuỗi nhẹ kháng FAP	Xem Bảng 13
79	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc DP47	Xem Bảng 18

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
80	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18
81	Chuỗi ổ Fc DP47	Xem Bảng 18
82	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18
83	4-1BB Fc(kih) người	Xem Bảng 31
84	4-1BB Fc(kih) khỉ đuôi dài	Xem Bảng 31
85	4-1BB Fc(kih) chuột	Xem Bảng 31
86	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc	Xem Bảng 32
87	Trình tự nucleotit 4-1BB Fc(kih) người	Xem Bảng 32
88	Trình tự nucleotit 4-1BB Fc(kih) khỉ đuôi dài	Xem Bảng 32
89	Trình tự nucleotit 4-1BB Fc(kih) chuột	Xem Bảng 32
90	Chuỗi ổ Fc	Xem Bảng 32
91	4-1BB Fc(kih) người	Xem Bảng 32
92	4-1BB Fc(kih) khỉ đuôi dài	Xem Bảng 32
93	4-1BB Fc(kih) chuột	Xem Bảng 32
94	Trình tự nucleotit 4-1BB His người	Xem Bảng 33
95	4-1BB His người	Xem Bảng 33
96	(hu) 4-1BBL (71-248) người	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGL

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
97	Dime hu 4-1BBL (71-248) được nối bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
98	Dime hu 4-1BBL (80-254) được nối bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSEGGGGSGGGGSDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTG GLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
99	Dime hu 4-1BBL (52-254) được nối bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSEGGGGSGGGGSPWAVSGARASPGSA ASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSPRSE

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
100	FAP(4B9) CDR-H1	SYAMS
101	FAP(4B9) CDR-H2	AIIGSGASTYYADSVKG
102	FAP(4B9) CDR-H3	GWFGGFNY
103	FAP(4B9) CDR-L1	RASQSVTSSYLA
104	FAP(4B9) CDR-L2	VGSRRAT
105	FAP(4B9) CDR-L3	QQGIMLPPT
106	FAP(4B9) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGAST YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVT VSS
107	FAP(4B9) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTS SYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ QGIMLPPTFGQGTKVEIK
108	Dime hu 4-1BBL (71-254)-CH1 * Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 4
109	monome hu 4-1BBL (71-254)-CL *	Xem Bảng 4
110	Monome hu 4-1BBL (71-254)-(G4S)1-CL*	Xem Bảng 7
111	Dime hu 4-1BBL (52-254)-CH1* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 10
112	Monome hu 4-1BBL (52-254)-CL*	Xem Bảng 10
113	Dime hu 4-1BBL (80-254)-CH1* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 11
114	Monome hu 4-1BBL (80-254)-CL*	Xem Bảng 11
115	Dime hu 4-1BBL (71-254)-CL* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
116	Monome hu 4-1BBL (71-254)-CH1*	Xem Bảng 3
117	Dime hu 4-1BBL (71-254)-CL Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 22
118	Monome hu 4-1BBL (71-254)-CH1	Xem Bảng 22
119	Dime hu 4-1BBL (71-248)-CL* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 24
120	Monome hu 4-1BBL (71-248)-CH1*	Xem Bảng 24
121	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1) được dung hợp với dime 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 6
122	Chuỗi khóa Fc kháng FAP (28H1) được dung hợp với monome 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 6
123	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với dime 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 23
124	Chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với monome 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 23
125	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21
126	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với dime 4-1BBL (71-248)	Xem Bảng 26
127	Chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với monome 4-1BBL (71-248)	Xem Bảng 26
128	Tác nhân liên kết peptit	GGGGS
129	Trình tự nucleotit dime hu 4-1BBL (71-254) – CL* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
130	Trình tự nucleotit monome hu 4-1BBL (71-254) –CH1*	Xem Bảng 3
131	Trình tự nucleotit dime hu 4-1BBL (71-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 4
132	Trình tự nucleotit monome hu 4-1BBL (71-254) –CL*	Xem Bảng 4
133	Trình tự nucleotit kháng FAP (28H1) (VHCL) Chuỗi ổ Fc	Xem Bảng 4
134	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1) (VLCH1)	Xem Bảng 4
135	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (VHCL) (28H1)	Xem Bảng 4
136	Chuỗi nhẹ kháng FAP (VLCH1) (28H1)	Xem Bảng 4
137	Trình tự nucleotit monome hu 4-1BBL (71-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 5
138	Trình tự nucleotit dime hu 4-1BBL (71-254) –CL*	Xem Bảng 5
139	Monome hu 4-1BBL (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 5
140	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CL*	Xem Bảng 5
141	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1) được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 6
142	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc kháng FAP (28H1) được dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 6

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
143	Trình tự nucleotit monome hu 4-1BBL (71-254) – $(G4S)_1$- CL*	Xem Bảng 7
144	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc [kháng FAP (28H1)]$_2$	Xem Bảng 8
145	Chuỗi lõm Fc [kháng FAP (28H1)]$_2$	Xem Bảng 8
146	Trình tự nucleotit dime hu 4-1BBL (71-254) – FAP (VHCL*) Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 9
147	Trình tự nucleotit monome hu 4-1BBL (71-254) –FAP (VLCH1*)	Xem Bảng 9
148	Dime hu 4-1BBL (71-254) – FAP (VHCL*) chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 9
149	Monome hu 4-1BBL (71-254) –FAP (VLCH1*)	Xem Bảng 9
150	Trình tự nucleotit dime hu 4-1BBL (52-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 10
151	Trình tự nucleotit monome hu 4-1BBL (52-254) –CL*	Xem Bảng 10
152	Trình tự nucleotit dime hu 4-1BBL (80-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 11
153	Trình tự nucleotit monome hu 4-1BBL (80-254) –CL*	Xem Bảng 11
154	Trình tự nucleotit chuỗi Fc KK DP47	Xem Bảng 14
155	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 14
156	Chuỗi Fc KK DP47	Xem Bảng 14

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
157	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 14
158	Trình tự nucleotit dime mu 4-1BBL (104-309, C160S) – CL Chuỗi Fc DD	Xem Bảng 15
159	Trình tự nucleotit monome 4-1BBL (104-309, C160S) – CH1 chuột	Xem Bảng 15
160	Dime mu 4-1BBL (104-309, C160S) – CL Chuỗi Fc DD	Xem Bảng 15
161	Monome 4-1BBL (104-309, C160S) – CH1 chuột	Xem Bảng 15
162	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21
163	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21
164	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21
165	Trình tự nucleotit dime hu 4-1BBL (71-254) – CL chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 22
166	Trình tự nucleotit monome hu 4-1BBL (71-254) – CH1	Xem Bảng 22
167	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 23
168	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 23
169	Trình tự nucleotit dime hu 4-1BBL (71-248) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 24

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
170	Trình tự nucleotit monome hu 4-1BBL (71-248) – CH1*	Xem Bảng 24
171	Trình tự nucleotit dime hu 4-1BBL (71-248) – CL chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 25
172	Trình tự nucleotit monome hu 4-1BBL (71-248) – CH1	Xem Bảng 25
173	Dime hu 4-1BBL (71-248) – CL chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 25
174	Monome hu 4-1BBL (71-248) – CH1	Xem Bảng 25
175	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-248)	Xem Bảng 26
176	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-248)	Xem Bảng 26
177	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc DP47 được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 27
178	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc DP47 được dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 27
179	Chuỗi ổ DP47 Fc được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 27
180	Chuỗi khóa Fc DP47 được dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-254)	Xem Bảng 27

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
181	Trình tự nucleotit chuỗi nặng DP47 (hu IgG1 PGLALA)	Xem Bảng 29
182	Chuỗi nặng DP47 (hu IgG1 PGLALA)	xem Bảng 29
183	Monome hu 4-1BBL (71-254) cộng với tác nhân liên kết $(G4S)_1$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSPRSEGGGGS
184	Monome hu 4-1BBL (71-248) cộng với tác nhân liên kết $(G4S)_2$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLGGGGSGGGGS
185	Monome hu 4-1BBL (71-248) cộng với tác nhân liên kết $(G4S)_1$	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLGGGGS
186	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc đuôi avi của kháng nguyên CD19 người	Xem Bảng 43
187	Trình tự polypeptit chuỗi khóa Fc đuôi avi của kháng nguyên CD19 người	Xem Bảng 43
188	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc đuôi avi kháng nguyên CD19 khỉ đuôi dài	Xem Bảng 43
189	Trình tự polypeptit chuỗi khóa Fc đuôi avi của kháng nguyên CD19 khỉ đuôi dài	Xem Bảng 43

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
190	CD19 (8B8) HVR-L1 được biến đổi giống như của người	NSNGNT
191	CD19 (8B8) HVR-H2 được biến đổi giống như của người	KFNG
192	CD19 (8B8) var.1 đến 9 HVR-H2 được biến đổi giống như của người	TEKFQGRVTM
193	CD19 (8B8) var.5 HVR-L1 được biến đổi giống như của người	LENPNGNT
194	CD19 (8B8) var.9 HVR-L1 được biến đổi giống như của người	LENPSGNT
195	CD19 (8B8-018) CDR-H1	DYIMH
196	CD19 (8B8-018) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
197	CD19 (8B8-018) CDR-H3	GTYYYGSALFDY
198	CD19 (8B8-018) CDR-L1	KSSQSLENPNGNTYLN
199	CD19 (8B8-018) CDR-L2	RVSKRFS
200	CD19 (8B8-018) CDR-L3	LQLTHVPYT
201	CD19 (8B8-018) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYN DGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYW GQGTTVTVSS
202	CD19 (8B8-018) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLE NPNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSK RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIK
203	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
204	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
205	Chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
206	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
207	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc phối tử dime kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 49
208	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc phối tử monome kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 49
209	Chuỗi ổ Fc phối tử dime kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 49
210	Chuỗi khóa Fc phối tử monome kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 49
211	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc phối tử dime (71-248) kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 52
212	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc phối tử monome (71-248) kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 52
213	Chuỗi ổ Fc phối tử dime (71-248) kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 52
214	Chuỗi khóa Fc phối tử monome (71-248) kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 52
215	Trình tự nucleotit CD19 (8B8) VH dòng vô tính ban đầu	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTG AGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGA AGATGGCCTGCAAGGCTTCTGGATACAC ATTCACTGACTATATTATGCACTGGGTG AAGCAGAAGACTGGGCAGGGCCTTGAG TGGATTGGATATATTAATCCTTACAATG ATGGTTCTAAGTACACTGAGAAGTTCAA CGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAA ATCTTCCATCACAGCCTACATGGAGCTC AGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGG

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		TCTATTACTGTGCAAGAGGGACCTATTA TTATGGTAGCGCCCTCTTTGACTACTGG GGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCT CG
216	Trình tự nucleotit CD19 (8B8) VL dòng vô tính ban đầu	GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCT CCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGC CTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGC CTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTATT TGAACTGGTACCTCCAGAAACCAGGCC AGTCTCCACAACTCCTGATCTACAGGGT TTCCAAACGATTTTCTGGGGTCCTAGAC AGGTTCAGTGGTAGTGGATCAGGGACA GATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTG GAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTTCT GCCTACAACTTACACATGTCCCGTACAC GTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAAT AAAA
217	CD19 L1 nghịch ngẫu nhiên	Xem Bảng 53
218	CD19 L2 thuận ngẫu nhiên	Xem Bảng 53
219	CD19 H1 nghịch ngẫu nhiên	Xem Bảng 53
220	CD19 H2 thuận ngẫu nhiên	Xem Bảng 53
221	CD19 H3 nghịch không đổi	Xem Bảng 53
222	LMB3	Xem Bảng 53
223	D19 L1 thuận không đổi	Xem Bảng 54
224	CD19 L3 nghịch ngẫu nhiên	Xem Bảng 54
225	CD19 L3 thuận không đổi	Xem Bảng 54
226	CD19 H3 nghịch ngẫu nhiên	Xem Bảng 54
227	Trình tự nucleotit ECD-PDGFR đuôi SNAP của CD19 người	GGCCGCCGCTAGCGGCATCGACTACAA GGACGACGATGACAAGGCCGGCATCGA TGCCATCATGGACAAAGACTGCGAAAT GAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCTCTG GGCAAGCTGGAACTGTCTGGGTGCGAA CAGGGCCTGCACGAGATCAAGCTGCTG GGCAAAGGAACATCTGCCGCCGACGCC

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		GTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCGCCGTGC TGGGCGGACCAGAGCCACTGATGCAGG CCACCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTCA CCAGCCTGAGGCCATCGAGGAGTTCCCT GTGCCAGCCCTGCACCACCCAGTGTTCC AGCAGGAGAGCTTTACCCGCCAGGTGCT GTGGAAACTGCTGAAAGTGGTGAAGTT CGGAGAGGTCATCAGCTACCAGCAGCT GGCCGCCCTGGCCGGCAATCCCGCCGCC ACCGCCGCCGTGAAAACCGCCCTGAGC GGAAATCCCGTGCCCATTCTGATCCCCT GCCACCGGGTGGTGTCTAGCTCTGGCGC CGTGGGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGC CGTGAAAGAGTGGCTGCTGGCCCACGA GGGCCACAGACTGGGCAAGCCTGGGCT GGGTGATATCCCCGAGGAACCCCTGGTC GTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAATGCC GTGCTGCAGTGCCTGAAGGGCACCTCCG ATGGCCCTACCCAGCAGCTGACCTGGTC CAGAGAGAGCCCCCTGAAGCCCTTCCTG AAGCTGTCTCTGGGCCTGCCTGGCCTGG GCATCCATATGAGGCCTCTGGCCATCTG GCTGTTCATCTTCAACGTGTCCCAGCAG ATGGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCCTG GCCCCCCATCTGAGAAGGCTTGGCAGCC TGGCTGGACCGTGAACGTGGAAGGATC CGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGTGTCC GATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTG AAGAACAGATCTAGCGAGGGCCCCAGC AGCCCCAGCGGCAAACTGATGAGCCCC AAGCTGTACGTGTGGGCCAAGGACAGA CCCGAGATCTGGGAGGGCGAGCCTCCTT GCCTGCCCCCTAGAGACAGCCTGAACCA GAGCCTGAGCCAGGACCTGACAATGGC CCCTGGCAGCACACTGTGGCTGAGCTGT GGCGTGCCACCCGACTCTGTGTCTAGAG GCCCTCTGAGCTGGACCCACGTGCACCC TAAGGGCCCTAAGAGCCTGCTGAGCCTG GAACTGAAGGACGACAGGCCCGCCAGA GATATGTGGGTCATGGAAACCGGCCTGC TGCTGCCTAGAGCCACAGCCCAGGATGC CGGCAAGTACTACTGCCACAGAGGCAA CCTGACCATGAGCTTCCACCTGGAAATC ACCGCCAGACCCGTGCTGTGGCACTGGC

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		TGCTGAGAACAGGCGGCTGGAAGGTCG ACGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGG ATCTGAATGCTGTGGGCCAGGACACGC AGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTT GCCCTTTAAGGTGGTGGTGATCTCAGCC ATCCTGGCCCTGGTGGTGCTCACCATCA TCTCCCTTATCATCCTCATCATGCTTTGG CAGAAGAAGCCACGT
228	Trình tự nucleotit ECD-PDGFR đuôi SNAP của CD19 khỉ đuôi dài	CCGGCCGCCGCTAGCGGCATCGACTACA AGGACGACGATGACAAGGCCGGCATCG ATGCCATCATGGACAAAGACTGCGAAA TGAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCTCT GGGCAAGCTGGAACTGTCTGGGTGCGA ACAGGGCCTGCACGAGATCAAGCTGCT GGGCAAAGGAACATCTGCCGCCGACGC CGTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCGCCGTG CTGGGCGGACCAGAGCCACTGATGCAG GCCACCGCCTGGCTCAACGCCTACTTTC ACCAGCCTGAGGCCATCGAGGAGTTCCC TGTGCCAGCCCTGCACCACCCAGTGTTC CAGCAGGAGAGCTTTACCCGCCAGGTG CTGTGGAAACTGCTGAAAGTGGTGAAG TTCGGAGAGGTCATCAGCTACCAGCAGC TGGCCGCCCTGGCCGGCAATCCCGCCGC CACCGCCGCCGTGAAAACCGCCCTGAG CGGAAATCCCGTGCCCATTCTGATCCCC TGCCACCGGGTGGTGTCTAGCTCTGGCG CCGTGGGGGGCTACGAGGGCGGGCTCG CCGTGAAAGAGTGGCTGCTGGCCCACG AGGGCCACAGACTGGGCAAGCCTGGGC TGGGTGATATCCCCCAGGAACCCCTGGT CGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAATGC CGTGCTCCAGTGTCTCGAGGGCACCTCC GATGGCCCTACACAGCAGCTCGTGTGGT GCAGAGACAGCCCCTTCGAGCCCTTCCT GAACCTGTCTCTGGGCCTGCCTGGCATG GGCATCAGAATGGGCCCTCTGGGCATCT GGCTGCTGATCTTCAACGTGTCCAACCA GACCGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCCT GGCCTGCCAAGCGAGAAGGCTTGGCAG CCTGGATGGACCGTGTCCGTGGAAGGAT CTGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGTGTC CGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTG AAGAACAGAAGCAGCGAGGGCCCTAGC

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		AGCCCCAGCGGCAAGCTGAATAGCAGC CAGCTGTACGTGTGGGCCAAGGACAGA CCCGAGATGTGGGAGGGCGAGCCTGTG TGTGGCCCCCCTAGAGATAGCCTGAACC AGAGCCTGAGCCAGGACCTGACAATGG CCCCTGGCAGCACACTGTGGCTGAGCTG TGGCGTGCCACCCGACTCTGTGTCCAGA GGCCCTCTGAGCTGGACACACGTGCGGC CTAAGGGCCCTAAGAGCAGCCTGCTGA GCCTGGAACTGAAGGACGACCGGCCCG ACCGGGATATGTGGGTGGTGGATACAG GCCTGCTGCTGACCAGAGCCACAGCCCA GGATGCCGGCAAGTACTACTGCCACAG AGGCAACTGGACCAAGAGCTTTTACCTG GAAATCACCGCCAGACCCGCCCTGTGGC ACTGGCTGCTGAGAATCGGAGGCTGGA AGGTCGACGAGCAGAAGCTGATCTCCG AAGAGGACCTGAACGCCGTGGGCCAGG ATACCCAGGAAGTGATCGTGGTGCCCCA CAGCCTGCCCTTCAAGGTGGTCGTGATC AGCGCCATTCTGGCCCTGGTGGTGCTGA CCATCATCAGCCTGATCATCCTGATTAT GCTGTGGCAGAAAAAGCCCCGC
229	Trình tự polypeptit ECD-PDGFR đuôi SNAP của CD19 người	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCEM KRTTLDSPLGKLELSGCEQGLHEIKLLGK GTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPLMQATA WLNAYFHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQES FTRQVLWKLLKVVKFGEVISYQQLAALA GNPAATAAVKTALSGNPVPILIPCHRVVSS SGAVGGYEGGLAVKEWLLAHEGHRLGK PGLGDIPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGT SDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLGLPGLG IHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGP PSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDL GGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYV WAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQD LTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTH VHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVMET GLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHL EITARPVLWHWLLRTGGWKVDEQKLISE EDLNAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAI LALVVLTIISLIILIMLWQKKPR

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
230	Trình tự polypeptit ECD-PDGFR đuôi SNAP của CD19 khỉ đuôi dài	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCEM KRTTLDSPLGKLELSGCEQGLHEIKLLGK GTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPLMQATA WLNAYFHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQES FTRQVLWKLLKVVKFGEVISYQQLAALA GNPAATAAVKTALSGNPVPILIPCHRVVSS SGAVGGYEGGLAVKEWLLAHEGHRLGK PGLGDIPQEPLVVKVEEGDNAVLQCLEGT SDGPTQQLVWCRDSPFEPFLNLSLGLPGM GIRMGPLGIWLLIFNVSNQTGGFYLCQPG LPSEKAWQPGWTVSVEGSGELFRWNVSD LGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLNSSQLY VWAKDRPEMWEGEPVCGPPRDSLNQSLS QDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLS WTHVRPKGPKSSLLSLELKDDRPDRDMW VVDTGLLLTRATAQDAGKYYCHRGNWT KSFYLEITARPALWHWLLRIGGWKVDEQ KLISEEDLNAVGQDTQEVIVVPHSLPFKV VVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR
231	CD19 (8B8-5H09) CDR-L1	Xem Bảng 56
232	CD19 (8B8-5H09) CDR-L2	Xem Bảng 56
233	CD19 (8B8-5H09) CDR-L3	Xem Bảng 56
234	CD19 (8B8-5H09) CDR-H1	Xem Bảng 57
235	CD19 (8B8-5H09) CDR-H2	Xem Bảng 57
236	CD19 (8B8-5H09) CDR-H3	Xem Bảng 57
237	CD19 (8B8-7H07) CDR-L1	Xem Bảng 56
238	CD19 (8B8-7H07) CDR-L2	Xem Bảng 56
239	CD19 (8B8-7H07) CDR-L3	Xem Bảng 56
240	CD19 (8B8-7H07) CDR-H1	Xem Bảng 57
241	CD19 (8B8-7H07) CDR-H2	Xem Bảng 57
242	CD19 (8B8-7H07) CDR-H3	Xem Bảng 57
243	CD19 (8B8-2B03) CDR-L1	Xem Bảng 56

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
244	CD19 (8B8-2B03) CDR-L2	Xem Bảng 56
245	CD19 (8B8-2B03) CDR-L3	Xem Bảng 56
246	CD19 (8B8-2B03) CDR-H1	Xem Bảng 57
247	CD19 (8B8-2B03) CDR-H2	Xem Bảng 57
248	CD19 (8B8-2B03) CDR-H3	Xem Bảng 57
249	CD19 (8B8-2B11) CDR-L1	Xem Bảng 56
250	CD19 (8B8-2B11) CDR-L2	Xem Bảng 56
251	CD19 (8B8-2B11) CDR-L3	Xem Bảng 56
252	CD19 (8B8-2B11) CDR-H1	Xem Bảng 57
253	CD19 (8B8-2B11) CDR-H2	Xem Bảng 57
254	CD19 (8B8-2B11) CDR-H3	Xem Bảng 57
255	CD19 (8B8-5A07) CDR-L1	Xem Bảng 56
256	CD19 (8B8-5A07) CDR-L2	Xem Bảng 56
257	CD19 (8B8-5A07) CDR-L3	Xem Bảng 56
258	CD19 (8B8-5A07) CDR-H1	Xem Bảng 57
259	CD19 (8B8-5A07) CDR-H2	Xem Bảng 57
260	CD19 (8B8-5A07) CDR-H3	Xem Bảng 57
261	CD19 (8B8-5B08) CDR-L1	Xem Bảng 56
262	CD19 (8B8-5B08) CDR-L2	Xem Bảng 56
263	CD19 (8B8-5B08) CDR-L3	Xem Bảng 56
264	CD19 (8B8-5B08) CDR-H1	Xem Bảng 57
265	CD19 (8B8-5B08) CDR-H2	Xem Bảng 57
266	CD19 (8B8-5B08) CDR-H3	Xem Bảng 57
267	CD19 (8B8-5D08) CDR-L1	Xem Bảng 56

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
268	CD19 (8B8-5D08) CDR-L2	Xem Bảng 56
269	CD19 (8B8-5D08) CDR-L3	Xem Bảng 56
270	CD19 (8B8-5D08) CDR-H1	Xem Bảng 57
271	CD19 (8B8-5D08) CDR-H2	Xem Bảng 57
272	CD19 (8B8-5D08) CDR-H3	Xem Bảng 57
273	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ ban đầu CD19 (8B8)	Xem Bảng 58
274	Trình tự nucleotit chuỗi nặng ban đầu CD19 (8B8)	Xem Bảng 58
275	Chuỗi nhẹ ban đầu CD19 (8B8)	Xem Bảng 58
276	Chuỗi nặng ban đầu CD19 (8B8)	Xem Bảng 58
277	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ CD19 (8B8-2B11)	Xem Bảng 59
278	Trình tự nucleotit chuỗi nặng CD19 (8B8-2B11)	Xem Bảng 59
279	Chuỗi nhẹ CD19 (8B8-2B11)	Xem Bảng 59
280	Chuỗi nặng CD19 (8B8-2B11)	Xem Bảng 59
281	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ CD19 (8B8-7H07)	Xem Bảng 59
282	Trình tự nucleotit chuỗi nặng CD19 (8B8-7H07)	Xem Bảng 59
283	Chuỗi nhẹ CD19 (8B8-7H07)	Xem Bảng 59
284	Chuỗi nặng CD19 (8B8-7H07)	Xem Bảng 59
285	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ CD19 (8B8-2B03)	Xem Bảng 59

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
286	Trình tự nucleotit chuỗi nặng CD19 (8B8-2B03)	Xem Bảng 59
287	Chuỗi nhẹ CD19 (8B8-2B03)	Xem Bảng 59
288	Chuỗi nặng CD19 (8B8-2B03)	Xem Bảng 59
289	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5A07)	Xem Bảng 59
290	Trình tự nucleotit chuỗi nặng CD19 (8B8-5A07)	Xem Bảng 59
291	Chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5A07)	Xem Bảng 59
292	Chuỗi nặng CD19 (8B8-5A07)	Xem Bảng 59
293	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5D08)	Xem Bảng 59
294	Trình tự nucleotit chuỗi nặng CD19 (8B8-5D08)	Xem Bảng 59
295	Chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5D08)	Xem Bảng 59
296	Chuỗi nặng CD19 (8B8-5D08)	Xem Bảng 59
297	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5B08)	Xem Bảng 59
298	Trình tự nucleotit chuỗi nặng CD19 (8B8-5B08)	Xem Bảng 59
299	Chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5B08)	Xem Bảng 59
300	Chuỗi nặng CD19 (8B8-5B08)	Xem Bảng 59
301	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5H09)	Xem Bảng 59
302	Trình tự nucleotit chuỗi nặng CD19 (8B8-5H09)	Xem Bảng 59

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
303	Chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5H09)	Xem Bảng 59
304	Chuỗi nặng CD19 (8B8-5H09)	Xem Bảng 59
305	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 62
306	Chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 62
307	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc phối tử dime kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 64
308	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc phối tử monome kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 64
309	Chuỗi ổ Fc phối tử dime kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 64
310	Chuỗi khóa Fc phối tử monome kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 64
311	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc phối tử dime (71-248) kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 67
312	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc phối tử monome (71-248) kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 67
313	Chuỗi ổ Fc phối tử dime (71-248) kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 67
314	Chuỗi khóa Fc phối tử monome (71-248) kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 67

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
315	Trình tự nucleotit chuỗi nặng CD19(8B8-018) (huIgG1 PGLALA)	Xem Bảng 72
316	Chuỗi nặng CD19(8B8-018) (huIgG1 PGLALA)	Xem Bảng 72
317	Kháng mu CEA T84.66 VH	MKCSWVIFFL MAVVTGVNSE VQLQQSGAEL VEPGASVKLS CTASGFNIKD TYMHWVKQRP EQGLEWIGRI DPANGNSKYV PKFQGKATIT ADTSSNTAYL QLTSLTSEDT AVYYCAPFGY YVSDYAMAYW GQGTSVTVSS
318	Kháng mu CEA T84.66 VL	METDTLLLWV LLLWVPGSTG DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT MSCRAGESVD IFGVGFLHWY QQKPGQPPKL LIYRASNLES GIPVRFSGTG SRTDFTLIID PVEADDVATY YCQQTNEDPY TFGGGTKLEI K
319	IGHV1-69*08 IMGT số tiếp cận Z14309	TAAGGGGCTT CCTAGTCCTA AGGCTGAGGA AGGGATCCTG GTTTAGTTAA AGAGGATTTT ATTCACCCCT GTGTCCTCTC CACAGGTGTC CAGTCCCAGG TCCAGCTGGT GCAATCTGGG GCTGAGGTGA AGAAGCCTGG GTCCTCGGTG AAGGTCTCCT GCAAGGCTTC TGGAGGCACC TTCAGCAGCT ATACTATCAG CTGGGTGCGA CAGGCCCCTG GACAAGGGCT TGAGTGGATG GGAAGGATCA TCCCTATCCT TGGTACAGCA AACTACGCAC AGAAGTTCCA GGGCAGAGTC ACGATTACCG CGGACAAATC CACGAGCACA GCCTACATGG AGCTGAGCAG CCTGAGATCT GAGGACACGG CCGTGTATTA CTGTGCGAGA GA

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
320	IGKV3-11*01 IMGT số tiếp cận	CTGCAGCTGG AAGCTCAGCT CCCACCCAGC TGCTTTGCAT GTCCCTCCCA GCTGCCCTAC CTTCCAGAGC CCATATCAAT GCCTGTGTCA GAGCCCTGGG GAGGAACTGC TCAGTTAGGA CCCAGAGGGA ACCATGGAAG CCCCAGCTCA GCTTCTCTTC CTCCTGCTAC TCTGGCTCCC AGGTGAGGGG AACATGAGGT GGTTTTGCAC ATTAGTGAAA ACTCTTGCCA CCTCTGCTCA GCAAGAAATA TAATTAAAAT TCAAAGTATA TCAACAATTT TGGCTCTACT CAAAGACAGT TGGTTTGATC TTGATTACAT GAGTGCATTT CTGTTTTATT TCCAATTTCA GATACCACCG GAGAAATTGT GTTGACACAG TCTCCAGCCA CCCTGTCTTT GTCTCCAGGG GAAAGAGCCA CCCTCTCCTG CAGGGCCAGT CAGAGTGTTA GCAGCTACTT AGCCTGGTAC CAACAGAAAC CTGGCCAGGC TCCCAGGCTC CTCATCTATG ATGCATCCAA CAGGGCCACT GGCATCCCAG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTCACTCT CACCATCAGC AGCCTAGAGC CTGAAGATTT TGCAGTTTAT TACTGTCAGC AGCGTAGCAA CTGGCCTCCC ACAGTGATTC CACATGAAAC AAAAACCCCA ACAAGACCAT CAGTGTTTAC TAGATTATTA TACCAGCTGC TTCCTTTACA GACAGCTAGT GGGGTGGCCA CTCAGTGTTA GCATCTCAGC TCTATTTGGC CATTTTGGAG TTCAAGT
321	CEA CDR-H1	Xem Bảng 81
322	CEA CDR-H2	Xem Bảng 81

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
323	CEA CDR-H3	Xem Bảng 81
324	CEA CDR-L1	Xem Bảng 81
325	CEA CDR-L2	Xem Bảng 81
326	CEA CDR-L3	Xem Bảng 81
327	VH gắn kết CEA ban đầu	Xem Bảng 81
328	VL gắn kết CEA ban đầu	Xem Bảng 81
329	VH gắn kết CEA được biến đổi giống như của người	Xem Bảng 81
330	VL gắn kết CEA được biến đổi giống như của người	Xem Bảng 81
331	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
332	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
333	Chuỗi ổ Fc kháng CEA (T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
334	Chuỗi nhẹ kháng CEA (T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
335	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc phối tử dime kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 84
336	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc phối tử monome kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 84
337	Chuỗi ổ Fc phối tử dime kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 84
338	Chuỗi khóa Fc phối tử monome kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 84

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
339	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc phối tử dime (71-248) kháng CEA (T84.66-LCHA)	Xem Bảng 87
340	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc phối tử monome (71-248) kháng CEA (T84.66-LCHA)	Xem Bảng 87
341	Chuỗi ổ Fc phối tử dime (71-248) kháng CEA (T84.66-LCHA)	Xem Bảng 87
342	Chuỗi khóa Fc phối tử monome (71-248) kháng CEA (T84.66-LCHA)	Xem Bảng 87
343	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CEA(T84.66)	Xem Bảng 88
344	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66)	Xem Bảng 88
345	Chuỗi ổ Fc kháng CEA (T84.66)	Xem Bảng 88
346	Chuỗi nhẹ kháng CEA (T84.66)	Xem Bảng 88
347	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc phối tử dime kháng CEA(T84.66)	Xem Bảng 89
348	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc phối tử monome kháng CEA(T84.66)	Xem Bảng 89
349	Chuỗi ổ Fc phối tử dime kháng CEA(T84.66)	Xem Bảng 89
350	Chuỗi khóa Fc phối tử monome kháng CEA(T84.66)	Xem Bảng 89
351	Trình tự nucleotit hu NA3B3A2-avi His	Xem Bảng 92

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
352	NA3B3A2-avi-His người	Xem Bảng 92
353	Trình tự nucleotit dime hu OX40L (51-183) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 97
354	Trình tự nucleotit monome hu OX40L (51-183) – CH1*	Xem Bảng 97
355	Dime hu OX40L (51-183) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 97
356	Monome hu OX40L (51-183) – CH1*	Xem Bảng 97
357	CD19 (8B8-2B11) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYN DGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYW GQGTTVTVSS
358	CD19 (8B8-2B11) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLET STGTTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQLLEDPYTFGQGTKLEIK
359	CD19 (8B8-7H07) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYN DGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARGTYYYGSELFDYWG QGTTVTVSS
360	CD19 (8B8-7H07) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLET STGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQATHIPYTFGQGTKLEIK
361	CD19 (8B8-2B03) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDYITHWVRQAPGQGLEWMGYINPYND GSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARGTYYYGPDLFDYWG QGTTVTVSS
362	CD19 (8B8-2B03) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLET STGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRF

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQLTHVPYTFGQGXKLEIK
363	CD19 (8B8-5A07) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYN DGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYW GQGTTVTVSS
364	CD19 (8B8-5A07) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLET STGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQPGHYPGTFGQGTKLEIK
365	CD19 (8B8-5D08) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYN DGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARGTYYYGSELFDYWG QGTTVTVSS
366	CD19 (8B8-5D08) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLE TSTGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQLTHEPYTFGQGTKLEIK
367	CD19 (8B8-5B08) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYN DGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYW GQGTTVTVSS
368	CD19 (8B8-5B08) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLET STGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQLDSYPNTFGQGTKLEIK
369	CD19 (8B8-5H09) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYN DGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYW GQGTTVTVSS
370	CD19 (8B8-5H09) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLES STGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRF

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQLIDYPVTFGQGTKLEIK
371	Dime huOX40L (51-183) được nối bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQ KEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFS QEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLM VASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNG GELILIHQNPGEFCVLGGGGSGGGGSQVS HRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKED EIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEV NISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVAS LTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELI LIHQNPGEFCVL
372	Dime huOX40L (52-183) được nối bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQK EDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQ EVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMV ASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGG ELILIHQNPGEFCVLGGGGSGGGGSVSHR YPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEI MKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNI SLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLT YKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILI HQNPGEFCVL
373	hu 4-1BBL (85-248)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
374	hu 4-1BBL (80-248)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
375	hu 4-1BBL (52-248)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR

SEQ ID NO:	Tên	Trình tự
		NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL

Thông tin chung liên quan đến các trình tự nucleotit của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch ở người được nêu trong tài liệu: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Axit amin của các chuỗi kháng thể được đánh số và được dẫn chiếu theo hệ thống đánh số EU theo Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) như được nêu ở trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là các ví dụ về các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Cần hiểu rằng có thể thực hiện nhiều phương án đa dạng khác tạo nên phần mô tả chung đề cập ở trên.

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

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

Giải trình tự ADN

Các trình tự ADN được xác định bằng cách giải trình tự sợi đôi.

Tổng hợp gen

Các đoạn gen mong muốn được tạo ra bằng PCR sử dụng các khuôn mẫu thích hợp hoặc được tổng hợp bằng Geneart AG (Regensburg, Đức) từ oligonucleotit tổng

hợp và sản phẩm PCR bằng cách tổng hợp gen tự động. Trong trường hợp không có sẵn trình tự gen chính xác, thì các đoạn mồi oligonucleotit được thiết kế dựa trên các trình tự từ các gen 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 có các điểm phân cắt endonucleaza giới hạn đơn lẻ nằm bên sườn được tách dòng thành vectơ tách dòng/giải trình tự tiêu chuẩn. ADN plasmit được tinh chế từ vi khuẩn đã được biến nạp và nồng độ được xác định bằng phép đo phổ UV. Trình tự ADN của các mảnh gen tái tạo dòng thuần được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Các đoạn gen được thiết kế có vị trí giới hạn thích hợp để cho phép tái tạo dòng thuần thành các vectơ biểu hiện tương ứng. Tất cả các cấu trúc đều được thiết kế có trình tự ADN ở đầu 5' mã hóa peptit dẫn đầu mà hướng đích protein để tiết ra trong tế bào nhân điển hình.

Các kỹ thuật nuôi cấy tế bào

Các kỹ thuật nuôi cấy tế bào tiêu chuẩn được sử dụng như được mô tả trong tài liệu: Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Tinh chế protein

Các protein được tinh chế từ các phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào đã được lọc theo phương pháp tiêu chuẩn. Nói một cách vắn tắt, các kháng thể được đưa vào cột Protein A Sepharoza (GE healthcare) và được rửa bằng PBS. Việc rửa giải các kháng thể đạt được ở độ pH = 2,8 sau đó trung hòa ngay mẫu đó. Protein đã kết tụ được tách ra khỏi các kháng thể monome bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ (Superdex 200, GE Healthcare) trong PBS hoặc trong Histidin 20mM, NaCl 150mM độ pH = 6,0. Các phân đoạn kháng thể monome được gom, được cô (nếu cần) bằng cách sử dụng chẳng hạn như thiết bị cô ly tâm MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), được cấp đông và bảo quản ở nhiệt độ -20°C hoặc -80°C. Một phần của các mẫu được sử dụng cho phân tích protein sau đó và đặc trưng hóa phân tích bằng các phương pháp, ví dụ, SDS-PAGE, sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) hoặc phổ khối.

SDS-PAGE

Hệ gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) được sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, sử dụng 10% hoặc 4-12% gel NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (độ

pH = 6,4) và NuPAGE® MES (gel đã khử có chất phụ gia đệm vận hành chất chống oxy hóa NuPAGE®) hoặc chất đệm vận hành MOPS (gel không khử).

Sắc ký loại trừ theo kích cỡ phân tích

Quy trình sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) để xác định sự kết tụ và trạng thái oligome của các kháng thể được thực hiện bằng phương pháp sắc ký HPLC. Nói một cách ngắn gọn, các kháng thể đã tinh chế Protein A được đưa vào cột Tosoh TSKgel G3000SW trong NaCl 300mM, KH_2PO_4 50mM /K_2HPO_4, độ pH=7,5 trên hệ thống Agilent HPLC 1100 hoặc vào cột Superdex 200 (GE Healthcare) trong 2 x PBS trên hệ thống Dionex HPLC-System. Protein đã rửa giải được định lượng bằng cách hấp phụ UV và tích phân các diện tích đỉnh. Tiêu chuẩn lọc gel BioRad 151–1901 dùng làm chuẩn.

Phổ khối

Phần này mô tả việc đặc trưng hóa các kháng thể nhiều đặc hiệu có cải biến trao đổi VH/VL (VH/VL CrossMabs) có nhấn mạnh việc lắp ráp chính xác của chúng. Các cấu trúc ban đầu mong muốn được phân tích bằng phương pháp đo phổ khối ion hóa phun điện (ESI-MS) của CrossMabs nguyên vẹn đã khử glycosyl hóa và CrossMabs đã khử glycosyl hóa/phân hủy plasmin hoặc theo cách khác là được khử glycosyl hóa/phân hủy LysC hạn chế.

VH/VL CrossMabs được khử glycosyl hóa bằng N-Glycosidaza F trong dung dịch đệm phosphat hoặc dung dịch đệm Tris ở nhiệt độ 37°C trong thời gian lên đến 17 giờ ở nồng độ protein bằng 1 mg/ml. Công đoạn phân hủy plasmin hoặc LysC hạn chế (Roche) được thực hiện với 100µg VH/VL CrossMabs đã khử glycosyl hóa trong dung dịch đệm Tris ở độ pH=8 ở nhiệt độ trong phòng trong 120 giờ và ở nhiệt độ 37°C trong 40 phút, một cách tương ứng. Trước khi đo phổ khối, các mẫu này được khử muối thông qua HPLC trên cột Sephadex G25 (GE Healthcare). Tổng khối được xác định thông qua ESI-MS trên hệ thống maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được trang bị nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Xác định sự gắn kết và ái lực gắn kết của các kháng thể nhiều đặc hiệu với các kháng nguyên tương ứng bằng cách sử dụng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) (BIACORE)

Sự gắn kết của các kháng thể đã tạo ra với các kháng nguyên tương ứng được nghiên cứu bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt có sử dụng dụng cụ BIAcore (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Thụy Điển). Nói một cách vắn tắt, để đo ái lực thì các kháng thể IgG dê kháng người, JIR 109-005-098 được làm bất động trên chip CM5 bằng cách ghép cặp amin để trình diện các kháng thể kháng các kháng nguyên tương ứng. Sự gắn kết được xác định trong dung dịch đệm HBS (HBS-P (HEPES 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,005%, độ pH=7,4), 25°C (hoặc theo cách khác ở nhiệt độ 37°C). Kháng nguyên (R&D Systems hoặc được tinh chế trong nhà) được bổ sung ở những nồng độ khác nhau trong dung dịch. Sự kết hợp được xác định bằng cách bơm kháng nguyên trong khoảng thời gian từ 80 giây đến 3 phút; sự phân ly được xác định bằng cách rửa bề mặt chip bằng dung dịch đệm HBS trong khoảng thời gian từ 3 đến 10 phút và trị số KD được ước tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir tỷ lệ 1:1. Các số liệu đối chứng âm (ví dụ, đường cong dung dịch đệm) được trừ đi từ đường cong mẫu để hiệu chuẩn sự chuyển dịch đường cơ sở bên trong hệ thống và để giảm tín hiệu gây nhiễu. Phần mềm đánh giá Biacore tương ứng được dùng để phân tích các biểu đồ cảm biến và để tính số liệu ái lực.

Ví dụ 1

1.1 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích

Các mảnh khác nhau của phần mã hóa trình tự ADN của miền ngoài (axit amin 71-254, 52-254 và 80-254) của phối tử 4-1BB người đã được tổng hợp theo trình tự P41273 của cơ sở dữ liệu Uniprot (SEQ ID NO:42).

Để làm các thành phần để lắp ráp phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF, polypeptit bao gồm hai miền ngoài của phối tử 4-1BB, được tách ra bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CH1 hoặc miền CL ở người, được tách dòng như được minh họa trên Fig.1A- (phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH1 hoặc CL) ở người hoặc

như được minh họa trên Fig.1C (CH3 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người).

Polypeptit bao gồm một miền ngoài của phối tử 4-1BB và được dung hợp với miền IgG1- CL hoặc CH1 ở người, được tách dòng như được mô tả trên Fig.1B (phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL hoặc CH1 người) hoặc như được mô tả trên Fig.1D (CH3 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người).

Các polypeptit này được tái tạo dòng thuần trong khung với các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người với các tác nhân liên kết peptit tùy ý, ví dụ, đối với cấu trúc 1, polypeptit mã hóa phối tử dime 4-1BB đã dung hợp với miền CH1 người được tái tạo dòng thuần trong khung với các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên khóa (Merchant, Zhu et al. 1998) có sử dụng tác nhân liên kết (GSPGSSSSGS) của SEQ ID NO:57.

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu đối với protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), tức là 28H1, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ (Carter, J. Immunol. Methods (2001), 248, 7-15) hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Việc tạo ra và điều chế tác nhân liên kết FAP được mô tả trong WO 2012/020006 A2, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Bảng 1 tóm tắt các đặc tính của các cấu trúc được tạo ra. Các cấu trúc từ 1 đến 10 khác nhau về hình học của chúng, hóa trị đối với FAP, miền ngoài phối tử 4-1BB, phần lai chéo của miền CH1 và miền CL (công nghệ CrossMab), các đột biến trong miền CH1 và miền CL và các tác nhân liên kết peptit khác nhau trong polypeptit bao gồm một miền ngoài của phối tử 4-1BB (chuỗi monome 4-1BBL).

Bảng 1: Các đặc tính của các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử TNF được tạo ra (trime 4-1BBL đã chia tách FAP)

Cấu trúc	Hóa trị đối với FAP	Tác nhân liên kết FAP	Miền ngoài 4-1BBL	Miền CH1-CL lai chéo	Gốc mang điện	Tác nhân liên kết với 4-1BBL trong chuỗi nhẹ
1.1	hóa trị một	28H1	71-254	Không có	Không có	$(G4S)_2$

Cấu trúc	Hóa trị đối với FAP	Tác nhân liên kết FAP	Miền ngoài 4-1BBL	Miền CH1-CL lai chéo	Gốc mang điện	Tác nhân liên kết với 4-1BBL trong chuỗi nhẹ
1.2	hóa trị một	28H1	71-254	có (Phối tử)	có (Phối tử)	$(G4S)_2$
1.3	hóa trị một	28H1	71-254	có (FAP Fab)	có (Phối tử)	$(G4S)_2$
1.4	hóa trị một	28H1	71-254	Không có	có (Phối tử)	$(G4S)_2$
1.5	hóa trị hai	28H1	71-254	Không có	Không có	$(G4S)_2$
1.6	hóa trị một	28H1	71-254	Không có	có (Phối tử)	(G4S)1
1.7	hóa trị hai	28H1	71-254	có (Phối tử)	có (Phối tử)	$(G4S)_2$
1.8	hóa trị hai	28H1	71-254	có (FAP Fab được dung hợp với phối tử)	có (Phối tử)	$(G4S)_2$
1.9	hóa trị một	28H1	52-254	Không có	có (Phối tử)	$(G4S)_2$
1.10	hóa trị một	28H1	80-254	Không có	có (Phối tử)	$(G4S)_2$

Để tránh bắt cặp sai, trong hầu hết các cấu trúc, một cặp của miền CH1 và miền CL được thay thế cho nhau (miền lai chéo) như được mô tả trong WO 2009/080253 A1.

Để cải thiện hơn nữa khả năng bắt cặp đúng, các cải biến thay thế axit amin mang điện khác nhau được đưa vào trong các miền CH1 và CL lai chéo hoặc không lai chéo dưới dạng các gốc mang điện trong các cấu trúc từ 2 đến 4 và từ 6 đến 10. Trong miền

CL người, các đột biến E123R và Q124K được đưa vào, trong khi đó các đột biến K147E và K213E được tách dòng vào miền CH1 người.

Đối với tất cả các cấu trúc, công nghệ heterodime hóa tra khóa vào ổ được được sử dụng với đột biến S354C/T366W trong miền CH3 của chuỗi khóa và đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V tương ứng trong miền CH3 của chuỗi ổ (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Các đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala đã được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với các thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831 A1.

Ví dụ, trong cấu trúc 1, sự kết hợp giữa chuỗi khóa Fc của phối tử chứa đột biến S354C/T366W ở miền CH3 thứ nhất, với chuỗi ổ Fc kháng FAP đã hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V ở miền CH3 thứ hai cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử trime 4-1BB được lắp ráp và Fab gắn kết FAP (Fig.2, Biểu đồ 1.1).

Bảng 2 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp chứa Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP hóa trị một (Cấu trúc 1.1).

Bảng 2: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP có cấu trúc 1.1

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
66	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CH1 chuỗi khóa Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA GGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAG AGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAG CCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTC GCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATT GACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGG GCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTC CTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGG CTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGC TGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGC TCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAG CCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTG GCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGC GAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGG ACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCT GGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCC GGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATC CCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGG GGGCGGAGGAAGCGGAGGGGGAGGAAGTGCT AGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCC CCTAGCAGCAAGAGCACAAGTGGAGGAACAGC CGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGC CCTGACAAGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGT GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCA

		GCGTCGTGACCGTGCCCTCTAGCTCTCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAGGTGGA ACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTC CCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGTGGCC CTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGG ACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTG ACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCCACGAGGAC CCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGC GTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATG AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA
67	Monome hu 4-1BBL (71-254) - CL	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA GGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTCG TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA

		CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
68	Chuỗi ổ Fc kháng FAP	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCT GGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTG CGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCCACGC CATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAG GCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCG GCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGC CGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGG CTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGG GCACCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCA AGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCA GCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGAC CTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCA GAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGT CACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTG CCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA

		CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA
69	Chuỗi nhẹ kháng FAP	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACCCTG TCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCC TGCAGAGCCTCCCAGTCCGTGTCCCGGTCCTAC CTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGC CCCTCGGCTGCTGATCATCGGCGCCTCTACCAG AGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTC TGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTC CCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA CTGCCAGCAGGGCCAGGTCATCCCTCCCACCTT TGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTA CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCT CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
14	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CH1 Chuỗi khóa Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

15	Monome hu 4-1BBL (71-254) –CL1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	Chuỗi ổ Fc kháng FAP(28H1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAM SWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW LGNFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
19	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLA WYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

Bảng 3 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP hóa trị một (Cấu trúc 1.2) với phần lai chéo CH1-CL và các gốc mang điện.

Bảng 3: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP có cấu trúc 1.2

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
129	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CL* Chuỗi khóa Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA GGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAG AGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAG CCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTC GCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATT GACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGG GCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTC CTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGG CTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGC TGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGC TCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAG CCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTG GCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGC GAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGG ACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCT GGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCC GGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATC CCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGG GGGCGGAGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTA CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTATCTTCCCAC CCAGCGACCGGAAGCTGAAGTCTGGCACAGCC AGCGTCGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCC CGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAA TGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCG TGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTAC

		AGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGC CGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCG AAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTG ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAA GACCCACACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGA AGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCC CCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCC GGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAT GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAAT TGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGC CAAGACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
130	Monome hu 4-1BBL (71-254) –CH1*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGAC TGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCC AGGCACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTAC AGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGAT TCCTGCCGGCCTGCCTAGCCCTAGATCTGAAGG CGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTA GCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCC CTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCC GCCCTGGGCTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCCC GAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCC

		CTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTG CTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGC GTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAAC CCAAGTCCTGC
68	Chuỗi ổ Fc kháng FAP	Xem Bảng 2
69	Chuỗi nhẹ kháng FAP	Xem Bảng 2
115	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CL* Chuỗi khóa Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
116	Monome hu 4-1BBL (71-254) –CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
18	Chuỗi ổ Fc kháng FAP(28H1)	Xem Bảng 2

19	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2

Bảng 4 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP hóa trị một có cấu trúc 1.3 (trime chia tách FAP với miền lai chéo CH1-CL trong Fab kháng FAP và các gốc mang điện trên các chuỗi chứa 4-1BBL).

Bảng 4: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP có cấu trúc 1.3

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
131	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA GGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAG AGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAG CCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTC GCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATT GACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGG GCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTC CTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGG CTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGC TGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGC TCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAG CCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTG GCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGC

		GAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGG ACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCT GGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCC GGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATC CCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGG GGGCGGAGGAAGCGGAGGGGGAGGAAGTGCT AGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGC CGCTCTGGGCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAG CCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCG TGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCA GCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCC CACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
132	Monome hu 4-1BBL (71-254) –CL*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA

		GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA GGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTCG TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATCGGAAGTTGAAATCTGGAACTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
133	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (VHCL) (28H1)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCT GGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTG CGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCCACGC CATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAG GCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCG GCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGC CGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGG CTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGG GCACCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCGTGG CCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCT GCAGAGCGGCAACAGCCAGGAATCCGTGACCG AGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTG AGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTA CGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGA CCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG AGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGACCCA CACCTGTCCCCCTTGCCCTGCCCCTGAAGCTGC TGGTGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAA GCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCC CCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGATGTGTCCC ACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGAC CAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT

		ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC TCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
134	Chuỗi nhẹ kháng FAP (VLCH1) (28H1)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTG AGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAG CTGCAGAGCCAGCCAGAGCGTGAGCCGGAGCT ACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAG GCCCCCAGACTGCTGATCATCGGCGCCAGCACC CGGGCCACCGGCATCCCCGATAGATTCAGCGG CAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCAT CAGCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGT ACTACTGCCAGCAGGGCCAGGTGATCCCCCCC ACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAA GAGCAGCGCTTCCACCAAAGGCCCTTCCGTGTT TCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGG AGGCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGG ATTATTTTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGA ATAGCGGAGCACTGACCTCTGGAGTGCATACTT TCCCCGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGACTGTACA GCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGC AGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT
108	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT

		FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
109	Monome hu 4-1BBL (71-254) –CL*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVF IFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
135	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (VHCL) (28H1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAM SWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW LGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
136	Chuỗi nhẹ kháng FAP (VLCH1) (28H1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLA WYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKV EIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC

Bảng 5 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP hóa trị một có cấu trúc 1.4 (trime chia

tách FAP với Fab kháng FAP, phối tử 4-1BB monome được dung hợp với chuỗi CH1-khóa và các gốc mang điện trên các chuỗi chứa 4-1BBL).

Bảng 5: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP có cấu trúc 1.4

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
137	Monome hu 4-1BBL (71-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGAC TGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCC AGGCACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTAC AGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGAT TCCTGCCGGCCTGCCTAGCCCTAGATCTGAAGG CGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTA GCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCC GCTCTGGGCTGCCTGGTCGAGGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGC CCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGT GCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAG CGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAG CCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC

		CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATG AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA
138	Dime hu 4-1BBL (71-254) –CL*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA GGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAG AGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAG CCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTC GCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATT GACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGG GCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTC CTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGG CTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGC TGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGC TCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAG CCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTG GCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGC GAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGG ACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCT GGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCC GGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATC CCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGG GGGCGGAGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTA

		CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC CATCTGATCGGAAGTTGAAATCTGGAACTGCCT CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
68	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
69	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
139	Monome hu 4-1BBL (71-254) – CL* Chuỗi khóa Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
140	Dime hu 4-1BBL (71-254) –CL*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD

		PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
19	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2

Bảng 6 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP hóa trị hai có cấu trúc 1.5 (trime chia tách FAP với 2 Fab kháng FAP, phối tử dime và monome 4-1BB được dung hợp ở đầu tận C của từng chuỗi nặng, một cách tương ứng).

Bảng 6: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP có cấu trúc 1.5

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
141	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1) được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-254)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCT GGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTG CGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCCACGC CATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAG GCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCG GCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGC CGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGG CTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGG

		GCACCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCA
		AGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCA
		GCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTG
		GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC
		GTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGAC
		CTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCA
		GAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGT
		CACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGAC
		CTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA
		ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG
		AGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTG
		CCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG
		TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCC
		TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG
		TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
		GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
		GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
		AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
		GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
		GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
		AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC
		CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG
		TGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA
		CCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTC
		AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA
		GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT
		ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC
		GGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTG
		GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
		CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
		CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
		GGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGA

		TCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGA
		TCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCAT
		GTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCT
		GATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCC
		TGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCT
		GAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG
		TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTC
		AGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAA
		GGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTG
		CAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCT
		CTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC
		TCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAA
		GGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAG
		GCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGG
		CTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCT
		ACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGA
		GATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGA
		AGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTA
		GAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCA
		GCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTT
		CGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGAT
		TGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGG
		GCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTC
		CTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGG
		CTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGC
		TGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGC
		TCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAG
		CCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTG
		GCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGC
		GAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGG
		ACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCT
		GGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCC

		GGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATC CCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
142	Chuỗi khóa Fc kháng FAP (28H1) được dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-254)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCT GGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTG CGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCCACGC CATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAG GCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCG GCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGC CGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGG CTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGG GCACCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCT CCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTG CCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC

		GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCA AGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGG CAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGA CAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCC GGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGAT CCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCAT GTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCT GATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCC TGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCT GAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGG TGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTC AGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAA GGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTG CAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCT CTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC TCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAA GGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAG GCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGG CTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCT ACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGA GATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGA A

69	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
121	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1) được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAM SWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW LGNFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
122	Chuỗi khóa Fc kháng FAP (28H1) được	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAM SWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW

	dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-254)	LGNFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
19	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2

Bảng 7 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP hóa trị một có cấu trúc 1.6 (trime chia tách FAP với Fab kháng FAP, monome phối tử 4-1BB được dung hợp với CL* thông qua tác nhân liên kết $(G4S)_2$).

Bảng 7: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP có cấu trúc 1.6

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự

131	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 4
143	Monome hu 4-1BBL (71-254) –$(G4S)_1$- CL*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA GGCGGAGGCGGATCTCGTACGGTGGCTGCACC ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATCGGAA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG

		GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAA CAGGGGAGAGTGT
68	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
69	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
108	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 4
110	Monome hu 4-1BBL (71-254) –$(G4S)_1$- CL*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
19	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2

Bảng 8 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP hóa trị hai có cấu trúc 7 (trime chia tách FAP với kháng FAP kép trên đầu tận N của chuỗi ổ Fc và các gốc mang điện trên CH1 và CL lai chéo được dung hợp với phối tử 4-1BB).

Bảng 8: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP có cấu trúc 1.7

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
129	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CL* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3
130	Monome hu 4-1BBL (71-254) –CH1*	Xem Bảng 3
144	Chuỗi ổ Fc [kháng FAP (28H1)]$_2$	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCT GGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTG CGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCCACGC CATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAG GCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCG GCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGC CGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGG CTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGG GCACCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACAA AGGGACCTAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCA GCAAGTCTACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTG GGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCC

		GTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACA
		AGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAG
		AGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTG
		ACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGAC
		CTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA
		ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAG
		AGCTGCGACGGCGGAGGGGGATCTGGCGGCGG
		AGGATCCGAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCG
		GAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGA
		CTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCT
		CCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTG
		GCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGG
		GCCTCCGGCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTG
		AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCC
		AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTG
		CGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC
		CAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGGG
		GACAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCT
		AGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCC
		CCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGC
		CGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
		CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAG
		CCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCG
		TGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCA
		GCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCA
		CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG
		CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGA
		GCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCC
		CACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGA
		CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG
		GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
		ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA

		CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTG CGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
69	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
115	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CL* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3
116	Monome hu 4-1BBL (71-254) –CH1*	Xem Bảng 3

145	Chuỗi ổ Fc [kháng FAP (28H1)]$_2$	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAM SWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW LGNFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQL LESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVR QAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
19	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2

Bảng 9 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP hóa trị hai có cấu trúc 1.8 (trime chia tách FAP với phối tử 4-1BB được dung hợp với CrossFab kháng FAP, với các gốc mang điện, trên chuỗi khóa).

Bảng 9: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP có cấu trúc 1.8

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
146	Dime hu 4-1BBL (71-254) – FAP (VHCL*) Chuỗi khóa Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA GGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAG AGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAG CCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTC GCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATT GACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGG GCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTC CTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGG CTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGC TGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGC TCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAG

		CCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTG GCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGC GAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGG ACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCT GGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCC GGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATC CCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGG GGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGAGG TGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTG CAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCC GCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCCACGCCATG TCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCTG GAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCGGCGA GCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTT CACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAACACCCT GTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGC TGGGCAACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACC CTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCGTGGCTGCA CCATCTGTCTTTATCTTCCCACCCAGCGACCGG AAGCTGAAGTCTGGCACAGCCAGCGTCGTGTG CCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAA GGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGA GCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAG GACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAG CACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGA AGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCAC CAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACCGGGGCGAGTGCGACAAGACCCACACCTG TCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGG CCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAA

		GGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGG ACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGG TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGTAAA
147	Monome hu 4-1BBL (71-254) –FAP (VLCH1*)	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG

		GCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGAC TGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCC AGGCACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTAC AGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGAT TCCTGCCGGCCTGCCTAGCCCTAGATCTGAAGG CGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGAGA TCGTGCTGACCCAGTCTCCCGGCACCCTGAGCC TGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGC AGAGCCAGCCAGAGCGTGAGCCGGAGCTACCT GGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCC CCAGACTGCTGATCATCGGCGCCAGCACCCGG GCCACCGGCATCCCCGATAGATTCAGCGGCAG CGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAG CCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA CTGCCAGCAGGGCCAGGTGATCCCCCCCACCTT CGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGTCCT CTGCTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTC TGGCCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGA ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGGAAGATTA CTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTC TGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCC AGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCT GAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAAG GTGGAACCCAAGTCCTGC
68	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2

69	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
148	Dime hu 4-1BBL (71-254) – FAP (VHCL*) Chuỗi khóa Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSEGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAI WASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSS ASVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
149	Monome hu 4-1BBL (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR

	–FAP (VLCH1*)	SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSEIVLTQSPGT LSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQA PRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIKSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
18	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
19	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2

Bảng 10 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (52-254) hướng đích FAP hóa trị một có cấu trúc 1.9 (trime đã chia tách FAP với các axit amin miền ngoài 4-1BBL ở các vị trí 52-254 và các gốc mang điện trên chuỗi phối tử).

Bảng 10: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP có cấu trúc 1.9

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
150	Dime hu 4-1BBL (52-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	CCTTGGGCTGTGTCTGGCGCTAGAGCCTCTCCT GGATCTGCCGCCAGCCCCAGACTGAGAGAGGG ACCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCCGGACT GCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTCGCCCAGCT GGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCC

		CCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTG
		GCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAA
		GAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGC
		CGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACT
		GCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAGGGATCTGGAT
		CTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCCCTGA
		GAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTG
		ACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCC
		CGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGACTG
		CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGT
		GCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG
		CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTG
		GGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCC
		GGACTGCCCAGCCCTAGATCTGAAGGCGGCGG
		AGGAAGCGGAGGCGGAGGATCCCCTTGGGCTG
		TGTCTGGCGCTAGAGCCTCTCCTGGATCTGCCG
		CCAGCCCCAGACTGAGAGAGGGACCTGAGCTG
		AGCCCCGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTG
		CGGCAGGGAATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAG
		AATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGTCCTGG
		TACTCCGACCCTGGCCTGGCAGGGGTGTCCCTG
		ACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAA
		AGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACT
		ATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGG
		TGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGG
		CTCTGCATCTGCAGCCTCTGCGCTCTGCTGCTG
		GCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGC
		CACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCC
		TTCGGGTTCCAAGGACGGCTGCTGCATCTGAGC
		GCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATAC
		TGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGA
		CCCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCG

		TGACACCTGAGATCCCCGCTGGCCTGCCTAGCC CAAGAAGTGAAGGGGGAGGCGGATCTGGCGGA GGGGGATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGT GTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCA GCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTC GAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCT GTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTC TAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACGAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT

		GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
151	Monome hu 4-1BBL (52-254) –CL*	CCTTGGGCTGTGTCTGGCGCTAGAGCCTCTCCT GGATCTGCCGCCAGCCCCAGACTGAGAGAGGG ACCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCCGGACT GCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTCGCCCAGCT GGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCC CCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTG GCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAA GAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGC CGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACT GCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAGGGATCTGGAT CTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCCCTGA GAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTG ACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCC CGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGT GCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACG CCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTG GGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCC GGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGG CGGATCTGGCGGCGGAGGATCTCGTACGGTGG CTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TCGGAAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGT GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC

		CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGT
68	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1)	xem Bảng 2
69	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	xem Bảng 2
111	Dime hu 4-1BBL (52-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPR SEGGGGSGGGGSPWAVSGARASPGSAASPRLRE GPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD

		SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
112	Monome hu 4-1BBL (52-254) –CL*	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPR SEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
18	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1)	xem Bảng 2
19	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	xem Bảng 2

Bảng 11 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (80-254) hướng đích FAP hóa trị một có cấu trúc 1.10 (trime đã chia tách FAP với axit amin miền ngoài 4-1BBL ở các vị trí 80-254 và các gốc mang điện trên chuỗi phối tử).

Bảng 11: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB người hướng đích FAP có cấu trúc 10

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự

152	Dime hu 4-1BBL (80-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	GATCCTGCCGGCCTGCTGGATCTGCGGCAGGG AATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCT GCTGATCGATGGCCCCCTGAGCTGGTACAGCG ATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTG GTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTC TTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCA TCTGCAGCCCCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGC AGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGC CAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTT TCAAGGCAGACTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCA GAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCA GGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGC GCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCC GAGATTCCAGCCGGACTGCCCAGCCCTAGATCT GAAGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGAT CCGACCCAGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAG GGAATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTG CTGCTGATTGACGGACCTCTGTCCTGGTACTCC GACCCTGGCCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGG GGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAAC TGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGT TTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTG GGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGC ATCTGCAGCCTCTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAG CTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAG CCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGG TTCCAAGGACGGCTGCTGCATCTGAGCGCCGG ACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAG CCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACCCAG GGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACA

		CCTGAGATCCCCGCTGGCCTGCCTAGCCCAAGA
		AGTGAAGGGGGAGGCGGATCTGGCGGAGGGGG
		ATCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCC
		CCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCG
		GCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCGAGGACT
		ACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACA
		GCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC
		CCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCC
		TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCC
		TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC
		CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAA
		GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACA
		CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCA
		GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA
		CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
		GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
		CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
		GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
		AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
		CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
		GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
		GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA
		GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
		GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGC
		CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT
		GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
		CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
		CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
		CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC
		AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
		GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA

		GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
153	Monome hu 4-1BBL (80-254) –CL*	GATCCTGCCGGCCTGCTGGATCTGCGGCAGGG AATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCT GCTGATCGATGGCCCCCTGAGCTGGTACAGCG ATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTG GTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTC TTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCA TCTGCAGCCCCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGC AGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGC CAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTT TCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCA GAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCA GGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGC GCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCC GAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGC GAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATC TCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATCGGAAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

68	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
69	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
113	Dime hu 4-1BBL (80-254) – CH1* Chuỗi khóa Fc	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSEGGGGSGGGGSDPAGLLDLRQGMFAQL VAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED TKELVVAKAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	Monome hu 4-1BBL (80-254) –CL*	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL

		ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2
19	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 2

1.2 Tạo ra các cấu trúc dung hợp Fc của phối tử trime 4-1BB đã chia tách hướng đích FAP (28H1)

Các trình tự mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử TNF đã hướng đích được tách dòng thành vectơ plasmit mà điều khiển sự biểu hiện của cải biến cài xen từ gen khởi đầu MPSV và chứa trình tự polyA tổng hợp nằm ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, vectơ này chứa trình tự EBV OriP để duy trì episom của plasmit.

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử TNF đã hướng đích được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm đồng thời các tế bào HEK293-EBNA bằng các vectơ biểu hiện ở động vật có vú có sử dụng polyetylenimin. Các tế bào này được chuyển nhiễm bằng các vectơ biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:1:1:1 (ví dụ "vectơ phối tử dime-(CH1 hoặc CL)- chuỗi khóa":"vectơ dung hợp phối tử monome-(CL hoặc CH1)":"vectơ chuỗi nặng ổ Fab kháng FAP":"vectơ chuỗi nhẹ kháng FAP") đối với các cấu trúc 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10. Đối với cấu trúc hóa trị hai 5, thì tỷ lệ 1:1:1 ("vectơ chuỗi nặng ổ":"vectơ chuỗi nặng khóa":"vectơ chuỗi nhẹ kháng FAP") được sử dụng.

Để tạo ra trong các bình lắc dung tích 500mL, 300 triệu tế bào HEK293 EBNA được gieo mầm 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, các tế bào này được

ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 2100m/s^2, và phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20mL môi trường CD CHO đã được làm ấm trước. Các vectơ biểu hiện (200µg ADN tổng thể) được trộn trong 20mL môi trường CD CHO. Sau khi bổ sung 540µL PEI, dung dịch này được khuấy xoáy trong 15 giây và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc dung tích 500mL và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường khí CO_2 5%. Sau khi ủ, 160mL môi trường Excell đã bổ sung L-Glutamin 6mM, PEPSOY 5g/L và axit valproic 1,2mM được bổ sung vào và các tế bào này được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm thì bổ sung Feed 7 12% và Glucoza (nồng độ cuối cùng là 3g/L). Sau khi nuôi cấy trong 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt được thu gom bằng cách ly tâm trong 30-40 phút ở tốc độ 4000m/s^2. Dung dịch này được lọc vô trùng (thiết bị lọc kích cỡ 0,22µm), đã được bổ sung natri azit đến nồng độ cuối cùng bằng 0,01% (khối lượng/thể tích), và được giữ ở nhiệt độ 4°C.

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử TNF đã hướng đích được tinh chế từ các phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào bằng phương pháp sắc ký ái lực có sử dụng Protein A, tiếp theo là phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Đối với phương pháp sắc ký ái lực, phần dịch nổi trên bề mặt được nạp lên trên cột MabSelect Sure (CV = 5-15mL, nhựa từ GE Healthcare) được cân bằng với natri phosphat 20mM, dung dịch đệm natri xitrat 20mM (độ pH = 7,5). Protein không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa bằng ít nhất 6 thể tích cột của cùng một dung dịch đệm. Protein gắn kết được rửa giải bằng cách sử dụng gradien tuyến tính (20 CV) hoặc rửa giải bậc thang (8 CV) bằng natri xitrat 20mM, natri clorua 100mM, dung dịch đệm Glyxin 100mM (độ pH = 3,0). Đối với gradien tuyến tính, thêm 4 thể tích cột rửa giải bậc thang nữa được sử dụng.

Độ pH của các phân đoạn đã gom được được điều chỉnh bằng cách bổ sung 1/10 (thể tích/thể tích) natri phosphat 0,5M, độ pH = 8,0. Protein được cô trước khi tải lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) đã được cân bằng với Histidin 20mM, natri clorua 140mM, dung dịch Tween20 0,01% (thể tích/thể tích) có độ pH = 6,0.

Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 280nm, sử dụng hệ số hấp phụ mol được tính dựa trên trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử TNF đã hướng đích được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE trong điều kiện

có và không có chất khử (1,4-dithiotreitol 5mM) và nhuộm màu bằng Coomassie SimpleBlue™ SafeStain (Invitrogen USA) hoặc CE-SDS sử dụng Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer). Hàm lượng kết tụ của mẫu được phân tích bằng cách sử dụng cột loại trừ kích cỡ phân tích TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) đã được cân bằng trong K_2HPO_4 25mM, NaCl 125mM, L-Arginin Monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02 % (khối lượng/thể tích), dung dịch đệm vận hành độ pH = 6,7 ở nhiệt độ 25°C.

Bảng 12 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa 4-1BBL trime hướng đích FAP.

Bảng 12: Phân tích sinh hóa của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa 4-1BBL trime đích FAP (28H1

Cấu trúc	Hiệu suất [mg/l]	Monome [%] (SEC)
Cấu trúc 1.1	12,7	95
Cấu trúc 1.2	25,2	97
Cấu trúc 1.3	22	92
Cấu trúc 1.4	14,2	99
Cấu trúc 1.5	14	99
Cấu trúc 1.6	12	98
Cấu trúc 1.7	3,4	99
Cấu trúc 1.8	5,4	98
Cấu trúc 1.9	11,2	98
Cấu trúc 1.10	19,8	99

1.3 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích ở chuột

Tương tự với phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích ở người, phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa 4-1BBL trime hướng đích FAP ở chuột được tạo ra.

Phần mã hóa trình tự ADN của miền ngoài (axit amin 104-309) của phối tử 4-1BB chuột được tổng hợp theo trình tự Q3U1Z9-1 trong cơ sở dữ liệu Uniprot (SEQ ID NO:70). Đối với cấu trúc M.1, xystein ở những vị trí 137, 160 và 246 được đột biến

thành serin bằng các phương pháp PCR chuẩn, trong khi đối với cấu trúc M.2, xystein ở vị trí 160 được đột biến thành serin (C160S).

Phối tử chuột được lắp ráp như được mô tả đối với 4-1BBL người và như được mô tả trên Fig.3A và Fig.3B. Dime 4-1BBL, được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, được dung hợp với miền IgG1-CL chuột (Fig.3A) và monome 4-1BBL được dung hợp với miền IgG1-CH chuột (Fig.3B). Polypeptit mã hóa phối tử dime 4-1BB đã dung hợp với miền CL chuột được tái tạo dòng thuần trong khung với các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 chuột để tạo ra các cấu trúc như được mô tả trên Fig.3C.

Đối với các cấu trúc ở chuột, các đột biến Lys392Asp và Lys409Asp (DD) được đưa vào chuỗi nặng chứa 4-1BBL chuột và các đột biến Glu356Lys và Asp399Lys (KK) được đưa vào chuỗi nặng chứa Fab kháng FAP để thu được các phân tử không đối xứng (Gunasekaran K. et al, J Biol. Chem., 2010, Jun 18;285(25):19637-46).

Các đột biến Asp265Ala và Pro329Gly (DAPG) được đưa vào vùng hằng định của các chuỗi nặng để phá hủy sự gắn kết với các thụ thể Fc gama.

Bảng 13 thể hiện, một cách tương ứng, trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB chuột hướng đích FAP có cấu trúc M.1.

Bảng 13: Các trình tự của cấu trúc M.1 ở chuột hướng đích FAP

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
71	Dime 4-1BBL chuột (104-309, C137,160,246S) – CL chuỗi Fc DD	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCAC CACCAGCCCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACA ACGCCGACCAAGTGACCCCCGTGTCCCACATCG GCAGCCCCAATACCACACAGCAGGGCAGCCCT GTGTTCGCCAAGCTGCTGGCCAAGAACCAGGC CAGCCTGAGCAACACCACCCTGAACTGGCACA GCCAGGATGGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGC CAGGGCCTGAGATACGAAGAGGACAAGAAAGA ACTGGTGGTGGACAGCCCTGGCCTGTACTACGT GTTCCTGGAACTGAAGCTGAGCCCCACCTTCAC

		CAACACCGGCCACAAGGTGCAGGGCTGGGTGT
		CACTGGTGCTGCAGGCCAAACCCCAGGTGGAC
		GACTTCGACAACCTGGCCCTGACCGTGGAACTG
		TTCCCCAGCAGCATGGAAAACAAGCTGGTGGA
		TCGGAGCTGGTCCCAGCTTCTGCTGCTGAAGGC
		CGGACACAGACTGAGCGTGGGCCTGAGGGCTT
		ATCTGCACGGCGCCCAGGACGCCTACAGAGAC
		TGGGAGCTGAGCTACCCCAACACAACCAGCTT
		CGGCCTGTTCCTCGTGAAGCCCGACAACCCTTG
		GGAAGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGAT
		CTAGAACAGAGCCTCGGCCTGCCCTGACAATTA
		CCACATCCCCCAATCTGGGCACCCGGGAAAAC
		AATGCAGATCAAGTGACACCTGTGTCTCATATT
		GGCTCCCCAAACACTACCCAGCAGGGCTCCCCC
		GTGTTTGCTAAACTGCTGGCTAAAAATCAGGCC
		TCCCTGTCTAACACAACACTGAACTGGCACTCC
		CAGGACGGCGCTGGCAGCTCTTACCTGAGTCA
		GGGACTGCGCTATGAGGAAGATAAGAAAGAAC
		TGGTGGTGGATTCCCCCGGACTGTACTATGTGT
		TTCTGGAACTGAAACTGTCCCCTACCTTTACAA
		ATACCGGGCACAAAGTGCAGGGATGGGTGTCC
		CTGGTGCTGCAGGCTAAGCCTCAGGTGGACGAT
		TTTGATAATCTGGCTCTGACAGTGGAACTGTTT
		CCTAGCAGCATGGAAAACAAGCTGGTGGACAG
		AAGCTGGTCCCAGCTCCTGCTGCTGAAGGCCGG
		ACACAGACTGAGCGTGGGCCTGAGAGCCTATC
		TGCACGGCGCCCAGGACGCCTACAGAGACTGG
		GAGCTGAGCTACCCCAACACAACCAGCTTCGG
		CCTGTTCCTCGTGAAGCCCGACAACCCTTGGGA
		AGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGATCCA
		GAGCTGATGCTGCCCCTACCGTGTCCATCTTCC
		CACCCAGCAGCGAGCAGCTGACATCTGGGGGA

		GCTAGCGTCGTGTGCTTCCTGAACAACTTCTAC CCCAAGGACATCAACGTGAAGTGGAAGATCGA CGGCAGCGAGCGGCAGAACGGCGTGCTGAATA GCTGGACCGACCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCATGAGCAGCACCCTGACCCTGACCAA GGACGAGTACGAGCGGCACAACAGCTACACAT GCGAGGCCACCCACAAGACCAGCACCAGCCCC ATCGTGAAGTCCTTCAACCGGAACGAGTGCGTG CCCAGAGACTGCGGCTGCAAGCCTTGCATCTGC ACCGTGCCTGAGGTGTCCAGCGTGTTCATCTTC CCACCCAAGCCCAAGGACGTGCTGACCATCAC CCTGACACCCAAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG CCATCAGCAAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTC AGTTGGTTCGTGGACGACGTGGAAGTGCACAC CGCTCAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGATCA ACAGCACCTTCAGAAGCGTGTCCGAGCTGCCC ATCATGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGA ATTCAAGTGCAGAGTGAACAGCGCCGCCTTTGG CGCCCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGACCA AGGGCAGACCCAAGGCCCCCCAGGTGTACACA ATCCCCCCACCCAAAGAACAGATGGCCAAGGA CAAGGTGTCCCTGACCTGCATGATCACCAATTT CTTCCCAGAGGATATCACCGTGGAATGGCAGTG GAACGGCCAGCCCGCCGAGAACTACGACAACA CCCAGCCTATCATGGACACCGACGGCTCCTACT TCGTGTACAGCGACCTGAACGTGCAGAAGTCC AACTGGGAGGCCGGCAACACCTTCACCTGTAG CGTGCTGCACGAGGGCCTGCACAACCACCACA CCGAGAAGTCCCTGTCCCACAGCCCTGGCAAG
72	Monome 4-1BBL chuột	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCAC CACCAGCCCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACA

	(104-309, C137,160,246S) – CL	ACGCCGACCAAGTGACCCCCGTGTCCCACATCG GCAGCCCCAATACCACACAGCAGGGCAGCCCT GTGTTCGCCAAGCTGCTGGCCAAGAACCAGGC CAGCCTGAGCAACACCACCCTGAACTGGCACA GCCAGGATGGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGC CAGGGCCTGAGATACGAAGAGGACAAGAAAGA ACTGGTGGTGGACAGCCCTGGCCTGTACTACGT GTTCCTGGAACTGAAGCTGAGCCCCACCTTCAC CAACACCGGCCACAAGGTGCAGGGCTGGGTGT CACTGGTGCTGCAGGCCAAACCCCAGGTGGAC GACTTCGACAACCTGGCCCTGACCGTGGAACTG TTCCCCAGCAGCATGGAAAACAAGCTGGTGGA TCGGAGCTGGTCCCAGCTTCTGCTGCTGAAGGC CGGACACAGACTGAGCGTGGGCCTGAGGGCCT ATCTGCATGGCGCCCAGGACGCCTACAGAGAC TGGGAGCTGAGCTACCCCAACACAACCAGCTT CGGCCTGTTCCTCGTGAAGCCCGACAACCCTTG GGAAGGCGGCGGAGGCTCCGGAGGAGGCGGA AGCGCTAAGACCACCCCCCCCAGCGTGTACCCT CTGGCCCCTGGATCTGCCGCCCAGACCAACAGC ATGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGGCTAC TTCCCCGAGCCTGTGACCGTGACCTGGAACAGC GGCAGCCTGAGCAGCGGCGTGCACACCTTTCC AGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACACCCTGA GCAGCTCCGTGACCGTGCCTAGCAGCACCTGGC CCAGCCAGACAGTGACCTGCAACGTGGCCCAC CCTGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAAT CGTGCCCCGGGACTGC
73	Chuỗi nặng Fc KK kháng FAP (28H1)	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCT GGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTG CGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCTCCCACGC

		CATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAAAG
		GCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCG
		GCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGC
		CGGTTCACCATCTCCCGGGACAACTCCAAGAAC
		ACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCC
		GAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGG
		CTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGG
		GCACCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAAGACCA
		CCCCCCCTAGCGTGTACCCTCTGGCCCCTGGAT
		CTGCCGCCCAGACCAACAGCATGGTGACCCTG
		GGCTGCCTGGTGAAGGGCTACTTCCCCGAGCCT
		GTGACCGTGACCTGGAACAGCGGCAGCCTGAG
		CAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCA
		GAGCGACCTGTACACCCTGAGCAGCTCCGTGA
		CCGTGCCTAGCAGCACCTGGCCCAGCCAGACA
		GTGACCTGCAACGTGGCCCACCCTGCCAGCAG
		CACCAAGGTGGACAAGAAAATCGTGCCCCGGG
		ACTGCGGCTGCAAGCCCTGCATCTGCACCGTGC
		CCGAGGTGTCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCA
		AGCCCAAGGACGTGCTGACCATCACCCTGACC
		CCCAAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCATCAG
		CAAGGACGACCCCGAGGTGCAGTTCTCTTGGTT
		TGTGGACGACGTGGAGGTGCACACAGCCCAGA
		CAAAGCCCCGGGAGGAACAGATCAACAGCACC
		TTCAGAAGCGTGTCCGAGCTGCCCATCATGCAC
		CAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATTCAAGTG
		CAGAGTGAACAGCGCCGCCTTCGGCGCCCCCA
		TCGAGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCAGA
		CCCAAGGCCCCCCAGGTGTACACCATCCCCCCA
		CCCAAAAAACAGATGGCCAAGGACAAGGTGTC
		CCTGACCTGCATGATCACCAACTTTTTCCCCGA
		GGACATCACCGTGGAGTGGCAGTGGAATGGCC

		AGCCCGCCGAGAACTACAAGAACACCCAGCCC ATCATGAAGACCGACGGCAGCTACTTCGTGTAC AGCAAGCTGAACGTGCAGAAGTCCAACTGGGA GGCCGGCAACACCTTCACCTGTAGCGTGCTGCA CGAGGGCCTGCACAACCACCACACCGAGAAGT CCCTGAGCCACTCCCCCGGCAAG
74	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACCCTG TCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCC TGCAGAGCCTCCCAGTCCGTGTCCCGGTCCTAC CTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGC CCCTCGGCTGCTGATCATCGGCGCCTCTACCAG AGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTC TGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTC CCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTA CTGCCAGCAGGGCCAGGTCATCCCTCCCACCTT TGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTG CCGATGCTGCACCAACTGTATCGATTTTCCCAC CATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCT CAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCA AAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGC AGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTG GACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACA GCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGAC GAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGA GGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGT CAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT
75	Dime 4-1BBL chuột (104-309, C137,160,246S) – CL chuỗi Fc DD	RTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGSP NTTQQGSPVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDG AGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELK LSPTFTNTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLA LTVELFPSSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVG

		LRAYLHGAQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVKPD NPWEGGGGSGGGGSRTEPRPALTITTSPNLGTRE NNADQVTPVSHIGSPNTTQQGSPVFAKLLAKNQA SLSNTTLNWHSQDGAGSSYLSQGLRYEEDKKELV VDSPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVQGWVSLVL QAKPQVDDFDNLALTVELFPSSMENKLVDRSWS QLLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSY PNTTSFGLFLVKPDNPWEGGGGSGGGGSRADAA PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVK WKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNECV PRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTP KVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTK PREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNS AAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAK DKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNT QPIMDTDGSYFVYSDLNVQKSNWEAGNTFTCSV LHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
76	Monome 4-1BBL chuột (104-309, C137,160,246S) –CL	RTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGSP NTTQQGSPVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDG AGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELK LSPTFTNTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLA LTVELFPSSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVG LRAYLHGAQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVKPD NPWEGGGGSGGGGSAKTTPPSVYPLAPGSAAQT NSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF PAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHP ASSTKVDKKIVPRDC
77	Chuỗi Fc KK kháng FAP (28H1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAM SWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW

		LGNFDYWGQGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAA QTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV HTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIF PPKPKDVLTITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWF VDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQD WLNGKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAP QVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVE WQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLNV QKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG K
78	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLA WYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKV EIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNF YPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDST YSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVK SFNRNEC

Bảng 14 thể hiện, một cách tương ứng, trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB chuột (DP47) không được hướng đích Đối chứng M.1.

Bảng 14: Các trình tự của Đối chứng M.1 ở chuột không được hướng đích

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
71	Dime 4-1BBL chuột (104-309, C137,160,246S)	Xem Bảng 13

	– CL chuỗi Fc DD	
72	Monome 4-1BBL chuột (104-309, C137,160,246S) – CH1	Xem Bảng 13
154	Chuỗi FC KK DP47	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG TGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGC CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTG GTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA AAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAAGGA ACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCTAAGACCACC CCCCCTAGCGTGTACCCTCTGGCCCCTGGATCT GCCGCCCAGACCAACAGCATGGTGACCCTGGG CTGCCTGGTGAAGGGCTACTTCCCCGAGCCTGT GACCGTGACCTGGAACAGCGGCAGCCTGAGCA GCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGA GCGACCTGTACACCCTGAGCAGCTCCGTGACCG TGCCTAGCAGCACCTGGCCCAGCCAGACAGTG ACCTGCAACGTGGCCCACCCTGCCAGCAGCAC CAAGGTGGACAAGAAAATCGTGCCCCGGGACT GCGGCTGCAAGCCCTGCATCTGCACCGTGCCCG AGGTGTCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAAGC CCAAGGACGTGCTGACCATCACCCTGACCCCCA AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCATCAGCAAG

		GACGACCCCGAGGTGCAGTTCTCTTGGTTTGTG GACGACGTGGAGGTGCACACAGCCCAGACAAA GCCCCGGGAGGAACAGATCAACAGCACCTTCA GAAGCGTGTCCGAGCTGCCCATCATGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATTCAAGTGCAG AGTGAACAGCGCCGCCTTCGGCGCCCCCATCG AGAAAACCATCAGCAAGACCAAGGGCAGACCC AAGGCCCCCCAGGTGTACACCATCCCCCCACCC AAAAAACAGATGGCCAAGGACAAGGTGTCCCT GACCTGCATGATCACCAACTTTTTCCCCGAGGA CATCACCGTGGAGTGGCAGTGGAATGGCCAGC CCGCCGAGAACTACAAGAACACCCAGCCCATC ATGAAGACCGACGGCAGCTACTTCGTGTACAG CAAGCTGAACGTGCAGAAGTCCAACTGGGAGG CCGGCAACACCTTCACCTGTAGCGTGCTGCACG AGGGCCTGCACAACCACCACACCGAGAAGTCC CTGAGCCACTCCCCCGGCAAG
155	Chuỗi nhẹ DP47	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTG TCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCT TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTA CTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCA GGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATC AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTAT TACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTGACG TTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAACG TGCCGATGCTGCACCAACTGTATCGATTTTCCC ACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGC CTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCC CAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATG

		GCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGT TGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTA CAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGG ACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGT GAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATT GTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT
75	Dime 4-1BBL chuột (104-309, C137,160,246S) – CL chuỗi Fc DD	xem Bảng 13
76	Monome 4-1BBL chuột (104-309, C137,160,246S) – CH1	Xem Bảng 13
156	Chuỗi FC KK DP47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSG FDYWGQGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTN SMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPA SSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKP KDVLTITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDD VEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLN GKEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVY TIPPPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQW NGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLNVQKSN WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

157	Chuỗi nhẹ DP47	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQGTK VEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNN FYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDS TYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIV KSFNRNEC

Bảng 15 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB chuột hướng đích FAP có cấu trúc M.2.

Bảng 15: Các trình tự của Cấu trúc M.2 chuột hướng đích FAP

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
158	Dime 4-1BBL chuột (104-309, C160S) – CL chuỗi Fc DD	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCACCA CCAGCCCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACAACG CCGACCAAGTGACCCCCGTGTCCCACATCGGCTG CCCCAATACCACACAGCAGGGCAGCCCTGTGTTC GCCAAGCTGCTGGCCAAGAACCAGGCCAGCCTG AGCAACACCACCCTGAACTGGCACAGCCAGGAT GGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGCCAGGGCCTG AGATACGAAGAGGACAAGAAAGAACTGGTGGTG GACAGCCCTGGCCTGTACTACGTGTTCCTGGAAC TGAAGCTGAGCCCCACCTTCACCAACACCGGCCA CAAGGTGCAGGGCTGGGTGTCACTGGTGCTGCAG GCCAAACCCCAGGTGGACGACTTCGACAACCTGG CCCTGACCGTGGAACTGTTCCCCTGCAGCATGGA AAACAAGCTGGTGGATCGGAGCTGGTCCCAGCTT CTGCTGCTGAAGGCCGGACACAGACTGAGCGTGG GCCTGAGGGCTTATCTGCACGGCGCCCAGGACGC

		CTACAGAGACTGGGAGCTGAGCTACCCCAACACA
		ACCAGCTTCGGCCTGTTCCTCGTGAAGCCCGACA
		ACCCTTGGGAAGGCGGCGGAGGCTCCGGAGGAG
		GCGGATCTAGAACAGAGCCTCGGCCTGCCCTGAC
		AATTACCACATCCCCCAATCTGGGCACCCGGGAA
		AACAATGCAGATCAAGTGACACCTGTGTCTCATA
		TTGGGTGCCCCAACACTACCCAGCAGGGGTCCCC
		AGTGTTTGCTAAACTGCTGGCTAAAAATCAGGCC
		TCCCTGTCTAACACAACACTGAATTGGCATAGTC
		AGGACGGGGCTGGCAGCAGCTACCTGTCTCAGGG
		ACTGCGCTATGAGGAAGATAAGAAAGAACTGGT
		GGTGGATTCCCCCGGACTGTACTATGTGTTTCTGG
		AACTGAAACTGTCCCCTACCTTTACAAATACCGG
		GCACAAAGTGCAGGGATGGGTGTCCCTGGTGCTG
		CAGGCTAAGCCTCAGGTGGACGATTTTGATAATC
		TGGCTCTGACAGTGGAACTGTTTCCTTGCTCTATG
		GAAAACAAACTGGTGGACCGCTCTTGGAGCCAGT
		TGCTGCTGCTGAAAGCTGGCCACCGGCTGTCTGT
		GGGACTGAGAGCATACCTGCATGGGGCACAGGA
		TGCCTACCGGGATTGGGAACTGTCCTACCCTAAC
		ACTACTTCCTTCGGACTGTTCCTCGTGAAACCTGA
		TAATCCCTGGGAGGGCGGAGGCGGAAGTGGCGG
		AGGGGGATCCAGAGCTGATGCTGCCCCTACCGTG
		TCCATCTTCCCACCCAGCAGCGAGCAGCTGACAT
		CTGGGGGAGCTAGCGTCGTGTGCTTCCTGAACAA
		CTTCTACCCCAAGGACATCAACGTGAAGTGGAAG
		ATCGACGGCAGCGAGCGGCAGAACGGCGTGCTG
		AATAGCTGGACCGACCAGGACAGCAAGGACTCC
		ACCTACAGCATGAGCAGCACCCTGACCCTGACCA
		AGGACGAGTACGAGCGGCACAACAGCTACACAT
		GCGAGGCCACCCACAAGACCAGCACCAGCCCCA
		TCGTGAAGTCCTTCAACCGGAACGAGTGCGTGCC
		CAGAGACTGCGGCTGCAAGCCTTGCATCTGCACC

		GTGCCTGAGGTGTCCAGCGTGTTCATCTTCCCACC CAAGCCCAAGGACGTGCTGACCATCACCCTGACA CCCAAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCCATCAGCA AGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCAGTTGGTTCGT GGACGACGTGGAAGTGCACACCGCTCAGACCAA GCCCAGAGAGGAACAGATCAACAGCACCTTCAG AAGCGTGTCCGAGCTGCCCATCATGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAATTCAAGTGCAGAGTG AACAGCGCCGCCTTTGGCGCCCCTATCGAGAAAA CCATCTCCAAGACCAAGGGCAGACCCAAGGCCCC CCAGGTGTACACAATCCCCCCACCCAAAGAACAG ATGGCCAAGGACAAGGTGTCCCTGACCTGCATGA TCACCAATTTCTTCCCAGAGGATATCACCGTGGA ATGGCAGTGGAACGGCCAGCCCGCCGAGAACTA CGACAACACCCAGCCTATCATGGACACCGACGGC TCCTACTTCGTGTACAGCGACCTGAACGTGCAGA AGTCCAACTGGGAGGCCGGCAACACCTTCACCTG TAGCGTGCTGCACGAGGGCCTGCACAACCACCAC ACCGAGAAGTCCCTGTCCCACAGCCCTGGCAAG
159	Monome 4-1BBL (104-309, C160S) – CH1 ở chuột	AGAACCGAGCCCAGACCCGCCCTGACCATCACCA CCAGCCCTAACCTGGGCACCAGAGAGAACAACG CCGACCAAGTGACCCCCGTGTCCCACATCGGCTG CCCCAATACCACACAGCAGGGCAGCCCTGTGTTC GCCAAGCTGCTGGCCAAGAACCAGGCCAGCCTG AGCAACACCACCCTGAACTGGCACAGCCAGGAT GGCGCCGGAAGCAGCTATCTGAGCCAGGGCCTG AGATACGAAGAGGACAAGAAAGAACTGGTGGTG GACAGCCCTGGCCTGTACTACGTGTTCCTGGAAC TGAAGCTGAGCCCCACCTTCACCAACACCGGCCA CAAGGTGCAGGGCTGGGTGTCACTGGTGCTGCAG GCCAAACCCCAGGTGGACGACTTCGACAACCTGG CCCTGACCGTGGAACTGTTCCCCTGCAGCATGGA AAACAAGCTGGTGGATCGGAGCTGGTCCCAGCTT

		CTGCTGCTGAAGGCCGGACACAGACTGAGCGTGG GCCTGAGGGCTTATCTGCACGGCGCCCAGGACGC CTACAGAGACTGGGAGCTGAGCTACCCCAACACA ACCAGCTTCGGCCTGTTCCTCGTGAAGCCCGACA ACCCTTGGGAAGGCGGCGGAGGCTCCGGAGGAG GCGGAAGCGCTAAGACCACCCCCCCCAGCGTGTA CCCTCTGGCCCCTGGATCTGCCGCCCAGACCAAC AGCATGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGGCT ACTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGACCTGGAACAG CGGCAGCCTGAGCAGCGGCGTGCACACCTTTCCA GCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACACCCTGAGCA GCTCCGTGACCGTGCCTAGCAGCACCTGGCCCAG CCAGACAGTGACCTGCAACGTGGCCCACCCTGCC AGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATCGTGCCC CGGGACTGC
73	Chuỗi Fc KK kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 13
74	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 13
160	Dime 4-1BBL chuột (104-309, C160S) – CL chuỗi Fc DD	RTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNT TQQGSPVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDGAGSS YLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFT NTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFP CSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHG AQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVKPDNPWEGGGG SGGGGSRTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVS HIGCPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHS QDGAGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLE LKLSPTFTNTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNL ALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVG LRAYLHGAQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVKPDNP

		WEGGGGSGGGGSRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTD QDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKT STSPIVKSFNRNECVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFP PKPKDVLTITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVD DVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNG KEFKCRVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPP PKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPA ENYDNTQPIMDTDGSYFVYSDLNVQKSNWEAGNT FTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
161	Monome 4-1BBL (104-309, C160S) – CH1 ở chuột	RTEPRPALTITTSPNLGTRENNADQVTPVSHIGCPNT TQQGSPVFAKLLAKNQASLSNTTLNWHSQDGAGSS YLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFT NTGHKVQGWVSLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFP CSMENKLVDRSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHG AQDAYRDWELSYPNTTSFGLFLVKPDNPWEGGGG SGGGGSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLV KGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRD C
77	Chuỗi Fc KK kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 13
78	Chuỗi nhẹ kháng FAP (28H1)	Xem Bảng 13

Bảng 16 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB chuột không hướng đích DP47 có cấu trúc đối chứng M.2.

Bảng 16: Các trình tự của Đối chứng M.2 chuột hướng đích FAP

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
158	Dime mu 4-1BBL (104-309, C160S) – CL chuỗi Fc DD	Xem Bảng 15
159	Monome mu 4-1BBL (104-309, C160S) – CH1	Xem Bảng 15
154	Chuỗi FC KK DP47	Xem Bảng 14
155	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 14
160	Dime mu 4-1BBL (104-309, C160S) – CL chuỗi Fc DD	Xem Bảng 15
161	Monome mu 4-1BBL (104-309, C160S) – CH1	Xem Bảng 15
156	Chuỗi FC KK DP47	Xem Bảng 14
157	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 14

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB chuột được tạo ra và tinh chế như được mô tả trên đây đối với các cấu trúc 4-1BBL người.

Bảng 17 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime 4-1BBL chuột hướng đích hoặc không hướng đích FAP.

Bảng 17: Tóm tắt việc tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime 4-1BBL chuột hướng đích hoặc không hướng đích FAP

Cấu trúc	Hiệu suất [mg/l]	Monome [%] (SEC)

Cấu trúc M.1	2.6	95
Đối chứng M.2	2.3	96
Cấu trúc M.2	8.5	98
Đối chứng M.2	8.1	97

1.4 Tạo ra và tinh chế phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB người không được hướng đích (phân tử đối chứng)

Các phân tử đối chứng được tạo ra như được mô tả ở trên đối với các cấu trúc hướng đích FAP 1 và 2, chỉ có một khác biệt duy nhất là tác nhân liên kết kháng FAP (VH-VL) được thay thế bằng đối chứng dòng mầm, gọi là DP47, không gắn kết với kháng nguyên. Đối chứng này là phối tử trime 4-1BB người hóa trị một Fc (kih) không hướng đích (Đối chứng A, Fig.5A) và đối với Đối chứng B, cấu trúc này còn chứa phần lai chéo CH-CL có các gốc mang điện (Fig.5B). Vùng biến đổi của các trình tự ADN của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của tác nhân liên kết FAP được thay thế bằng các trình tự của đối chứng dòng mầm (DP47) và được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người.

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB không hướng đích được tạo ra như được mô tả ở trên đối với các cấu trúc hướng đích FAP. Các tế bào này được chuyển nhiễm bằng các vectơ biểu hiện tương ứng theo tỷ lệ 1:1:1:1 ("vectơ phối tử dime-CH1 hoặc CL*-chuỗi khóa":"vectơ dung hợp phối tử monome-CL hoặc CH1*":"vectơ DP47 Fab- chuỗi khóa":"vectơ chuỗi nhẹ DP47").

Bảng 18 thể hiện, một cách tương ứng, trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB không hướng đích DP47 Đối chứng A.

Bảng 18: Các trình tự của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime 4-1BB không hướng đích DP47 (trime 4-1BBL đã chia tách DP47) Đối chứng A

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự

66	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CH1 chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 2
67	Monome hu 4-1BBL (71-254) - CL	Xem Bảng 2
79	Chuỗi ổ Fc DP47	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG TGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGC CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTG GTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA AAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAAGGA ACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG

		TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT GCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
80	Chuỗi nhẹ DP47	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTG TCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCT TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTA CTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGG CTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCA GGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATC AGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTAT TACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTGACG TTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAACG TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC

		AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
14	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CH1 chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 2
15	Monome hu 4-1BBL (71-254) - CL	Xem Bảng 2
81	Chuỗi ổ Fc DP47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSG FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
82	Chuỗi nhẹ DP47	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG

		TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

Bảng 19 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB không hướng đích DP47 với phần lai chéo CH1-CL và các gốc mang điện trong nhánh chứa phối tử 4-1BB (Đối chứng B).

Bảng 19: Các trình tự của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime 4-1BB không hướng đích DP47 (trime 4-1BBL đã chia tách DP47) Đối chứng B

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
96	dime hu 4-1BBL (71-254) – CL* CHUOỖI khóa Fc	xem Bảng 3
97	Monome hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	xem Bảng 3
79	Chuỗi ổ Fc DP47	xem Bảng 18
80	Chuỗi nhẹ DP47	xem Bảng 18
98	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	xem Bảng 3
99	Monome hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	xem Bảng 3
81	Chuỗi ổ Fc DP47	xem Bảng 18
82	Chuỗi nhẹ DP47	xem Bảng 18

Bảng 20 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB không hướng đích DP47.

Bảng 20: Các đặc tính sản xuất của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa 4-1BB trime không hướng đích DP47 (phân tử đối chứng)

Cấu trúc	Monome [%] (SEC)	Hiệu suất [mg/l]	LC/MS (không phải màu đỏ)
Đối chứng A	97	3,7	Theo lý thuyết*: 179069,7 Da Theo thử nghiệm: 179116.2 Da * không có lysin tận cùng
Đối chứng B	99	15,4	

Ví dụ 2

2.1 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (4B9)

Các mảnh khác nhau của phần mã hóa trình tự ADN của miền ngoài (axit amin 71-254 và 71-248) của phối tử 4-1BB người được tổng hợp theo trình tự P41273 trong cơ sở dữ liệu Uniprot (SEQ ID NO:42).

2.1.1 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-254) hướng đích FAP (4B9) hóa trị một với miền CH1-CL lai chéo có các gốc mang điện (Cấu trúc 2.1)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254), được tách bằng các tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng như được minh họa trên Fig.1A: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL người.

Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và dung hợp với miền IgG1-CH1 người, được tách dòng như được mô tả trên Fig.1B: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH người.

Polypeptit mã hóa phối tử dime 4-1BB đã dung hợp với miền CL người được tái tạo dòng thuần trong khung với các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên khóa (Merchant, Zhu et al. 1998) bằng cách sử dụng tác nhân liên kết (GSPGSSSSGS).

Để cải thiện khả năng bắt cặp đúng thì các đột biến dưới đây được đưa vào CH-CL lai chéo. Trong phối tử dime 4-1BB đã dung hợp với CL người, các đột biến E123R và Q124K được đưa vào. Trong phối tử monome 4-1BB đã dung hợp với CH1 người, các đột biến K147E và K213E được tách dòng vào miền CH1 người.

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu đối với protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), dòng vô tính 4B9, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người.

Việc tạo ra và điều chế tác nhân liên kết FAP được mô tả trong WO 2012/020006 A2, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Các đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với các thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831.

Đối với tất cả các cấu trúc, công nghệ heterodime hóa tra khóa vào ổ được sử dụng với các đột biến S354C/T366W trong chuỗi khóa và các đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V tương ứng trong chuỗi ổ.

Sự kết hợp giữa phối tử dime-chuỗi Fc khóa chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp CH1 monome, chuỗi ổ Fc kháng FAP được hướng đích chứa các đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng FAP cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử trime 4-1BB được lắp ráp và Fab gắn kết FAP (Fig.4, Cấu trúc 2.1).

Bảng 21 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử (71-254) 4-1BB người FAP (4B9) hóa trị một chứa phần lai chéo CH1-CL và các gốc mang điện (Cấu trúc 2.1).

Bảng 21: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB (71-254) ở người hướng đích FAP(4B9) hóa trị một cấu trúc 2.1

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
129	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CL* Chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3
130	Monome hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
162	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACT GGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTG CGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGC CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTG GCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGC GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGG ACAGGGCACCCTGGTCACAGTGTCCAGCGCTA GCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCC GCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGC CCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGT GCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAG CGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC

		CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAG CCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATG AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGC GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA
163	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACCCTG TCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCC TGCAGAGCCTCCCAGTCCGTGACCTCCTCCTAC CTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGC CCCTCGGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCGGA GAGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCT CTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCT CCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACT

		ACTGCCAGCAGGGCATCATGCTGCCCCCCACCT TTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGT ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCC TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
115	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3
116	Monome hu 4-1BBL (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
164	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW FGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF

		YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
125	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

2.1.2 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-254) hướng đích FAP (4B9) hóa trị một với cmiền CH1-CL lai chéo không có các gốc mang điện (Cấu trúc 2.2)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254), được tách bằng các tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng như được minh họa trên Fig.1A: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL người.

Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và dung hợp với miền IgG1-CH1 người, được tách dòng như được mô tả trên Fig.1B: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH1 người.

Polypeptit mã hóa phối tử dime 4-1BB đã dung hợp với miền CL người được tái tạo dòng thuần trong khung với các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên khóa (Merchant, Zhu et al. 1998) bằng cách sử dụng tác nhân liên kết (GSPGSSSSGS).

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu đối với protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), dòng vô tính 4B9, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người.

Các đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với các thụ thể Fc gama (WO 2012/130831).

Sự kết hợp của phối tử dime-chuỗi Fc khóa chứa các đột biến S354C/T366W, thể dung hợp monome CH1, chuỗi ổ Fc kháng FAP được hướng đích chứa các đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng FAP cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử trime 4-1BB được lắp ráp và Fab gắn kết FAP (Fig.4, Cấu trúc 2.2).

Bảng 22 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử (71-254) 4-1BB người FAP (4B9) hóa trị một chứa phần lai chéo CH1-CL không có các gốc mang điện (Cấu trúc 2.2).

Bảng 22: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB (71-254) ở người hướng đích FAP(4B9) hóa trị một Cấu trúc 2.2

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
165	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CL chuỗi khóa Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA GGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAG AGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAG CCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTC GCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATT GACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGG GCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTC CTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGG CTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGC TGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGC TCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAG

		CCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTG
		GCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGC
		GAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGG
		ACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCT
		GGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCC
		GGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACT
		GTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATC
		CCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGG
		GGGCGGAGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTA
		CGGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCC
		ATCCGATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCT
		CCGTCGTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTA
		GGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAAC
		GCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTG
		ACAGAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTC
		CCTGTCCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCTGA
		TTATGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG
		TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA
		AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACC
		CACACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCT
		GCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCA
		AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGAC
		CCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTC
		CCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT
		ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAG
		ACCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
		GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
		CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
		GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCC
		ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
		GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
		CATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC

		AGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
166	Monome hu 4-1BBL (71-254) – CH1	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT GGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTC CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGAC TGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCC AGGCACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTAC AGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGAT TCCTGCCGGCCTGCCTAGCCCTAGATCTGAAGG CGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTA GCACCAAAGGCCCTTCCGTGTTTCCTCTGGCTC CTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAGGCACCGCTG CTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATTTTCCTG AGCCTGTGACAGTGTCCTGGAATAGCGGAGCA CTGACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCCGCTGTG

		CTGCAGTCCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGC GTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAA CCCAAGTCTTGT
162	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)	xem Bảng 21
163	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	xem Bảng 21
117	Dime hu 4-1BBL (71-254) – CL chuỗi khóa Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPD DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAAL ALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAG LPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC

		LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
118	Monome hu 4-1BBL (71-254) – CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
164	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)	xem Bảng 21
125	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	xem Bảng 21

2.1.3 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-254) hướng đích FAP (4B9) hóa trị hai với các phối tử dime và monome 4-1BB được dung hợp ở đầu tận C của mỗi chuỗi nặng (Cấu trúc 2.3)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254), được tách bằng các tác nhân liên kết $(G4S)_2$ đã được dung hợp với đầu tận C của chuỗi ổ Fc IgG1 ở người, như được mô tả trên Fig.1C: ổ Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người. Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và dung hợp với đầu tận C của chuỗi khóa Fc IgG1 ở người như được mô tả trên Fig.1D: khóa Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người.

Polypeptit mã hóa phối tử dime 4-1BB được tái tạo dòng thuần trong khung ở đầu tận C của các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên ổ (Merchant, Zhu et

al. 1998) bằng cách sử dụng tác nhân liên kết $(G4S)_2$. Polypeptit mã hóa phối tử monome 4-1BB được tái tạo dòng thuần trong khung ở đầu tận C của các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên khóa (Merchant, Zhu et al. 1998) bằng cách sử dụng tác nhân liên kết $(G4S)_2$.

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu đối với protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), dòng vô tính 4B9, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ, khóa hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người.

Các đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với các thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831.

Sự kết hợp giữa phối tử dime ổ huIgG1 kháng FAP chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V, phối tử monome khóa huIgG1 kháng FAP chứa đột biến S354C/T366W và chuỗi nhẹ kháng FAP cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử trime 4-1BB được lắp ráp và hai Fab gắn kết với FAP (Fig.4, Cấu trúc 2.3)

Bảng 23 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (4B9) hóa trị hai có cấu trúc 2.3 (trime đã chia tách FAP bằng 2 Fab kháng FAP, phối tử dime và monome 4-1BB được dung hợp ở đầu tận C của mỗi chuỗi nặng, một cách tương ứng).

Bảng 23: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB (71-254) ở người hướng đích FAP(4B9) hóa trị hai có cấu trúc 2.3

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
167	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-254)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACT GGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTG CGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGC CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTG GCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAA

		GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGC
		GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC
		AAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGG
		ACAGGGCACCCTGGTCACAGTGTCCAGCGCTA
		GCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCC
		CCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCC
		GCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC
		GAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGC
		CCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGT
		GCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAG
		CGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCAC
		CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC
		CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAG
		CCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCC
		ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC
		CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG
		ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
		CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
		CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
		GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
		GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
		TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
		TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
		AACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC
		CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
		CACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATG
		AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGC
		GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
		GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
		CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
		CGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCAC
		CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG

		TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGA GGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGA TGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGG CATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCT GCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGA TCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGG CCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGG TGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCT TTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGC GAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCAT CTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCA GCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCC AGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCA GAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCA GGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGC GCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCC GAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGC GAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATC TAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATC CAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATG TTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTG ATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCA GGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACT GTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGG TGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTC AGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAG GGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTG CAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCA CTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCT

		AGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCA AGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGC GCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGA GCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGC AACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGA GATCCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAG AA
168	Chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-254)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACT GGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTG CGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGC CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTG GCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGC GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGG ACAGGGCACCCTGGTCACAGTGTCCAGCGCTA GCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGC CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACC GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC

		ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
		CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
		GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
		GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
		TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
		TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
		AACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC
		CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
		CACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATG
		AGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTC
		TGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCG
		TGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAAC
		AACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAG
		CGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGAC
		CGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACG
		TGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC
		ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG
		AGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAG
		GAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCC
		GATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAG
		GGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTG
		CTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGC
		GATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGC
		GGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACT
		GGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTT
		CTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCG
		GCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC
		ATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTG
		CAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTG
		CCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGG
		TTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGC
		CAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGC

		CAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGG GCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCC CCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAA GCGAA
163	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21
123	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW FGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN

		SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
124	Chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW FGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
125	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21

2.1.4 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) hướng đích FAP (4B9) hóa trị một với các CH1-CL lai chéo có các gốc mang điện (Cấu trúc 2.4)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248), được tách bằng các tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng như

được minh họa trên Fig.1A: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL người. Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248) và được dung hợp với miền IgG1-CH người, được tách dòng như được mô tả trên Fig.1B: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH người.

Polypeptit mã hóa phối tử dime 4-1BB đã dung hợp với miền CL người được tái tạo dòng thuần trong khung với các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên khóa (Merchant, Zhu et al. 1998) bằng cách sử dụng tác nhân liên kết (GSPGSSSSGS). Để cải thiện khả năng bắt cặp đúng, các đột biến sau được đưa vào CH-CL lai chéo. Trong phối tử dime 4-1BB được dung hợp với CL người là E123R và Q124K. Trong phối tử monome 4-1BB được dung hợp với CH1 ở người là K147E và K213E.

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu đối với protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), dòng vô tính 4B9, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người.

Các đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với các thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831.

Sự kết hợp giữa phối tử dime-chuỗi Fc khóa chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp monome CH1, chuỗi ổ Fc kháng FAP được hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng FAP cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử trime 4-1BB được lắp ráp và Fab gắn kết FAP (Fig.4, Cấu trúc 2.4).

Bảng 24 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB người (71-248) FAP (4B9) hóa trị một chứa phần lai chéo CH1-CL có các gốc mang điện (Cấu trúc 2.4).

Bảng 24: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB (71-248) ở người hướng đích FAP(4B9) hóa trị một có cấu trúc 2.4

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
169	Dime hu 4-1BBL (71-248) – CL* chuỗi khóa Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAG CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGACTGGGAGGCGGCGGATCTGG CGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGT CCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGA GACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAG AATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGG TACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTG ACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAA AGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACT ATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGG TGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGG CTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAG

		GGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGC
		CCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCT
		TCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCG
		CCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACT
		GAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGAC
		TCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGT
		GACACCTGAGATCCCCGCTGGACTGGGCGGAG
		GCGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTG
		GCTGCACCATCTGTCTTTATCTTCCCACCCAGC
		GACCGGAAGCTGAAGTCTGGCACAGCCAGCGT
		CGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGCGA
		GGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCC
		TGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACC
		GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCT
		GAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT
		ACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTG
		ACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAA
		GAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGACCC
		ACACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGCTG
		CTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAA
		AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC
		CCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCC
		CACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTA
		CGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGA
		CCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
		TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
		CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
		CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCAT
		CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
		CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT
		GCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC
		CTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC

		GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
170	Monome hu 4-1BBL (71-248) – CH1*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAG CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGACTGGGAGGCGGAGGTTCCGG AGGCGGAGGATCTGCTAGCACAAAGGGCCCCA GCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCA CATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTGGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTG CACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCC

		AGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGC
162	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21
163	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21
119	Dime hu 4-1BBL (71-248) – CL* chuỗi khóa Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGG GSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT

		VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
120 164	Monome hu 4-1BBL (71-248) – CH1* Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSC Xem Bảng 21
125	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21

2.1.5 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) hướng đích FAP (4B9) hóa trị một với các miền CH1-CL lai chéo không có gốc mang điện (Cấu trúc 2.5)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng như được minh họa trên Fig.1A: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL người. Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248) và được dung hợp với miền IgG1-CH người, được tách dòng như được mô tả trên Fig.1B: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH người.

Polypeptit mã hóa phối tử dime 4-1BB đã dung hợp với miền CL người được tái tạo dòng thuần trong khung với các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên khóa (Merchant, Zhu et al. 1998) bằng cách sử dụng tác nhân liên kết (GSPGSSSSGS).

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu đối với protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), dòng vô tính 4B9, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người.

Các đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với các thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831.

Sự kết hợp giữa phối tử dime-chuỗi Fc khóa chứa các đột biến S354C/T366W, thể dung hợp monome CH1, chuỗi ổ Fc kháng FAP được hướng đích chứa các đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng FAP cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử trime 4-1BB được lắp ráp và Fab gắn kết FAP (Fig.4, Cấu trúc 2.5)

Bảng 25 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB (71-248) ở người FAP (4B9) hóa trị một chứa phần lai chéo CH1-CL không có gốc mang điện (Cấu trúc 2.5).

Bảng 25: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB (71-248) ở người hướng đích FAP(4B9) hóa trị một có cấu trúc 2.5

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
171	Trình tự nucleotit dime hu 4-1BBL (71-248) – CL chuỗi khóa Fc	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA GCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAG CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG

		GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG
		CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC
		TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA
		CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG
		ATTCCAGCCGGACTGGGAGGCGGCGGATCTGG
		CGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGT
		CCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGA
		GACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAG
		AATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGG
		TACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTG
		ACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAA
		AGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACT
		ATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGG
		TGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGG
		CTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAG
		GGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGC
		CCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCT
		TCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCG
		CCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACT
		GAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGAC
		TCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGT
		GACACCTGAGATCCCCGCTGGACTGGGCGGAG
		GCGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTG
		GCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCCG
		ATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTC
		GTGTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCTAGGGAA
		GCTAAAGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCACT
		GCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACAG
		AACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTG
		TCCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCTGATTAT
		GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC
		CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA

		GCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCT GGCGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAG CCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCC CGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCA CGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGT GGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
172	Monome hu 4-1BBL (71-248) – CH1	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTT TGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGG ACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGA GCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTG GCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGG ATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCA

		GCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAG CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG ATTCCAGCCGGACTGGGAGGCGGAGGTTCCGG AGGCGGAGGATCTGCTAGCACCAAAGGCCCTT CCGTGTTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCA CCTCTGGAGGCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCG TGAAGGATTATTTTCCTGAGCCTGTGACAGTGT CCTGGAATAGCGGAGCACTGACCTCTGGAGTG CATACTTTCCCCGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGA CTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT
162	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21
163	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21
173	Dime hu 4-1BBL (71-248) – CL chuỗi khóa Fc	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLL

		DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGG GSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
174	Monome hu 4-1BBL (71-248) – CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAK AGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSC
164	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21

125	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21

2.1.6 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) hướng đích FAP (4B9) hóa trị hai với các phối tử dime và monome 4-1BB được dung hợp ở đầu tận C của mỗi chuỗi nặng (Cấu trúc 2.6)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$ được dung hợp với đầu tận C của chuỗi ổ Fc IgG1 người, như được mô tả trên Fig.1C: ổ Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người. Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248) và được dung hợp với đầu tận C của chuỗi khóa Fc IgG1 người như được mô tả trên Fig.1D: khóa Fc IgG1 ở người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người.

Polypeptit mã hóa phối tử dime 4-1BB được tái tạo dòng thuần trong khung ở đầu tận C của các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên ổ (Merchant, Zhu et al. 1998) bằng cách sử dụng tác nhân liên kết $(G4S)_2$. Polypeptit mã hóa phối tử monome 4-1BB được tái tạo dòng thuần trong khung ở đầu tận C của các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên khóa (Merchant, Zhu et al. 1998) bằng cách sử dụng tác nhân liên kết $(G4S)_2$.

Vùng biến đổi của các trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu đối với protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), dòng vô tính 4B9, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ, khóa hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người.

Các đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với các thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831.

Sự kết hợp giữa chuỗi ổ của phối tử dime huIgG1 kháng FAP chứa các đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V, chuỗi khóa của phối tử monome huIgG1 kháng FAP chứa các đột biến S354C/T366W và chuỗi nhẹ kháng FAP cho phép tạo ra heterodime,

bao gồm phối tử trime 4-1BB được lắp ráp và hai Fab gắn kết với FAP (Fig.4, Cấu trúc 2.6).

Bảng 26 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (4B9) hóa trị hai có cấu trúc 2.6 (trime đã chia tách FAP bằng 2 Fab kháng FAP, phối tử dime và monome 4-1BB được dung hợp ở đầu tận C của mỗi chuỗi nặng, một cách tương ứng).

Bảng 26: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB (71-248) ở người hướng đích FAP(4B9) hóa trị hai có cấu trúc 2.6

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
175	Trình tự nucleotit của chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-248)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACT GGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTG CGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGC CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTG GCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGC GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGG ACAGGGCACCCTGGTCACAGTGTCCAGCGCTA GCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCC GCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGC CCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGT GCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAG CGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAG CCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG

		GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
		TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
		TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
		AACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC
		CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
		CACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATG
		AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGC
		GCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
		GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
		CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
		CGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCAC
		CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG
		TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
		ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
		CTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGA
		GGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGA
		TGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGG
		CATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCT
		GCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGA
		TCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGG
		CCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGG
		TGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCT
		TTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGC
		GAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCAT
		CTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCA
		GCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCC
		AGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTT
		CAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCA
		GAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCA
		GGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGC
		GCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCC
		GAGATTCCAGCCGGCCTGGGCGGAGGCGGATC

		TGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAAC TGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATC TGAGACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTC AGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCT GGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCC CTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATAC AAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGT ACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGG TGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCC TGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTG CTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACC TGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGC GCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTG AGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCA TACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGC TGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTC GCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG
176	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-248)	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACT GGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTG CGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGC CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAGG GACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTG GCGCCAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGC GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCC AAGGGATGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGG ACAGGGCACCCTGGTCACAGTGTCCAGCGCTA GCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC

		GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGC
		CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT
		CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
		CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC
		CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
		CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
		CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA
		CCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACC
		GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA
		CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
		ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
		CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
		GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
		GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
		TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
		TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
		AACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC
		CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
		CACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATG
		AGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTC
		TGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCG
		TGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAAC
		AACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAG
		CGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGAC
		CGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACG
		TGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC
		ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG
		AGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAG
		GAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCC
		GATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAG
		GGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTG
		CTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGC

		GATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGC GGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACT GGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTT CTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCG GCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTG CAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTG CCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGG TTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGC CAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGC CAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGG GCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCC CCGAGATTCCAGCCGGCCTG
163	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21
126	Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW FGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS

		LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGS GGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKE LVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGL
127	Chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW FGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL

125	Chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)	Xem Bảng 21

2.2 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB người không hướng đích (phân tử đối chứng)

Các phân tử đối chứng khác được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 1.4 ở trên đối với Đối chứng A và Đối chứng B. Đối chứng C biến thể hóa trị hai từ Đối chứng A được tạo ra tương tự như các Cấu trúc 2.3 và 2.6 hóa trị hai và Đối chứng E biến thể hóa trị một được tạo ra tương tự như Cấu trúc 2.5 (chứa trime phối tử 4-1BB (71-248)), chỉ có một khác biệt duy nhất là tác nhân liên kết kháng FAP (VH-VL) được thay thế bằng đối chứng dòng mầm, được gọi là DP47, không gắn kết với kháng nguyên.

Bảng 27 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử dung hợp Fc (kih) (71-254) của phối tử trime 4-1BB đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị hai là Đối chứng C. Bảng 28 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử dung hợp Fc (kih) của phối từ trime 4-1BB (71-248) đã chia tách không hướng đích DP-47 hóa trị một là Đối chứng E.

Bảng 27: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB (71-254) ở người không hướng đích hóa trị hai-Đối chứng C

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
177	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc DP47 được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-254)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG TGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGC CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTG GTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA

		AAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAAGGA
		ACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAG
		GGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGC
		AAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGG
		CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT
		GACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCT
		CCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGA
		GTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCA
		CCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCT
		ACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC
		ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAG
		CTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC
		AGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT
		TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA
		TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
		TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
		AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
		GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
		AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
		CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
		AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
		CCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
		AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
		GCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA
		AGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA
		GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
		GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
		GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC
		CTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAA
		GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
		GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT
		ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTG

		GAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAG AGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTG CTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTG CTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCG ATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGAC TGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCT ACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCC AAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTG GAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATC TGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCC TCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGA GGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCA GGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGA CACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGT GCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCC AGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCG GAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAG GGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGG GCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGG ACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGC AGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAA AGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAG CTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAC TGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGA TCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTG CGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTG ACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCC AGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCT GCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAG

		TGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCAT GCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCC GGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
178	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc DP47 được dung hợp với monome hu 4-1BBL (71-254)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG TGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGC CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTG GTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA AAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAAGGA ACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC

		AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
		CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
		AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
		CCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
		AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
		ACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACC
		AAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAG
		GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG
		GAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAA
		GACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCA
		GCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACA
		AGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC
		TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA
		CTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCG
		GCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATC
		CAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATC
		CTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGT
		TTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGA
		TCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTG
		GACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTG
		AGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGT
		GGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCA
		GCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAG
		GATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGC
		AGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTC
		TGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCT
		CCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG
		GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG
		CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC
		TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTA
		CAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAG
		ATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA

80	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18
179	Chuỗi ổ Fc DP47 được dung hợp với dime hu 4-1BBL (71-254)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW FGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
180	Chuỗi khóa Fc DP47 được dung hợp với	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGW

	monome hu 4-1BBL (71-254)	FGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
82	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18

Bảng 28: Các trình tự của phân tử dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB (71-248) ở người không hướng đích hóa trị một-Đối chứng E

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
171	Dime hu 4-1BBL (71-248) – CL chuỗi khóa Fc	xem Bảng 25
172	Monome hu 4-1BBL (71-248) – CH1	xem Bảng 25
79	Chuỗi ổ Fc DP47	xem Bảng 18
80	Chuỗi nhẹ DP47	xem Bảng 18
173	Dime hu 4-1BBL (71-248) – CL chuỗi khóa Fc	xem Bảng 25
174	Monome hu 4-1BBL (71-248) – CH1	xem Bảng 25
81	Chuỗi ổ Fc DP47	xem Bảng 18
82	Chuỗi nhẹ DP47	xem Bảng 18

2.3 Tạo ra IgG1 người không được hướng đích làm Đối chứng F

Phân tử đối chứng bổ sung được sử dụng trong các thử nghiệm là DP47 không được hướng đích, đối chứng dòng mầm, IgG1 người, chứa các đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala để phá hủy sự gắn kết với các thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2012/130831).

Bảng 29 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của DP47 huIgG1 PGLALA không được hướng đích (Đối chứng F).

Bảng 29: Các trình tự của DP47 huIgG1 không được hướng đích (Đối chứng F)

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự

181	Trình tự nucleotit chuỗi nặng DP47 (hu IgG1 PGLALA)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG TGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGC CATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTG GTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAG AACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGA AAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAAGGA ACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT

		ACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
80	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18
182	Chuỗi nặng DP47 (hu IgG1 PGLALA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSG FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
82	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18

2.4 Sản xuất các cấu trúc dung hợp Fc của phối tử trime 4-1BB đã chia tách hướng đích FAP (4B9) hóa trị một và hóa trị hai và các phân tử đối chứng

Các trình tự mã hóa thể dung hợp Fc (kih) của phối tử trime 4-1BB đã chia tách hướng đích và không hướng đích được tách dòng thành vectơ plasmit mà điều khiển sự

biểu hiện của cải biến cài xen từ gen khởi đầu MPSV và chứa trình tự polyA tổng hợp nằm ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, vectơ này chứa trình tự EBV OriP để duy trì episom của plasmit.

Thể dung hợp Fc (kih) phối tử trime 4-1BB đã chia tách được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm đồng thời các tế bào HEK293-EBNA bằng các vectơ biểu hiện ở động vật có vú có sử dụng polyetylenimin. Các tế bào này được chuyển nhiễm bằng các vectơ biểu hiện tương ứng. Đối với các cấu trúc 2.1, 2.2., 2.4 và 2.5 và các phân tử đối chứng tương ứng thì tỷ lệ 1:1:1:1 (ví dụ "vectơ phối tử dime-CL-chuỗi khóa":"vectơ dung hợp phối tử monome-CH1":"vectơ Fab kháng FAP-chuỗi ổ":"vectơ chuỗi nhẹ kháng FAP") được sử dụng. Đối với các cấu trúc 2.3 và 2.6 và phân tử đối chứng của chúng, thì tỷ lệ 1:1:1 ("vectơ chuỗi ổ Fc phối tử dime huIgG1":"vectơ chuỗi khóa Fc phối tử monome huIgG1":"vectơ chuỗi nhẹ kháng FAP") được chọn. Các IgG người, được dùng làm đối chứng trong thử nghiệm, được tạo ra như đối với các cấu trúc hai đặc hiệu (để chuyển nhiễm, chỉ có vectơ cho chuỗi nhẹ và vectơ cho chuỗi nặng được sử dụng.

Để sản sinh trong các bình lắc dung tích 500mL, 300 triệu tế bào HEK293 EBNA được gieo mầm 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, các tế bào này được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 2100m/s^2, và phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20mL môi trường CD CHO đã được làm ấm trước. Các vectơ biểu hiện (200µg ADN tổng thể) được trộn trong 20mL môi trường CD CHO. Sau khi bổ sung 540µL PEI, dung dịch này được khuấy xoáy trong 15 giây và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc dung tích 500mL và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường khí CO_2 5%. Sau khi ủ, 160mL môi trường Excell đã bổ sung L-Glutamin 6mM, PEPSOY 5g/L và axit valproic 1,2mM được bổ sung vào và các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm thì bổ sung Feed 7 12% và Glucoza (nồng độ cuối cùng là 3g/L) vào. Sau khi nuôi cấy trong 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt được thu gom bằng cách ly tâm trong 30-40 phút ở tốc độ ít nhất là 4000m/s^2. Dung dịch này được lọc vô trùng (thiết bị lọc kích cỡ 0,22µm), đã bổ sung natri azit đến nồng độ cuối cùng bằng 0,01% (khối lượng/thể tích), và được giữ ở nhiệt độ 4°C.

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử TNF được hướng đích và không được hướng đích và IgG1 người được tinh chế từ các phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào bằng phương pháp sắc ký ái lực có sử dụng Protein A,

tiếp đó đến phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Đối với phương pháp sắc ký ái lực, phần dịch nổi trên bề mặt được nạp lên trên cột MabSelect Sure (CV = 5-15mL, nhựa từ GE Healthcare) đã cân bằng với dung dịch đệm Natri Phosphat (20mM), Natri xitrat (20mM) (độ pH = 7,5). Protein không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa bằng ít nhất 6 thể tích cột của cùng một dung dịch đệm. Protein gắn kết được rửa giải bằng cách sử dụng gradien tuyến tính (20 CV) hoặc rửa giải bậc thang (8 CV) bằng natri xitrat 20mM, natri clorua 100mM, dung dịch đệm Glyxin 100mM (độ pH = 3,0). Đối với gradien tuyến tính, sử dụng thêm 4 thể tích cột rửa giải bậc thang nữa.

Độ pH của các phân đoạn đã thu gom được điều chỉnh bằng cách bổ sung 1/10 (thể tích/thể tích) natri phosphat 0,5M, độ pH= 8,0. Protein được cô trước khi tải lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) đã cân bằng với Histidin 20mM, natri clorua 140mM, dung dịch Tween20 0,01% (thể tích/thể tích) có độ pH = 6,0.

Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 280nm, sử dụng hệ số hấp phụ mol được tính dựa trên trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của thể dung hợp Fc (kih) phối tử trime 4-1BB đã hướng đích được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE trong điều kiện có và không chất khử (1,4-dithiotreitol 5mM) và nhuộm màu bằng Coomassie SimpleBlue™ SafeStain (Invitrogen USA) hoặc phương pháp CE-SDS sử dụng Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer). Hàm lượng kết tụ của mẫu được phân tích bằng cách sử dụng cột loại trừ kích cỡ phân tích TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) đã cân bằng trong K_2HPO_4 25mM, NaCl 125mM, L-Arginin Monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (khối lượng/thể tích), dung dịch đệm vận hành độ pH = 6,7 ở nhiệt độ 25°C.

Bảng 30 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích hoặc không hướng đích FAP (4B9) và các phân tử đối chứng.

Bảng 30 Phân tích sinh hóa phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích và không hướng đích FAP (4B9) và các phân tử đối chứng

Cấu trúc	Monome [%] (SEC)	Hiệu suất [mg/l]

Cấu trúc 2.1	95	15,8
Cấu trúc 2.3	97	11,5
Cấu trúc 2.4	97	14,1
Cấu trúc 2.5	100	16,5
Đối chứng C (hóa trị hai)	98	12,6
Đối chứng E (hóa trị một)	93	4,1
Đối chứng F (dòng mầm DP47 IgG1 PGLALA ở người	100	50

Ví dụ 3

Tạo ra, tinh chế và đặc trưng hóa 4-1BB

Các trình tự ADN mã hóa miền ngoài của 4-1BB người, 4-1BB chuột nhắt hoặc 4-1BB khỉ đuôi dài (Bảng 31) được tái tạo dòng thuần trong khung với các miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên khóa (Merchant et al., 1998). Vị trí phân cắt proteaza AcTEV được đưa vào giữa miền ngoài kháng nguyên và Fc của IgG1 người. Đuôi avi để biotinyl hóa trực tiếp được đưa vào đầu tận C của khóa Fc-kháng nguyên. Sự kết hợp giữa kháng nguyên-chuỗi khóa Fc chứa các đột biến S354C/T366W, với chuỗi ổ Fc chứa các đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V cho phép tạo ra heterodime bao gồm một bản sao của chuỗi chứa miền ngoài 4-1BB, do vậy, tạo ra dạng monome của kháng nguyên liên kết với Fc (Fig.5C). Bảng 32 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của các cấu trúc dung hợp kháng nguyên-Fc.

Bảng 31: Đánh số axit amin cho các miền ngoài kháng nguyên (ECD) và nguồn gốc của chúng

SEQ ID NO:	Cấu trúc	Nguồn gốc	ECD
83	ECD của 4-1BB người	Được tổng hợp theo Q07011	aa 24-186
84	ECD của 4-1BB khỉ đuôi dài	Được phân lập từ máu khỉ đuôi dài	aa 24-186
85	ECD của 4-1BB chuột	Được tổng hợp theo P20334	aa 24-187

Bảng 32: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của các phân tử dung hợp Fc(kih) của kháng nguyên monome

SEQ ID NO:	Kháng nguyên	Trình tự
86	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCA CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG AACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA

		GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
87	Trình tự nucleotit kháng nguyên 4-1BB người chuỗi khóa Fc	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGC ACCTTCTGCGACAACAACCGGAACCAGATCTG CAGCCCCTGCCCCCCCAACAGCTTCAGCTCTGC CGGCGGACAGCGGACCTGCGACATCTGCAGAC AGTGCAAGGGCGTGTTCAGAACCCGGAAAGAG TGCAGCAGCACCAGCAACGCCGAGTGCGACTG CACCCCCGGCTTCCATTGTCTGGGAGCCGGCTG CAGCATGTGCGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCC AGGAACTGACCAAGAAGGGCTGCAAGGACTGC TGCTTCGGCACCTTCAACGACCAGAAGCGGGG CATCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAGCCTGGA CGGCAAGAGCGTGCTGGTCAACGGCACCAAAG AACGGGACGTCGTGTGCGGCCCCAGCCCTGCT GATCTGTCTCCTGGGGCCAGCAGCGTGACCCCT CCTGCCCCTGCCAGAGAGCCTGGCCACTCTCCT CAGGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGC TCACCCAAATCTGCAGACAAAACTCACACATG CCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT

		GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTG GTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAACG ACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCAC GAG
88	Trình tự nucleotit kháng nguyên 4-1BB khỉ đuôi dài chuỗi khóa Fc	TTGCAGGATCTGTGTAGTAACTGCCCAGCTGGT ACATTCTGTGATAATAACAGGAGTCAGATTTGC AGTCCCTGTCCTCCAAATAGTTTCTCCAGCGCA GGTGGACAAAGGACCTGTGACATATGCAGGCA GTGTAAAGGTGTTTTCAAGACCAGGAAGGAGT GTTCCTCCACCAGCAATGCAGAGTGTGACTGCA TTTCAGGGTATCACTGCCTGGGGGCAGAGTGCA GCATGTGTGAACAGGATTGTAAACAAGGTCAA GAATTGACAAAAAAAGGTTGTAAAGACTGTTG CTTTGGGACATTTAATGACCAGAAACGTGGCAT CTGTCGCCCCTGGACAAACTGTTCTTTGGATGG AAAGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGAAGGAGA GGGACGTGGTCTGCGGACCATCTCCAGCCGAC CTCTCTCCAGGAGCATCCTCTGCGACCCCGCCT GCCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACTCTCCGCA GGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTC

		ACCCAAATCTGCAGACAAAACTCACACATGCC CACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAACGACA TCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
89	Kháng nguyên 4-1BB chuột chuỗi khóa Fc	GTGCAGAACAGCTGCGACAACTGCCAGCCCGG CACCTTCTGCCGGAAGTACAACCCCGTGTGCAA GAGCTGCCCCCCCAGCACCTTCAGCAGCATCGG CGGCCAGCCCAACTGCAACATCTGCAGAGTGT GCGCCGGCTACTTCCGGTTCAAGAAGTTCTGCA GCAGCACCCACAACGCCGAGTGCGAGTGCATC GAGGGCTTCCACTGCCTGGGCCCCCAGTGCACC AGATGCGAGAAGGACTGCAGACCCGGCCAGGA

		ACTGACCAAGCAGGGCTGTAAGACCTGCAGCC TGGGCACCTTCAACGACCAGAACGGGACCGGC GTGTGCCGGCCTTGGACCAATTGCAGCCTGGAC GGGAGAAGCGTGCTGAAAACCGGCACCACCGA GAAGGACGTCGTGTGCGGCCCTCCCGTGGTGTC CTTCAGCCCTAGCACCACCATCAGCGTGACCCC TGAAGGCGGCCCTGGCGGACACTCTCTGCAGG TCCTGGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCG GCTCACCCAAATCTGCAGACAAAACTCACACA TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCG GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGT GGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAACG ACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCAC GAG

90	Chuỗi ổ Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
91	Kháng nguyên 4-1BB người chuỗi khóa Fc	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGG QRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGF HCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTF NDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVC GPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQLYF QGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKS GGLNDIFEAQKIEWHE
92	Kháng nguyên 4-1BB khỉ đuôi dài chuỗi khóa Fc	LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGG QRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDCISGY HCLGAECSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTF NDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVC GPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQVDEQLYF QGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS

		RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKS GGLNDIFEAQKIEWHE
93	Kháng nguyên 4-1BB chuột chuỗi khóa Fc	VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQ PNCNICRVCAGYFRFKKFCSSTHNAECECIEGFHC LGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTFNDQ NGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKDVVCGP PVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLQVLVDEQLYFQ GGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSG GLNDIFEAQKIEWHE

Tất cả các trình tự mã hóa phân tử dung hợp 4-1BB-Fc được tách dòng thành vectơ plasmit mà điều khiển sự biểu hiện của cải biến cài xen từ gen khởi đầu MPSV và chứa trình tự tín hiệu polyA tổng hợp nằm đầu 3' của CDS. Ngoài ra, vectơ này chứa trình tự EBV OriP để duy trì episom của plasmit.

Để tạo ra phân tử dung hợp Fc/kháng nguyên monome được biotinyl hóa, các tế bào HEK293 EBNA huyền phù phát triển theo cấp số mũ được chuyển nhiễm đồng thời bằng ba vectơ mã hóa hai thành phần của protein dung hợp (chuỗi khóa và chuỗi ổ) cũng như BirA, một enzym cần cho phản ứng biotinyl hóa. Vectơ tương ứng được sử dụng theo tỷ lệ 2:1:0,05 ("kháng nguyên ECD-AcTEV-khóa Fc":"ổ Fc":"BirA").

Để sản xuất protein trong bình lắc dung tích 500ml, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được gieo mầm 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, các tế bào này được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100m/s^2, và phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng môi trường CD CHO đã được làm ấm trước. Các vectơ biểu hiện được tái tạo huyền phù trong 20mL môi trường CD CHO chứa 200µg ADN vectơ. Sau khi bổ sung

540µL polyetylenimin (PEI), dung dịch này được khuấy xoáy trong 15 giây và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc dung tích 500mL và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ với môi trường khí CO_2 5 %. Sau khi ủ, bổ sung 160mL môi trường F17 vào và các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Môi trường sản xuất này được bổ sung kifunensin 5µM. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, axit valproic 1mM và Feed 1 7% với các thành phần bổ sung được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sau 7 ngày nuôi cấy, các phần dịch nổi trên bề mặt tế bào được thu gom bằng cách quay các tế bào xuống trong 15 phút ở tốc độ 2100m/s^2. Dung dịch này được lọc vô trùng (thiết bị lọc kích cỡ 0,22µm), đã bổ sung natri azit đến nồng độ cuối cùng bằng 0,01% (khối lượng/thể tích), và được giữ ở nhiệt độ 4°C.

Các protein tiết ra được tinh chế từ các phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào bằng phương pháp sắc ký ái lực có sử dụng Protein A, tiếp đó là phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Đối với phương pháp sắc ký ái lực, phần dịch nổi trên bề mặt được nạp lên trên cột HiTrap ProteinA HP (CV = 5mL, GE Healthcare) đã cân bằng với 40mL natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM độ pH = 7,5. Protein không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa bằng ít nhất 10 thể tích cột của dung dịch đệm chứa natri phosphat 20mM, natri xitrat 20mM, natri clorua 0,5M (độ pH = 7,5). Protein gắn kết được rửa giải bằng cách sử dụng gradien độ pH tuyến tính của natri clorua (từ 0 đến 500mM) được tạo ra trên 20 thể tích cột của natri xitrat 20mM, Tween-20 0,01% (thể tích/thể tích), độ pH = 3,0. Cột này sau đó được rửa bằng 10 thể tích cột chứa natri xitrat 20mM, natri clorua 500mM, Tween-20 0,01% (thể tích/thể tích), độ pH = 3,0.

Độ pH của các phân đoạn đã thu gom được điều chỉnh bằng cách bổ sung 1/40 (thể tích/thể tích) chứa Tris 2M, độ pH = 8,0. Protein này được cô và được lọc trước khi tải lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) đã cân bằng với dung dịch MOPS 2mM, natri clorua 150mM, natri azit 0,02% (khối lượng/thể tích) ở độ pH = 7,4.

Để xác định ái lực đối với thụ thể ở người, miền ngoài của 4-1BB người cũng được tái tạo dòng thuần trong khung với đuôi avi (GLNDIFEAQKIEWHE) và đuôi hexahistidin.

Việc sản xuất protein được thực hiện như được mô tả ở trên đối với protein dung hợp Fc. Các protein tiết ra được tinh chế từ các phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế

bào bằng phương pháp sắc ký chelat hóa, tiếp đó là phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Bước sắc ký đầu tiên được thực hiện trên hộp NiNTA Superflow Cartridge (5ml, Qiagen) đã cân bằng trong natri phosphat 20mM, natri clorua 500nM, độ pH = 7,4. Tiến hành rửa giải bằng cách áp dụng gradien trên 12 thể tích cột từ 5% đến 45% dung dịch đệm rửa giải (natri phosphat 20mM, natri clorua 500nM, Imidazol 500mM, pH = 7,4). Protein này được cô và được lọc trước khi tải lên trên cột HiLoad Superdex 75 (GE Healthcare) đã cân bằng với dung dịch MOPS 2mM, natri clorua 150mM, natri azit 0,02% (khối lượng/thể tích) có độ pH = 7,4 (Bảng 33).

Bảng 33: Các trình tự của phân tử monome 4-1BB His ở người

SEQ ID NO:	Kháng nguyên	Trình tự
94	Trình tự nucleotit 4-1BB His ở người	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCA CCTTCTGCGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAG CCCCTGCCCCCCCAACAGCTTCAGCTCTGCCGGCG GACAGCGGACCTGCGACATCTGCAGACAGTGCAA GGGCGTGTTCAGAACCCGGAAAGAGTGCAGCAGC ACCAGCAACGCCGAGTGCGACTGCACCCCCGGCT TCCATTGTCTGGGAGCCGGCTGCAGCATGTGCGA GCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAACTGACCAA GAAGGGCTGCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTC AACGACCAGAAGCGGGGCATCTGCCGGCCCTGGA CCAACTGTAGCCTGGACGGCAAGAGCGTGCTGGT CAACGGCACCAAAGAACGGGACGTCGTGTGCGGC CCCAGCCCTGCTGATCTGTCTCCTGGGGCCAGCA GCGTGACCCCTCCTGCCCCTGCCAGAGAGCCTGG CCACTCTCCTCAGGTCGACGAACAGTTATATTTTC AGGGCGGCTCAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGC CCAGAAGATCGAGTGGCACGAGGCTCGAGCTCAC CACCATCACCATCAC
95	4-1BB His ở người	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQ RTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCL GAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQK RGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPAD LSPGASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSGLN DIFEAQKIEWHEARAHHHHHH

Ví dụ 4

Đặc trưng hóa sinh cho phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt

Sự gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP với 4-1BB tái tổ hợp được đánh giá bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance (SPR)). Tất cả các thử nghiệm SPR đều được tiến hành trên Biacore T100 ở nhiệt độ 25°C với HBS-EP làm dung dịch đệm vận hành (HEPES 0,01M độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%, Biacore, Freiburg/Đức).

Ái lực của tương tác giữa phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích hoặc không hướng đích FAP và 4-1BB tái tổ hợp (ở người, khỉ đuôi dài và chuột) được xác định như được mô tả dưới đây. Các số liệu này đã chứng tỏ rằng cả phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích cũng như phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB không hướng đích DP47 đều gắn kết với 4-1BB người và khỉ đuôi dài với ái lực tương đương nhưng không đáng kể đối với 4-1BB chuột nhắt.

Các phân tử dung hợp 4-1BB Fc(kih) tái tổ hợp được biotinyl hóa ở người, khỉ đuôi dài và chuột được ghép cặp trực tiếp trên chip SA bằng cách sử dụng chỉ dẫn ghép cặp chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). Mức bất động là khoảng 30RU. Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP, hoặc các đối chứng không hướng đích DP47, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,39 đến 200nM với tốc độ dòng chảy là 30µL/phút được cho đi qua tế bào chảy trong 120 giây. Sự phân ly được theo dõi trong 180 giây. Các chênh lệch chỉ số phản xạ khối được hiệu chuẩn bằng cách trừ đi phản ứng thu được trên tế bào chảy rỗng tham chiếu.

Để xác định ái lực, việc ghép cặp trực tiếp khoảng 7200 đơn vị cộng hưởng (RU) của kháng thể đặc hiệu kháng Fc người được thực hiện trên chip CM5 ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin tiêu chuẩn (GE Healthcare). Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích hoặc không hướng đích FAP, ở nồng độ 50nM được bắt giữ với tốc độ dòng chảy là 30µl/phút trong 60 giây trên tế bào chảy 2. Dãy pha loãng (1,95 đến 1000nM) của 4-1BB avi-His ở người được cho qua trên các tế bào chảy ở tốc độ 30µl/phút trong 180 giây để ghi pha gắn kết.

Pha phân ly được theo dõi trong 180 giây và được khởi động bằng cách chuyển từ dung dịch mẫu sang HBS-EP. Bề mặt chip được tái tạo sau từng chu kỳ bằng cách sử dụng phương pháp bơm kép Glyxin-HCl 10mM độ pH = 2,1 trong 60 giây. Các chênh lệch chỉ số phản khúc xạ khối được hiệu chuẩn bằng cách trừ đi phản ứng thu được trên tế bào chảy tham chiếu 1. Đối với sự tương tác giữa phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB và hu4-1BB avi His, các hằng số ái lực thu được từ các hằng số tốc độ bằng cách khớp theo tỷ lệ 1:1 với đường cong gắn kết Langmuir bằng cách sử dụng phầm mềm Biaeval (GE Healthcare).

Bảng 34: Khớp với các hằng số gắn kết Langmuir và hằng số ái lực theo tỷ lệ 1:1

Phối tử	Chất phân tích	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Trime 4-1BBL được chia tách FAP (Cấu trúc 1.1)	hu4-1BB	4,8E+04	2,6E-02	5,5E-07
Trime 4-1BBL được chia tách DP47 (Đối chứng A)	hu4-1BB	6,2E+04	3,3E-02	5,2E-07

Ví dụ 5

Đặc trưng hóa chức năng cho phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích

5.1. Khả năng gắn kết trên PMBC người chưa qua thí nghiệm so với PMBC người được hoạt hóa của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích FAP

Lớp đệm thu được từ trung tâm hiến máu Zürich. Để phân lập các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) sạch, lớp đệm này được pha loãng với cùng một thể tích DPBS (Gibco by Life Technologies, Cat. No. 14190 326). Ống ly tâm polypropylen dung tích 50mL (TPP, Cat.-No. 91050) được cấp 15mL Histopaque 1077 (SIGMA Life Science, Cat.-No. 10771, polysucroza và natri diatrizoat, được điều chỉnh đến mật độ bằng 1,077g/mL) và dung dịch lớp đệm đã pha loãng được đặt bên trên Histopaque 1077. Các

ống này được ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 4000m/s^2. Sau đó PBMC được gom từ bề mặt chung, được rửa ba lần bằng DPBS và được tạo lại huyền phù trong môi trường tế bào T bao gồm môi trường RPMI 1640 (Gibco by Life Technology, Cat. No. 42401-042) đã cấp huyết thanh bào thai bò 10% (FBS, Gibco by Life Technology, Cat. No. 16000-044, Lot 941273, được chiếu xạ gama, không có mycoplasma và được bất hoạt bằng nhiệt ở nhiệt độ 56°C trong 35 phút), GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích) (GIBCO by Life Technologies, Cat. No. 35050 038), natri pyruvat 1mM (SIGMA, Cat. No. S8636), axit amin không thiết yếu MEM 1% (thể tích/thể tích) (SIGMA, Cat.-No. M7145) và β-Mercaptoetanol 50µM (SIGMA, M3148).

PBMC được sử dụng trực tiếp sau khi phân lập hoặc được kích thích để cảm ứng sự biểu hiện của 4-1BB ở bề mặt tế bào của tế bào T và tế bào NK bằng cách nuôi cấy trong 4 ngày trong môi trường tế bào T đã bổ sung 200U/mL Proleukin (Novartis Pharma Schweiz AG, CHCLB-P-476-700-10340) và 2µg/mL PHA-L (SIGMA Cat.-No. L2769) trong đĩa nuôi cấy mô có 6 lỗ và sau đó 1 ngày trong đĩa nuôi cấy mô có 6 lỗ được phủ 10ug/mL CD3 kháng người (dòng vô tính OKT3, BioLegend, Cat.-No. 317315) và 2µg/mL CD28 kháng người (dòng vô tính CD28.2, BioLegend, Cat.-No.: 302928) trong môi trường tế bào T ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5%.

Để xác định sự gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime 4-1BBL với PBMC người, 0,1 x 10^6 PBMC chưa qua thí nghiệm hoặc PBMC đã được hoạt hóa được bổ sung vào từng lỗ của đĩa huyền phù tế bào đáy tròn có 96 lỗ (Greiner bio-one, cellstar, Cat. No. 650185). Các đĩa này được ly tâm trong 4 phút với tốc độ 4000m/s^2 và ở nhiệt độ 4°C. Phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ. Sau đó các tế bào được nhuộm trong DPBS 100µL/lỗ chứa bộ kit nhuộm tế bào LIVE/DEAD Fixable Blue Dead đã pha loãng theo tỷ lệ 1:1000, để kích thích UV (Life Technologies, Molecular Probes, L-23105) hoặc thuốc nhuộm Fixable Viability eF660 (eBioscience 65-0864-18) hoặc bộ kit nhuộm tế bào LIVE/DEAD Fixable Green Dead (Life Technologies, Molecular Probes, L-23101) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối. Nếu DAPI được sử dụng để nhuộm sống/chết LIVE/DEAD, bước nhuộm này được bỏ qua. Các tế bào được rửa một lần bằng 200µL dung dịch đệm FACS lạnh (DPBS được cung cấp FBS 2% (thể tích/thể tích), EDTA 5mM độ pH = 8 (Amresco, Cat. No. E177) và natri azit 7,5mM (Sigma-Aldrich S2002).

Tiếp theo, 50µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh 4°C chứa các nồng độ được chuẩn độ khác nhau của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime 4-1BBL được bổ sung vào và các tế bào được ủ trong 120 phút ở nhiệt độ 4°C, được rửa bốn lần bằng 200µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh 4°C và được tạo lại huyền phù. Các tế bào còn được nhuộm bằng 50µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh 4°C chứa 0,67µg/mL CD3-PerCP-Cy5.5 kháng người (dòng vô tính UCHT1, IgG1κ chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 300430) hoặc 0,16µL CD3-PE/Cy7 kháng người (dòng vô tính SP34-2, IgG1κ chuột nhắt, BD Pharmingen, Cat.-No. 557749, Lot 33324597), 0,67µg/mL CD45-AF488 kháng người (dòng vô tính HI30, IgG1κ chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 304017) hoặc 0,12µg/mL CD56-FITC kháng người (dòng vô tính NCAM16.2, IgG2bκ chuột nhắt, BD Pharmingen, Cat.-No. 345811) hoặc 1µL CD56-APC kháng người (dòng vô tính B159, IgG1κ chuột nhắt, BD Pharmingen, Cat.-No. 555518, Lot 3098894), 0,25µg/mL CD4-BV421 kháng người (dòng vô tính RPA-T4, IgG1κ chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 300532) hoặc 0,23µg/mL CD4-BV421 kháng người (dòng vô tính OKT4, IgG2bκ chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 317434), 0,25µL CD8a-APC kháng người (dòng vô tính RPA-T8, IgG1κ chuột nhắt, BD Pharmingen, Cat.-No. 555369) hoặc 0,67µL CD8a-APC/Cy7 kháng người (dòng vô tính RPA-T8, IgG1κ chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 301016) hoặc 0,83ng/mL CD8a-BV711 kháng người (dòng vô tính RPA-T8, IgG1κ chuột nhắt, BD Pharmingen, Cat.-No. 301044) và 5µg/mL mảnh F(ab`)2 của IgG dê đặc hiệu với mảnh Fcγ kháng IgG người tinh khiết ái lực được liên hợp PE (Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 109 116 098 hoặc 109 116 170). Các tế bào này được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS. Nếu các tế bào được nhuộm bằng thuốc nhuộm Fixable Viability, chúng được cố định bằng 50µL/lỗ DPBS chứa formaldehyt 1% (Sigma, HT501320-9.5L). Các tế bào được tạo lại huyền phù trong dung dịch đệm FACS và đạt kết quả vào ngày tiếp theo hoặc cùng ngày đó bằng cách sử dụng 5-laser LSR-Fortessa (BD Bioscience với phần mềm DIVA) hoặc 3-laser Miltenyi Quant Analyzer 10 (Mitenyi Biotec) và Flow Jo (FlowJo X 10.0.7). Nếu bước nhuộm DAPI được sử dụng để phát hiện các tế bào chết, chúng được tạo lại huyền phù trong 80µL/lỗ dung dịch đệm FACS chứa 0,2µg/mL DAPI (Santa Cruz Biotec, Cat. No. Sc-3598) và đạt kết quả vào cùng ngày đó bằng cách sử dụng 5-laser LSR-Fortessa (BD Bioscience với phần mềm DIVA).

Như được thể hiện trên Fig.6, cả phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích hoặc không hướng đích FAP đều không gắn kết với các tế bào T CD4+ nghỉ ở người và không cho thấy sự gắn kết phát hiện được với các tế bào T CD8+ nghỉ và tế bào NK nghỉ. Ngược lại, cả hai cấu trúc này đều gắn kết mạnh với tế bào NK, tế bào T CD8+ hoặc tế bào T CD4+ được hoạt hóa, mặc dù cấu trúc không hướng đích FAP cho thấy cường độ huỳnh quang đặc hiệu thấp hơn khoảng 10 lần khi so với tế bào NK và cường độ huỳnh quang đặc hiệu giảm 20 lần khi so với tế bào T CD8+.

Các hình vẽ Fig.7A và Fig.7B thể hiện khả năng gắn kết của các cấu trúc từ 1.1 đến 1.10 như được tạo ra trong Ví dụ 1 trên tế bào T CD3+ CD8+ người đã hoạt hóa biểu hiện 4-1BB và tế bào T CD3+ CD4+ người đã hoạt hóa biểu hiện 4-1BB, một cách tương ứng. Bảng 35 thể hiện các giá trị EC_{50} như được đo đối với các cấu trúc từ 1.1 đến 1.10.

Bảng 35: khả năng gắn kết trên tế bào T CD3+ CD8+ người đã hoạt hóa và tế bào T CD3+ CD4+ người đã hoạt hóa

Cấu trúc	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD8$^+$	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD4$^+$
Đối chứng B	0,11	16,21
1.1	0,43	4,99
1.2	0,18	20,79
1.3	0,07	2,82
1.4	0,19	0,34
1.5	0,17	2,67
1.6	0,19	0,95
1.7	0,26	16,47
1.8	0,14	2,77
1.9	0,18	12,92

1.10	0,12	0,3

Các hình vẽ Fig.8A và Fig.8B thể hiện khả năng gắn kết của các cấu trúc 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 và 2.6 như được tạo ra trong Ví dụ 2 trên CD4+ và CD8+ từ máu người sạch và trên tế bào T CD4+ và tế bào T CD8+ biểu hiện 4-1BB đã được hoạt hóa, một cách tương ứng. Các cổng được thiết lập trên tế bào T CD4+ CD3+ CD45+ hoặc tế bào T CD8+ CD3+ CD45+ còn sống và MFI của mảnh F(ab`)2 dê đặc hiệu với mảnh Fcγ kháng IgG người tinh khiết ái lực được liên hợp PE được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ đã được chuẩn độ của các biến thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách được hướng đích. Bảng 36 thể hiện các giá trị EC_{50} như được đo đối với các cấu trúc 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 và 2.6.

Bảng 36: khả năng gắn kết trên tế bào T CD4+ và tế bào T CD8+ biểu hiện 4-1BB đã hoạt hóa

Cấu trúc	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD8$^+$	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD4$^+$
Đối chứng B	0,36	0,42
Đối chứng C	0,39	0,41
Đối chứng E	0,57	0,76
2.1	0,21	0,24
2.3	0,44	0,3
2.4	0,3	0,38
2.5	0,35	0,68
2.6	0,33	0,24

5.2 Khả năng gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích FAP với các tế bào lá lách chuột nhắt đã hoạt hóa

Lá lách chuột nhắt được gom trong 3mL PBS và huyền phù một tế bào được tạo ra bằng cách sử dụng các ống MACS thoải (Miltenyi Biotec Cat.-No. 130-096-334) và thiết bị phân ly gentleMACS Octo (Miltenyi Biotec). Sau đó các tế bào lá lách này được lọc qua thiết bị tách lọc sơ bộ kích cỡ 30µm (Miltenyi Biotec Cat.-No. 130-041-407) và được ly tâm trong 7 phút ở tốc độ 3500m/s^2 và nhiệt độ 4°C. Phần dịch nổi trên bề mặt được hút ra và các tế bào được tạo lại huyền phù trong môi trường RPMI 1640 đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích), GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích), Natri-Pyruvat 1mM, axit amin không thiết yếu MEM 1% (thể tích/thể tích), β-Mercaptoetanol 50µM và Penixilin-Streptomyxin 10% (SIGMA, Cat.-No. P4333). 10^6 tế bào/mL được nuôi cấy trong 2 ngày trong đĩa nuôi cấy mô có 6 lỗ được phủ 10µg/mL IgG chuột đồng Armenian kháng CD3ε chuột nhắt (dòng vô tính 145-2C11, BioLegend, Cat.-No. 100331) và 2µg/mL IgG chuột đồng Syri kháng CD28 chuột nhắt (dòng vô tính 37.51, BioLegend, Cat.-No. 102102).

Các tế bào lá lách chuột nhắt đã được hoạt hóa được thu gom, được rửa trong DPBS, được đếm và 0,1 x 10^6 tế bào được chuyển vào từng lỗ của đĩa đáy chữ U 96 lỗ đã xử lý không nuôi cấy mô. Phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và các tế bào được nhuộm trong 100uL/lỗ DPBS chứa thuốc nhuộm Fixable Viability eF660 đã pha loãng theo tỷ lệ 1:5000 (Bioscience, Cat-No. 65-0864-18) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa bằng PBS và được nhuộm trong 50uL dung dịch đệm FACS chứa các nồng độ khác nhau của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (trime 4-1BBL đã chia tách FAP), phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB không hướng đích (trime 4-1BBL đã chia tách DP47) hoặc kháng thể đơn dòng IgG1 P329G LALA người kháng CD137 chuột nhắt (dòng vô tính Lob.12.3, BioXcell Catalog#: BE0169). Các tế bào được ủ trong 120 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào này được rửa bốn lần bằng dung dịch đệm FACS và được nhuộm trong 50µL/lỗ dung dịch đệm FACS chứa 10µg/mL IgG-Fc-Block chuột cống đã tinh chế kháng CD16/CD32 chuột nhắt (BD Pharmingen, Cat.-No. 553142 dòng vô tính 2.4G2), 5µg/mL IgG2bκ-FITC chuột cống kháng CD8b chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 126606, dòng vô tính YTS156.7.7), 0,67µg/mL IgG2bκ-APC-Cy7 chuột cống kháng CD3 chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 100222, dòng vô tính 17A2), 0,67µg/mL

IgG2bκ-PE-Cy7 chuột cống kháng CD4 chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 100422, dòng vô tính GK1.5), 2µg/mL IgG2aκ-PerCp-Cy5.5 chuột nhắt (C3H x BALB/c) kháng NK1.1 chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 108728, dòng vô tính PK136) và 10µg/mL mảnh F(ab`)2 đa dòng tinh khiết ái lực được liên hợp PE của dê kháng IgG người, đặc hiệu với mảnh Fcγ, phản ứng chéo tối thiểu với protein huyết thanh bò, chuột nhắt và thỏ (Jackson ImmunoResearch, Cat.-No. 109-116-170) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa hai lần bằng 200µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh. Các tế bào được cố định bằng 50µL/lỗ DPBS chứa formaldehyt 1%. Các tế bào được tạo lại huyền phù trong dung dịch đệm FACS và đạt kết quả vào ngày tiếp theo bằng cách sử dụng 5-laser LSR-Fortessa (BD Bioscience với phần mềm DIVA).

Như được thể hiện trên Fig.9, phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử hu4-1BB hướng đích FAP (trime hu4-1BBL đã chia tách FAP) và phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử hu4-1BB không hướng đích (trime hu4-1BBL đã chia tách DP47) không gắn kết với 4-1BB chuột nhắt. Do đó hoạt tính không thể được thử nghiệm trong chuột nhắt cạnh tranh miễn dịch. Đối với các nghiên cứu chế độ tác động *in vivo*, cần sử dụng các mô hình chuột nhắt được biến đổi giống như của người ở chuột nhắt không cạnh tranh miễn dịch hoặc mô hình thay thế chứa trime 4-1BBL chuột nhắt như được thể hiện trên Fig.3.

5.3 Khả năng gắn kết với tế bào khối u biểu hiện FAP

Đối với các thử nghiệm gắn kết trên tế bào biểu hiện FAP, dòng tế bào u hắc sắc tố ở người MV-3 (xem tài liệu Ruiter et al., Int. J. Cancer 1991, 48(1), 85-91), dòng tế bào WM-266-4 (ATTC CRL-1676) hoặc NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39 được sử dụng. Để tạo ra dòng tế bào WM-266-4 (ATTC CRL-1676) hoặc NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39, các tế bào NIH/3T3 được chuyển nhiễm bằng FAP người (NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39). Các tế bào này được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm tế bào NIH/3T3 nguyên bào sợi phôi chuột nhắt (ATCC CRL-1658) với plasmit biểu hiện pETR4921 mã hóa FAP người dưới gen khởi đầu CMV. Các tế bào được duy trì khi có mặt 1,5µg/mL puromyxin (InvivoGen, Cat.-No.: ant-pr-5). 0,1 x 10^6 tế bào khối u biểu hiện FAP được bổ sung vào từng lỗ của đĩa huyền phù tế bào đáy tròn có 96 lỗ (Greiner bio-one, cellstar, Cat.-No. 650185). Các tế bào này được rửa một lần bằng 200µL DPBS và các viên được tạo lại huyền phù. 100µL/lỗ dung dịch DPBS lạnh 4°C chứa thuốc nhuộm Fixable Viability eFluor 450 (eBioscience, Cat.-No. 65-0863-18) hoặc thuốc nhuộm

Fixable Viability eFluor 660 (eBioscience, Cat.-No. 65-0864-18) đã pha loãng theo tỷ lệ 1:5000 được bổ sung vào và các đĩa được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa một lần bằng 200µL dung dịch DPBS lạnh 4°C và được tạo lại huyền phù trong 50µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh 4°C (DPBS đã cấp FBS 2% (thể tích/thể tích), EDTA 5mM độ pH = 8 (Amresco, Cat.-No. E177) và natri azit 7,5mM (Sigma-Aldrich S2002) chứa các nồng độ khác nhau của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime 4-1BBL đã được chuẩn độ, sau đó ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C. Sau khi rửa bốn lần bằng 200µL/lỗ, các tế bào được nhuộm bằng 50µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh 4°C chứa 30µg/mL mảnh F(ab`)2 dê đặc hiệu mảnh Fcγ kháng IgG người tinh khiết ái lực được liên hợp FITC (Jackson ImmunoResearch, Cat.-No. 109-096-098) hoặc 5µg/mL mảnh F(ab`)2 dê đặc hiệu mảnh Fgγ kháng IgG người tinh khiết ái lực được liên hợp PE (Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 109-116-098 hoặc 109-116-170) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa hai lần bằng 200µL dung dịch đệm FACS 4°C và sau đó được tạo lại huyền phù trong 50µL/lỗ DPBS chứa formaldehyt 1%. Cùng ngày đó hoặc vào ngày tiếp theo, các tế bào được tạo lại huyền phù trong 100µL dung dịch đệm FACS và đạt kết quả bằng cách sử dụng 5-laser LSR-Fortessa (BD Bioscience với phần mềm DIVA) hoặc 3-laser Miltenyi Quant Analyzer 10 (Mitenyi Biotec) và Flow Jo (FlowJo X 10.0.7).

Như được thể hiện trên Fig.10, phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (trime 4-1BBL đã chia tách FAP) Cấu trúc 1.1, chứ không phải là cấu trúc chứa DP47-Fab không được hướng đích (trime 4-1BBL đã chia tách DP47) Đối chứng A, gắn kết hiệu quả với tế bào MV-3 (10A) hoặc các tế bào WM-266-4 (10B) u hắc sắc tố biểu hiện protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP) ở người.

Fig.11A thể hiện khả năng gắn kết của các cấu trúc từ 1.1 đến 1.10 như được tạo ra trong Ví dụ 1 với các tế bào MV-3 u hắc sắc tố ở người biểu hiện FAP người và Fig.11B thể hiện khả năng gắn kết của các cấu trúc 1.1., 1.2, 1.3 và 1,5 với tế bào nguyên bào sợi phôi chuột nhắt được chuyển nhiễm NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39 biểu hiện FAP người. Bảng 37 thể hiện các giá trị EC_{50} như được đo đối với các cấu trúc từ 1.1 đến 1.10.

Bảng 37: khả năng gắn kết với tế bào khối u biểu hiện FAP người

Cấu trúc	EC_{50} [nM] FAP^+ MV-3	EC_{50} [nM] NIH/3T3-hu FAP
1.1	4,14	12,2
1.2	5,36	9,35
1.3	-	14,97
1.4	5,13	-
1,5	0,53	10,06
1.6	8,16	-
1.7	4,09	-
1.8	2,79	-
1.9	4,22	-
1.10	4,31	-

Fig.12 thể hiện khả năng gắn kết của các cấu trúc Fc (kih) của phối tử trime 4-1BB người đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP (4B9) khác nhau với các tế bào MV-3 và các tế bào WM-266-4 (Fig.12B) u hắc sắc tố ở người biểu hiện FAP người (Fig.12A). Các cấu trúc 2.1, 2.3, 2.4, 2.5 và 2.6 được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 2 và các đối chứng được tạo ra như được mô tả trên đây. Các cổng được thiết lập trên tế bào khối u còn sống và MFI của mảnh F(ab`)2 dê đặc hiệu mảnh Fcγ kháng IgG người tinh khiết ái lực được liên hợp PE được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ đã được chuẩn độ của cấu trúc dung hợp Fc của phối tử 4-1Bb trime đã chia tách và hướng đích. Bảng 38 thể hiện các giá trị EC_{50} như được đo.

Bảng 38: khả năng gắn kết với tế bào khối u biểu hiện FAP người

Cấu trúc	EC_{50} [nM] FAP^+ MV-3	EC_{50} [nM] FAP^+ WM-266-4
2.1	1,66	0,99
2.3	0,53	0,42
2.4	0,83	0,59
2.5	1,66	1,2

5.4 Đặc trưng hóa chức năng cho phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích ở chuột

5.4.1 Khả năng gắn kết với các tế bào lá lách chuột nhắt đã được hoạt hóa

Lá lách chuột nhắt được gom trong 3mL PBS và huyền phù một tế bào được tạo ra bằng cách sử dụng ống MACS thoải (Miltenyi Biotec Cat.-No. 130-096-334) và thiết bị phân ly gentleMACS Octo (Miltenyi Biotec). Sau đó các tế bào lá lách được lọc qua thiết bị tách lọc sơ bộ kích cỡ 30µm (Miltenyi Biotec Cat.-No. 130-041-407) và được ly tâm trong 7 phút ở tốc độ 3500m/s^2 và nhiệt độ 4°C. Phần dịch nổi trên bề mặt được hút ra và các tế bào được tạo lại huyền phù trong môi trường RPMI 1640 đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích), GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích), Natri-Pyruvat 1mM, axit amin không thiết yếu MEM 1% (thể tích/thể tích), β-Mercaptoetanol 50µM.

Để gắn kết trên tế bào lá lách chuột nhắt sạch, các tế bào này được sử dụng trực tiếp. Để cảm ứng sự biểu hiện của 4-1BB chuột nhắt trên tế bào T, tế bào lá lách chuột nhắt được hoạt hóa như sau: 10^6 tế bào/mL được nuôi cấy trong 2 ngày trong đĩa nuôi cấy mô có 6 lỗ được phủ 10µg/mL IgG chuột đồng Armenian kháng CD3ε chuột nhắt (dòng vô tính 145-2C11, BioLegend, Cat.-No. 100331) và 2µg/mL IgG chuột đồng Syri kháng CD28 chuột nhắt (dòng vô tính 37.51, BioLegend, Cat.-No. 102102).

Các tế bào lá lách chuột nhắt sạch hoặc tế bào lá lách chuột nhắt đã được hoạt hóa được gom, được rửa trong DPBS (Gibco life technologies, Cat.-No. 14190-136), được đếm và 0,1 x 10^6 tế bào được chuyển vào từng lỗ của đĩa đáy chữ U 96 lỗ đã xử lý không nuôi cấy mô (Greiner bio-one, cell star, Cat.-No. 650185). Phần dịch nổi trên bề

mặt được loại bỏ và các tế bào được nhuộm trong 100uL/lỗ DPBS lạnh 4°C chứa bộ kit nhuộm tế bào LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead đã pha loãng theo tỷ lệ 1:1000 (Life Technologies, L34957) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa bằng DPBS lạnh và được nhuộm trong 50uL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh (DPBS đã cấp FBS 2% (thể tích/thể tích), EDTA 5mM độ pH = 8 (Amresco, Cat. No. E177) và natri azit 7,5mM (Sigma-Aldrich S2002)) chứa các nồng độ khác nhau của phân tử dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB chuột nhắt hoặc đối chứng isotyp IgG1κ chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 400153, dòng vô tính MOPC-21). Các tế bào được ủ trong 120 phút ở nhiệt độ 4°C, được rửa bốn lần bằng DPBS lạnh và được nhuộm trong 50µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh chứa 30µg/mL F(ab`)2 IgG dê đặc hiệu Fc gama kháng IgG chuột nhắt được liên hợp FITC (Jackson Immunoresearch, Cat.-No. 115-096-071) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó các tế bào được rửa hai lần bằng DPBS lạnh và được nhuộm bằng 50µL/lỗ dung dịch đệm FACS đã cấp 10µg/mL IgG-Fc-Block chuột cống đã tinh chế kháng CD16/CD32 chuột nhắt (BD Pharmingen, Cat.-No. 553142 dòng vô tính 2.4G2), 0,67µg/mL CD8a-APC-Cy7 kháng chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 100714, dòng vô tính 53-6.7), 0,67µg/mL CD3ε-PerCP-Cy5.5 kháng chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 100328, dòng vô tính 145-2C11), 0,67µg/mL IgG2bκ-PE-Cy7 chuột cống kháng CD4 chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 100422, dòng vô tính GK1.5) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa hai lần bằng 200µL/lỗ DPBS lạnh, được cố định bằng 50µL/lỗ DPBS chứa formaldehyt 1% và được tạo lại huyền phù trong dung dịch đệm FACS. Các tế bào thu được bằng cách sử dụng 3-laser MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotech) và Flow Jo v10.0.7 (FlowJo LLC). Các cổng được thiết lập trên các tế bào T CD3+ CD8+ hoặc CD3+ CD4+ và cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) của IgG F(ab`)2 dê đặc hiệu Fc gama kháng IgG chuột nhắt được liên hợp FITC được phân tích và chuẩn hóa bằng cách trừ đi MFI của đối chứng trống (không bổ sung phân tử dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB chuột nhắt). MFI được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ của phân tử dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB chuột nhắt đã được sử dụng nhằm thể hiện khả năng gắn kết với phân tử gắn kết tế bào 4-1BB chuột nhắt.

Như có thể quan sát trên Fig.13, cấu trúc 4-1BBL chuột M.1 và M.2 cũng như các phân tử đối chứng tương ứng Đối chứng M.1 và Đối chứng M.2 gắn kết với 4-1BB chuột nhắt với ái lực khá tương tự. Bảng 39 thể hiện các giá trị EC_{50} như được đo đối với các cấu trúc M.1 và M.2 và các phân tử đối chứng.

Bảng 39: khả năng gắn kết trên tế bào T CD4+ và tế bào T CD8+ biểu hiện 4-1BB đã hoạt hóa

Cấu trúc	EC_{50} [nM] $4\text{-}1BB^+CD8^+$	EC_{50} [nM] $4\text{-}1BB^+CD4^+$
Đối chứng M.1	0,95	0,74
M.1	0,87	0,52
Đối chứng M.2	0,78	0,6
M.2	0,54	0,42

5.4.2 Khả năng gắn kết trên tế bào khối u biểu hiện FAP

Đối với các thử nghiệm gắn kết trên tế bào biểu hiện FAP, dòng tế bào u hắc sắc tố ở người MV-3 (xem tài liệu Ruiter et al., Int. J. Cancer 1991, 48(1), 85-91) và WM-266-4 (ATTC CRL-1676) được sử dụng (dòng vô tính 28H1 đặc hiệu kháng FAP phản ứng chéo ở chuột nhắt/người). 0,1 x 10^6 tế bào khối u biểu hiện FAP được bổ sung vào từng lỗ của đĩa huyền phù tế bào đáy tròn có 96 lỗ (Greiner bio-one, cellstar, Cat.-No. 650185). Các tế bào được rửa một lần bằng 200µL DPBS lạnh và các viên được tạo lại huyền phù trong 100µL/lỗ dung dịch DPBS lạnh 4°C chứa bộ kit nhuộm tế bào LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead đã pha loãng theo tỷ lệ 1:1000 (Life Technologies, L34957) và được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa một lần bằng 200µL dung dịch đệm DPBS lạnh và được tạo lại huyền phù trong 50µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh (DPBS đã cấp FBS 2% (thể tích/thể tích), EDTA 5mM độ pH = 8 (Amresco, Cat. No. E177) và natri azit 7,5mM (Sigma-Aldrich S2002)) chứa phân tử dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB chuột với một loạt các nồng độ sau đó ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C. Sau khi rửa bốn lần bằng 200µL DPBS/lỗ, các tế bào được nhuộm bằng 50µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh 4°C chứa 30µg/mL IgG F(ab`)2 dê đặc hiệu Fc gama kháng IgG chuột nhắt được liên hợp FITC (Jackson Immunoresearch, Cat.-No. 115-096-071) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa hai lần bằng 200µL/lỗ dung dịch đệm DPBS lạnh, được cố định bằng 50µL/lỗ DPBS chứa formaldehyt 1% và được tạo lại huyền phù trong dung dịch đệm FACS. Các tế bào thu

được bằng cách sử dụng 3-laser MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotech) và Flow Jo v10.0.7 (FlowJo LLC). Các cổng được thiết lập trên tế bào sống và cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) của IgG F(ab`)2 dê đặc hiệu Fc gama kháng IgG chuột nhắt được liên hợp FITC được phân tích và chuẩn hóa bằng cách trừ đi MFI của đối chứng trống (không bổ sung phân tử dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB chuột nhắt). MFI được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ của phân tử dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB chuột đã được sử dụng nhằm thể hiện khả năng gắn kết với phân tử gắn kết tế bào 4-1BB chuột. Như mong đợi, cấu trúc 4-1BBL chuột M.1 và M.2 gắn kết với FAP với ái lực khá tương tự trong khi các phân tử đối chứng không gắn kết.

Fig.14 thể hiện khả năng gắn kết của cấu trúc Fc(kih) của phối tử trime 4-1BB chuột đã chia tách hướng đích hoặc không hướng đích FAP M.1 và M.2 với các tế bào MV-3 và các tế bào WM-266-4 (Fig.14B) u hắc sắc tố ở người biểu hiện FAP người (Fig.14A). Bảng 40 thể hiện các giá trị EC_{50} như được đo.

Bảng 40: Khả năng gắn kết với tế bào khối u biểu hiện FAP người

Cấu trúc	EC_{50} [nM] FAP^+ MV-3	EC_{50} [nM] FAP^+ WM-266-4
M.1	7,26	5,14
M.2	6,9	5,63

Ví dụ 6

Hoạt tính sinh học của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích

6.1. Sự hoạt hóa NF-κB trong tế bào HeLa biểu hiện 4-1BB người

Tạo ra tế bào HeLa biểu hiện 4-1BB người và NF-κB-luciferaza

Dòng tế bào caxinom cổ tử cung HeLa (ATCC CCL-2) được tải nạp bằng plasmit dựa vào vectơ biểu hiện pETR10829, mà chứa trình tự của 4-1BB người (Uniprot số tiếp cận Q07011) dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu CMV và gen kháng puromyxin. Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường DMEM được bổ sung FBS 10% (thể tích/thể tích), GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích) và 3µg/mL Puromyxin.

Các tế bào HeLa đã tải nạp 4-1BB được thử nghiệm về sự biểu hiện của 4-1BB bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy: $0,2x10^6$ tế bào sống được tạo lại huyền phù trong 100µL dung dịch đệm FACS chứa 0,1µg dòng vô tính 4B4-1 IgG1κ chuột nhắt kháng 4-1BB người liên hợp PerCP/Cy5.5 (BioLegend Cat.-No.309814) hoặc đối chứng isotyp của nó (dòng vô tính MOPC-21 của kháng thể đối chứng isotyp IgG1κ chuột nhắt liên hợp PerCP/Cy5.5, BioLegend Cat.-No.400150) và được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS, được tạo lại huyền phù trong 300µL dung dịch đệm FACS chứa 0,06µg DAPI (Santa Cruz Biotec, Cat. No. Sc-3598) và đạt kết quả bằng cách sử dụng 5-laser LSR-Fortessa (BD Bioscience, phần mềm DIVA). Các đợt pha loãng có giới hạn được thực hiện để tạo ra các dòng vô tính đơn lẻ như được mô tả: tế bào HeLa đã tải nạp 4-1BB người được tạo lại huyền phù trong môi trường đến mật độ bằng 10, 5 và 2,5 tế bào/mL và 200µL huyền phù tế bào được chuyển vào đĩa đáy tròn 96 lỗ đã được xử lý để nuôi cấy mô (6 đĩa/nồng độ tế bào, TPP Cat.-No. 92697). Các dòng vô tính đơn lẻ được thu gom, dàn ra và thử nghiệm về sự biểu hiện của 4-1BB như được mô tả ở trên. Dòng vô tính có mức biểu hiện 4-1BB cao nhất (dòng vô tính 5) được chọn để sau đó chuyển nhiễm với vectơ biểu hiện NF-κB-luciferaza 5495p Tranlucent HygB. Vectơ này mang lại cho các tế bào đã chuyển nhiễm cả tính kháng Hygromyxin B và khả năng biểu hiện luciferaza dưới sự kiểm soát của phần tử đáp ứng NF-kB (vectơ mạch chính Panomics, Cat.-No. LR0051 có tính kháng HyB được đưa vào). Các tế bào HeLa 4-1BB người dòng vô tính 5 được nuôi cấy đến mức hợp dòng 70%. 50µg (40µL) vectơ biểu hiện 5495p Tranlucent HygB (enzym giới hạn AseI và SalI) mạch thẳng được bổ sung vào Cu-vét vô trùng Gene Pulser/MicroPulser 0,4cm (Biorad, Cat.-No, 165-2081). $2,5x10^6$ tế bào HeLa 4-1BB người dòng vô tính 5 trong 400µL môi trường DMEM không có thành phần bổ sung được bổ sung vào và được trộn kỹ với dung dịch plasmit. Việc chuyển nhiễm các tế bào được thực hiện bằng cách sử dụng hệ Gene Pulser Xcell total (Biorad, Cat-No. 165-2660) với các cài đặt như sau: xung theo cấp số mũ, điện dung 500µF, điện áp 160V, điện trở ∞. Ngay sau khi xung, các tế bào đã chuyển nhiễm được chuyển vào bình nuôi cấy mô $75cm^2$ (TPP, Cat.-No. 90075) với 15mL môi trường DMEM ấm 37°C đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích) và GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích). Ngày tiếp theo, môi trường nuôi cấy chứa 3µg/mL Puromyxin và 200µg/mL Hygromyxin B (Roche, Cat.-No. 10843555001) được bổ sung

vào. Các tế bào sống sót được dàn ra và việc pha loãng giới hạn được thực hiện như được mô tả ở trên để tạo ra các dòng vô tính đơn lẻ.

Dòng vô tính được thử nghiệm về sự biểu hiện của 4-1BB như được mô tả ở trên và về hoạt tính NF-κB-Luciferaza như sau: các dòng vô tính được thu gom trong môi trường chọn lọc và được đếm bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào Vi-cell xr 2.03 (Beckman Coulter, Cat.-No. 731050). Các tế bào được thiết lập đến mật độ tế bào bằng $0,33x10^6$ tế bào/mL và 150µL huyền phù tế bào này được chuyển vào từng lỗ của đĩa nuôi cấy mô đáy phẳng màu trắng vô trùng có 96 lỗ có nắp (greiner bio-one, Cat.-No. 655083) và - để làm đối chứng – chuyển vào đĩa nuôi cấy mô đáy phẳng có 96 lỗ bình thường (TPP Cat.-No. 92096) để thử nghiệm khả năng sống sót và mật độ tế bào vào ngày tiếp theo. Các tế bào được ủ ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5% qua đêm. Vào ngày tiếp theo, 50µL môi trường chứa các nồng độ khác nhau của yếu tố hoại tử khối u người tái tổ hợp alpha (rhTNF-α, PeproTech, Cat.-No. 300-01A) được bổ sung vào từng lỗ của đĩa có 96 lỗ để thu được nồng độ cuối cùng của rhTNF-α là 100, 50, 25, 12,5, 6,25 và 0 ng/lỗ. Các tế bào được ủ trong 6 giờ ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5% và sau đó được rửa ba lần bằng 200µL/lỗ DPBS. Dung dịch đệm phân giải chất báo cáo (Promega, Cat-No: E3971) được bổ sung vào từng lỗ (40µL) và các đĩa được bảo quản qua đêm ở nhiệt độ -20°C. Ngày tiếp theo, các đĩa tế bào đã đông lạnh và dung dịch đệm phát hiện (hệ thử nghiệm Luciferaza 1000, Promega, Cat.-No. E4550) được rã đông xuống nhiệt độ trong phòng. 100uL dung dịch đệm phát hiện được bổ sung vào từng lỗ và đĩa được đo nhanh nhất có thể bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa SpectraMax M5/M5e và phần mềm SoftMax Pro (Molecular Devices). Các đơn vị ánh sáng phát ra đo được trong 500 ms/lỗ (URL) trên đối chứng (không bổ sung rhTNF-α) được chọn làm hoạt tính luciferaza. NF-κB-luc-4-1BB-HeLa dòng vô tính 26 biểu hiện hoạt tính luciferaza cao nhất và mức độ biểu hiện 4-1BB đáng kể và được chọn để sử dụng tiếp.

Hoạt hóa NF-κB trong tế bào HeLa biểu hiện 4-1BB người được nuôi cấy đồng thời với tế bào khối u biểu hiện FAP

Tế bào Hela 4-1BB người NF-κB-luciferaza được thu gom và được tạo lại huyền phù trong môi trường DMEM đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích) và GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích) đến nồng độ bằng $0,2 \times 10^6$ tế bào/mL. 100µL (2×10^4 tế bào) huyền phù tế bào này được chuyển vào từng lỗ của đĩa nuôi cấy mô đáy phẳng màu trắng vô trùng 96 lỗ có nắp (greiner bio-one, Cat. No. 655083) và đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C

và CO_2 5% qua đêm. Ngày tiếp theo, 50µL môi trường chứa nồng độ đã chuẩn độ của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (trime 4-1BBL đã chia tách FAP) hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB không hướng đích DP47 (trime 4-1BBL đã chia tách DP47) được bổ sung vào. Tế bào khối u biểu hiện FAP (MV3, WM-266-4 hoặc NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39) được tạo lại huyền phù trong môi trường DMEM đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích) và GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích) đến nồng độ bằng 2 x 10^6 tế bào/mL.

Huyền phù chứa tế bào khối u biểu hiện FAP (50µL, tỷ lệ cuối cùng 1:5) hoặc chỉ có môi trường được bổ sung vào từng lỗ và đĩa được ủ trong 6 giờ ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5%. Các tế bào được rửa hai lần bằng 200µL/lỗ DPBS. 40µL dung dịch đệm phân giải chất báo cáo mới được điều chế (Promega, Cat-No: E3971) được bổ sung vào từng lỗ và đĩa được bảo quản qua đêm ở nhiệt độ -20°C. Ngày tiếp theo, đĩa tế bào đã đông lạnh và dung dịch đệm phát hiện (Hệ thử nghiệm Luciferaza 1000, Promega, Cat. No. E4550) được rã đông ở nhiệt độ trong phòng. 100µL dung dịch đệm phát hiện được bổ sung vào từng lỗ và hoạt tính luciferaza được đo nhanh nhất có thể bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa SpectraMax M5/M5e và phần mềm SoftMax Pro (Molecular Devices) đếm lượng ánh sáng phát ra theo URL (đơn vị ánh sáng phát ra trong 0,5 giây/lỗ) hoặc thiết bị đọc đĩa đếm nhiều nhãn Victor3 1420 (Perkin Elmer) và phần mềm quản lý Perkin Elmer 2030 Manager đếm lượng ánh sáng phát ra dưới dạng số lượng trong mỗi giây (CPS) và được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm.

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (trime 4-1BBL đã chia tách FAP) khởi phát sự hoạt hóa của con đường truyền tín hiệu NFκB trong dòng tế bào báo cáo khi có mặt tế bào khối u biểu hiện FAP. Ngược lại, biến thể không được hướng đích của phân tử đó không khởi phát được tác động này ở nồng độ thử nghiệm bất kỳ (Fig.16). Hoạt tính này của 4-1BBL được hướng đích phụ thuộc chặt chẽ vào sự biểu hiện của FAP ở bề mặt tế bào của các tế bào khối u do không thể phát hiện ra sự hoạt hóa NF-kB nào khi nuôi cấy dòng tế bào báo cáo NF-kB với tế bào khối u âm tính với FAP ngay cả khi có mặt phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP. Các hoạt tính như được đo đối với các cấu trúc từ 1.1 đến 1.10 được thể hiện trên Fig.17 và số liệu như được đo đối với các cấu trúc 2.1, 2.4 và 2,5 được thể hiện trên Fig.18.

6.2. Hoạt hóa NFκB trong tế bào HEK T293 biểu hiện 4-1BB khỉ đuôi dài

Tạo ra tế bào HEK T293 biểu hiện 4-1BB và NFκB-luciferaza ở khỉ đuôi dài

Để sản xuất các hạt giống virut (VLP), thận phôi người (HEK) T293/17 (ATCC CRL-11268) được chuyển nhiễm bằng cách sử dụng chất phản ứng Lipofectamine® LTX với chất phản ứng PLUS™ (Life Technologies, Cat.-No. 15338100) bằng vectơ pETR14372 mã hóa cát-xét gen báo cáo NFκB-luciferaza-IRIS-GFP (NFκB-luc-GFP) theo phương pháp chuẩn của nhà sản xuất. 6 giờ sau đó tiến hành thay thế DMEM đã cấp môi trường FBS 10% và VLP được thu gom 4 ngày sau đó. Tế bào HEK 293T mới được tải nạp ở mức hợp dòng 70-80% với pETR14372-VLP đã tạo ra và 4μg/mL polybren. Các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ và bước trao đổi môi trường được thực hiện. Các tế bào HEK T293/17 đã tải nạp được thu gom và bước pha loãng giới hạn 1 tế bào/lỗ được thực hiện để sàng lọc các dòng vô tính đơn ổn định. Các dòng vô tính đơn lẻ này được kích thích bằng 25ng/mL TNF-α (PeproTech Inc. Cat.-No. 300-01A) trong môi trường và được sàng lọc tín hiệu GFP dương theo thời gian bằng cách sử dụng hệ hiển vi huỳnh quang phóng đại Incuyte (Essen Bioscience). Sau khi tế bào ghi tín hiệu GFP được thử nghiệm về hoạt tính luciferaza bằng cách sử dụng bộ kit Nano Glo Luciferaza (Promega, N1120) theo phương pháp của nhà sản xuất. Hoạt tính luciferaza được đo bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa đếm nhiều nhãn Victor3 1420 (Perkin Elmer) và phần mềm quản lý Perkin Elmer 2030 Manager. Lượng ánh sáng phát ra được đếm theo số lượng trong mỗi giây (CPS) trong 0,5 giây/lỗ. Dòng vô tính 61 thể hiện mức biểu hiện GFP và Luciferaza cao nhất sau khi hoạt hóa TNF-α và còn được sử dụng để tạo ra dòng tế bào báo cáo.

Như được mô tả ở trên, VLP mới được sản xuất bằng cách sử dụng vectơ pETR14879 mã hóa 4-1BB khỉ đuôi dài và tính kháng puromyxin và dòng tế bào HEK 293T NFκB-fluc-GFP dòng vô tính 61 được tải nạp ở mức hợp dòng 70-80% với pETR14879-VLP đã tạo ra và 4μg/mL polybren. Các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ và bước trao đổi môi trường được thực hiện. Bốn ngày sau khi tải nạp, các tế bào này được nhuộm bằng kháng thể 4-1BB khỉ đuôi dài phản ứng chéo kháng người được liên hợp PE (IgG1κ chuột nhắt, dòng vô tính MOPC-21, BioLegend, Cat.-No. 309804) trong DPBS chứa FBS 1%, được phân loại bằng FACS (ARIA, BD) và được gieo cấy với mật độ 5 tế bào/lỗ trong DMEM đã cấp môi trường FBS 10% chứa 1μg/mL Puromyxin (InvivoGen, Cat.-No. ant-pr). Các dòng vô tính đang phát triển được thử nghiệm như được mô tả đối với GFP và hoạt tính luciferaza sau khi kích thích TNF-α và để biểu hiện

4-1BB khỉ đuôi dài cao bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy. Dòng vô tính dương tính kép được chọn và được thử nghiệm về hoạt tính luficeraza khi có mặt cấu trúc 2.1 hướng đích FAP hóa trị một hoặc Đối chứng B và tế bào MV-3 biểu hiện FAP hoặc các tế bào WM-266-4 biểu hiện FAP. Tế bào biểu hiện HEK T293/17–NF-κB-luc-GFP-cy4-1BB dòng vô tính 61-13 được chọn để được sử dụng cho tất cả các thử nghiệm khác.

Sự hoạt hóa NFκB của tế bào báo cáo HEK T293/17 biểu hiện 4-1BB khỉ đuôi dài được nuôi cấy đồng thời với tế bào khối u biểu hiện FAP

Tế bào biểu hiện HEK T293/17-NFκB-luc-GFP-cy4-1BB dòng vô tính 61-13 được thu gom và được tạo lại huyền phù trong môi trường DMEM đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích) và GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích) đến nồng độ bằng 0,2 x 10^6 tế bào/mL. 100µL (2 x 10^4 tế bào) huyền phù tế bào này được chuyển vào từng lỗ của đĩa nuôi cấy mô đáy phẳng màu trắng vô trùng 96 lỗ có nắp (greiner bio-one, Cat. No. 655083) và đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5% qua đêm. Ngày tiếp theo, 50µL môi trường chứa các nồng độ đã chuẩn độ khác nhau của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích hoặc không hướng đích FAP được bổ sung vào. Tế bào khối u biểu hiện FAP (MV3 và WM-266-4) được tạo lại huyền phù trong môi trường đó đến nồng độ bằng 2 x 10^6 tế bào/mL. Huyền phù chứa tế bào khối u biểu hiện FAP (50µL) được bổ sung vào từng lỗ và đĩa được ủ trong 6 giờ ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5%. Nguyên tắc thử nghiệm được thể hiện trên Fig.19. Sau khi ủ, các tế bào được rửa ba lần bằng DPBS 200µL/lỗ. 40µL dung dịch đệm phân giải chất báo cáo mới được điều chế (Promega, Cat-No: E3971) được bổ sung vào từng lỗ và đĩa được bảo quản qua đêm ở nhiệt độ -20°C. Ngày tiếp theo, đĩa tế bào đã đông lạnh và dung dịch đệm phát hiện (Hệ thử nghiệm Luciferaza 1000, Promega, Cat. No. E4550) được rã đông xuống nhiệt độ trong phòng. 100µL dung dịch đệm phát hiện được bổ sung vào từng lỗ và hoạt tính luciferaza được đo nhanh nhất có thể bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa SpectraMax M5/M5e (Molecular Devices) (thời gian kết hợp 500 ms, không thiết bị lọc nào thu thập được tất cả các bước sóng). Lượng ánh sáng phát ra được đếm theo đơn vị ánh sáng phát ra (URL) trong 0,5 giây/lỗ và được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích hoặc không hướng đích FAP thử nghiệm. Các kết quả đối với các cấu trúc trong Ví dụ 2 được thể hiện trên Fig.20.

6.3 Thử nghiệm dựa trên tế bào T CD8+ đặc hiệu kháng nguyên

Phân lập và nuôi cấy tế bào T CD8 đặc hiệu kháng nguyên

Máu sạch thu được từ đối tượng tình nguyện nhiễm CMV HLA-A2+. PBMC được phân lập như được mô tả ở trên. Tế bào T CD8 được tinh chế từ PBMC bằng cách sử dụng bộ kit phân lập tế bào T CD8 người chọn lọc âm theo khuyến cáo của nhà sản xuất (Miltenyi Biotec, Cat. No. 130-094-156). Mười triệu tế bào T CD8 đã phân lập được tạo lại huyền phù trong 1mL DPBS vô trùng đã bổ sung FBS 1% (thể tích/thể tích) cùng với 50µL pentame HLA-A2 đánh dấu bằng PE chứa peptit NLVPMVATV thu được từ CMV (ProImmune, Cat. No. F008-2B) và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các tế bào được rửa hai lần bằng 3mL DPBS vô trùng đã cấp FBS 1% (thể tích/thể tích). Các tế bào được tạo lại huyền phù trong 1mL tế bào DPBS đã cấp FBS 1% (thể tích/thể tích) chứa 1µg/mL CD8-FITC kháng người (dòng vô tính LT8, Abcam, Cat. No. Ab28010) và được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa hai lần, được tạo lại huyền phù đến nồng độ bằng $5x10^6$ tế bào/mL trong DPBS đã cấp FBS 1% (thể tích/thể tích), và được lọc qua giá lọc tế bào lưới ni lông tách sơ bộ 30µm (Miltenyi Biotec, Cat. No. 130-041-407). Các tế bào T CD8+ đặc hiệu NLV-peptit được phân lập bằng cách phân loại FACS sử dụng thiết bị phân loại tế bào ARIA (BD Bioscience với phần mềm DIVA) với các cài đặt sau: vòi phun 100µm và mặt nạ phân loại độ tinh khiết. Các tế bào đã phân loại được gom trong ống ly tâm polypropylen dung tích 15ml (TPP, Cat. No. 91015) chứa 5ml môi trường RPMI 1640 đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích), GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích) và 400U/mL Proleukin. Các tế bào đã phân loại được ly tâm trong 7 phút ở tốc 3500m/s^2 ở nhiệt độ trong phòng và được tạo lại huyền phù trong cùng một môi trường đến nồng độ bằng 0,53 x 10^6 tế bào/mL. 100µL/lỗ huyền phù tế bào này được bổ sung vào từng lỗ của đĩa cấp liệu được chuẩn bị trước đó.

Tế bào cấp liệu dị sinh đã chiếu xạ và hoạt hóa PHA-L được tạo ra từ PBMC như được mô tả trước đó (Levitsky et al., 1998) và được phân bố vào đĩa nuôi cấy có 96 lỗ ở mật độ $2x10^5$ tế bào cấp liệu trong mỗi lỗ.

Sau một ngày nuôi cấy, 100µL môi trường/lỗ được loại bỏ khỏi lỗ chứa các tế bào T CD8+ đã phân loại và được thay thế bằng môi trường RPMI 1640 mới đã được bổ sung FBS 10% (thể tích/thể tích) và GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích) và 400U/mL Proleukin, bước này được lặp lại trong quá trình nuôi cấy trên cơ sở thường xuyên (mỗi

2-4 ngày). Ngay khi các tế bào bắt đầu tăng sinh, chúng được chuyển vào đĩa nuôi cấy mô đáy phẳng 24 lỗ (TPP, 92024). Các tế bào này được dàn ra/chia tách và được hoạt hóa lại bằng chế phẩm tế bào cấp liệu mới trên cơ sở thường xuyên.

Thử nghiệm hoạt hóa tế bào T CD8+ đặc hiệu kháng nguyên

Các tế bào MV3 được thu gom và được rửa bằng DPBS và 2 x 10^7 tế bào được tạo lại huyền phù trong 250µL chất pha loãng C của bộ kit liên kết tế bào huỳnh quang đỏ PKH-26 (Sigma, Cat.-No. PKH26GL). 1µL dung dịch nhuộm đỏ PKH26 được pha loãng với 250µL chất pha loãng C và được bổ sung vào huyền phù chứa tế bào MV3 sau đó được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Sau đó bổ sung 0,5mL FBS vào và các tế bào được ủ trong 1 phút và được rửa một lần bằng môi trường tế bào T bao gồm môi trường RPMI 1640 đã bổ sung FBS 10% (thể tích/thể tích), GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích), Natri-Pyruvat 1mM, axit amin không thiết yếu MEM 1% (thể tích/thể tích) và β-Mercaptoetanol 50µM. 1 x 10^6 tế bào MV3/mL được tạo lại huyền phù trong môi trường tế bào T và được tách vào ba ống. Peptit NLVPMVATV tổng hợp (thu được từ thinkpeptit) được bổ sung đến nồng độ cuối cùng bằng 1x10^{-9}M hoặc 1x10^{-8}M và các tế bào này được ủ trong 90 phút. Các tế bào MV3 được rửa một lần bằng môi trường tế bào T và được tạo lại huyền phù đến mật độ bằng 0,5 x 10^6 tế bào/mL, được phân bố (100µL/lỗ) vào đĩa huyền phù tế bào đáy tròn có 96 lỗ (Greiner bio-one, cellstar, Cat.-No. 650185) và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5%. Nguyên tắc thử nghiệm được thể hiện trên Fig.21.

Vào ngày tiếp theo, 50µL/lỗ môi trường tế bào T chứa các nồng độ đã chuẩn độ khác nhau của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB đã hướng đích được bổ sung vào. Các tế bào T CD8 đặc hiệu với NLV được thu gom, CFDA-SE (5(6)-Carboxyfloresxeindiaxetat-N-sucxinimidyleste, SIGMA-Aldrich, Cat.-No. 21888-25MG-F) được bổ sung vào đến nồng độ cuối cùng bằng 40nM và các tế bào được ủ trong điều kiện xoay trong 15 phút ở nhiệt độ 37°C. Việc đánh dấu được dừng bằng cách bổ sung FBS, các tế bào được rửa và được tạo lại huyền phù trong môi trường tế bào T đến nồng độ cuối cùng bằng 0,125 x 10^6 tế bào/mL. 50µL huyền phù tế bào T CD8 đã được đánh dấu bằng CFSE này được bổ sung vào từng lỗ (tỷ lệ E:T cuối cùng = 1:8). Các đĩa tế bào được ủ trong 24 giờ, 50µL/lỗ được loại bỏ và 50µL môi trường tế bào T chứa 2,64µL/mL Golgi stop (Chất ức chế vận chuyển protein chứa Monesin, BD Bioscience, Cat.-No. 554724) được bổ sung vào từng lỗ (nồng độ cuối

cùng 0,66µL/mL). Các tế bào được ủ trong 4 giờ và sau đó các đĩa được rửa bằng 200µL/lỗ DPBS và được nhuộm bằng 100µL/lỗ DPBS 4°C chứa thuốc nhuộm Fixable Viability-eF450 đã pha loãng theo tỷ lệ 1:5000 (eBioscience, Cat.-No. 65-0864) trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các đĩa tế bào được rửa bằng DPBS 200µL/lỗ sau đó nhuộm bằng kháng thể liên hợp thuốc nhuộm huỳnh quang: CD137-PerCP/Cy5.5 kháng người (dòng vô tính 4B4-1, IgG1κ chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 309814), CD8-BV605 kháng người (dòng vô tính RPA-T8, IgG1κ chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 301012) hoặc 0,67µg/mL CD8a-APC/Cy7 kháng người (dòng vô tính RPA-T8, IgG1κ chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 301016) và CD25 PE/Cy7 kháng người (dòng vô tính BC96, IgG1κ chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 302612). Sau khi ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C, các tế bào được rửa hai lần bằng 200µL/lỗ dung dịch đệm FACS, được tạo lại huyền phù trong 50µL/lỗ dung dịch đệm FoxP3 Fix/Perm mới được điều chế (eBioscience Cat.-No. 00-5123 và 00-5223) và được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các đĩa được rửa hai lần bằng 200µL/lỗ dung dịch đệm Perm (DPBS được cung cấp FBS 2% (thể tích/thể tích), saponin 1% (trọng lượng/thể tích) (Sigma Life Science, S7900) và natri azit 1% (trọng lượng/thể tích) (Sigma-Aldrich, S2002) và được nhuộm bằng 50µL/lỗ dung dịch đệm Perm (eBioscience, Cat.-No. 00-8333-56) chứa 0,25µg/mL IFNγ-APC kháng người (dòng vô tính B27, IgG1κ chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 506510) hoặc 0,33µg/mL IFNγ-BV510 kháng người (dòng vô tính 4S.B3, IgG1κ chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No.502543). Các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C và được rửa hai lần bằng 200µL/lỗ dung dịch đệm Perm. Để cố định, 50µL/lỗ DPBS chứa formaldehyt 1% được bổ sung vào. Vào cùng ngày đó hoặc vào ngày tiếp theo, các tế bào này được tạo lại huyền phù trong 100µL/lỗ dung dịch đệm FACS và đạt kết quả bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy 5-laser Fortessa (BD Bioscience với phần mềm DIVA) hoặc 3-laser Miltenyi Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec) và Flow Jo (FlowJo X 10.0.7).

Như được thể hiện trên các hình vẽ Fig.22 và Fig.23 đối với các cấu trúc từ 1.1 đến 1.10 và trên các hình vẽ Fig.24 và Fig.25 đối với các cấu trúc 2.1, 2.3 và 2.4, tế bào T CD8+ đặc hiệu kháng nguyên, không phải là các đối chứng không được kích thích, thể hiện mức độ biểu hiện của 4-1BB trên bề mặt gia tăng khi có mặt phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (trime 4-1BBL đã chia tách FAP). Tác dụng này của 4-1BBL phụ thuộc vào liều lượng và cần phải

hướng đích FAP do việc bổ sung phân tử đối chứng không được hướng đích không ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của 4-1BB. Ngoài ra, các tế bào T được hoạt hóa ở nồng độ peptit cao hơn ($1x10^{-8}$M) cho thấy sự duy trì tiết INFγ khi có mặt phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích FAP (trime 4-1BBL đã chia tách FAP). Tóm lại, số liệu này cho thấy rằng phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB hướng đích kháng nguyên điều biến kiểu hình bề mặt và độ đáp ứng của tế bào T đặc hiệu kháng nguyên theo cách phụ thuộc vào việc hướng đích.

6.4 So sánh phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc 4-1BBL chuột nhắt được hướng đích và không được hướng đích tế bào

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB chuột nhắt được hướng đích và không được hướng đích (trime 4-1BBL chuột nhắt chia tách FAP và trime 4-1BBL chuột nhắt chia tách DP47) được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 1.3.

Để so sánh hoạt tính sinh học của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB chuột nhắt được hướng đích và không được hướng đích tế bào, tế bào lá lách chuột nhắt mới đã được đánh dấu bằng thuốc nhuộm tăng sinh eFlour670 (eBioscience, Cat.-No.65-0840-90) hoặc được đánh dấu bằng thuốc nhuộm tăng sinh tế bào CellTrace Violet Cell (Cell tracer, Cat.-No. C34557) được nuôi cấy đồng thời trong 3-4 ngày trong đĩa nuôi cấy mô đáy chữ U có 96 lỗ (TTP, Cat.-No. 92097) với tế bào NIH/3T3-huFAP đã được chiếu xạ 50 Gy bám dính dòng vô tính 39 (quy trình tạo ra, xem 5.3) trong môi trường RPMI 1640 (Gibco, Cat.-No. 42401-042) đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích), GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích), Natri-Pyruvat 1mM, axit amin không thiết yếu MEM 1% (thể tích/thể tích) và β-Mercaptoetanol 50μM khi có mặt 0,5μg/mL IgG chuột đồng Syri kháng CD3 chuột nhắt (dòng vô tính 145-2C11, BD, Cat.-No. 553057) và phân tử thuốc ứng viên đã được chỉ định được bổ sung vào ở một khoảng các nồng độ (Fig.26). Sau ba hoặc bốn ngày, các tế bào này được rửa bằng dung dịch đệm FACS và được nhuộm trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C trong 25uL dung dịch đệm FACS/lỗ chứa IgG2a-BV711 chuột cống kháng CD8 chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 100747, dòng vô tính 53-6.7,) và IgG2a-BV421 chuột cống kháng CD4 chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 100544, dòng vô tính RM4-5) và 0,67μg/mL IgG-PE chuột đồng Syri kháng CD137 (4-1BB) chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 106106, dòng vô tính

17B5) và IgG2b chuột cống kháng CD25-PErCP-Cy5.5 chuột nhắt (BioLegend, Cat.-No. 1019112). Các tế bào này được rửa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong dung dịch đệm Fix/Perm đã điều chế (Foxp3/bộ dung dịch đệm nhuộm yếu tố phiên mã, eBioscience, Cat.-Ni. 00-5523-00). Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm Perm mới được điều chế và được nhuộm đồng thời với 25µL/lỗ dung dịch đệm Perm chứa các kháng thể đã được đánh dấu huỳnh quang kháng yếu tố phiên mã dòng gây độc tế bào Eomes, tức là IgG2a-AlexaFluor488 chuột cống kháng Eomes chuột nhắt (eBioscience, Cat.-No. 534875, dòng vô tính Dan11mag) và – nếu CD137 không được nhuộm - kháng phân tử tác động gây độc tế bào granzym B, tức là IgG2a granzym B-PE chuột cống kháng chuột nhắt (eBioscience, Cat.-No. 128822, dòng vô tính 16G6) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó các tế bào này được rửa hai lần, được tạo lại huyền phù trong dung dịch đệm FACS và thu được bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy laser Fortessa (BD Bioscience với phần mềm DIVA) hoặc 3-laser MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotech) và Flow Jo v10.0.7 (FlowJo LLC). Các cổng được thiết lập trên các tế bào T CD8+ và các tế bào T CD4+ còn sống và tần suất tăng sinh tế bào cũng như mức độ biểu hiện của CD25, Eomes và granzym B hoặc CD137 được xác định. Tần suất tăng sinh và tần suất và MFI của chỉ thị hoạt hóa được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ của phân tử dung hợp Fc(kih) chứa trime phối tử 4-1BB chuột nhắt đã được sử dụng để biểu hiện hoạt tính chức năng. Như có thể quan sát trên Fig.27, sự tăng tăng sinh của các tế bào T CD8+ có thể được quan sát thấy đối với các cấu trúc M.1 và M.2.

6.5 Thay đổi ở gan chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể 4-1BB kháng chuột Lob 12.3 (muIgG1 Wt) hoặc bằng cấu trúc M.2

Chuột nhắt C57BL/6 mang MC38-muFAP (mô hình ung thư trực tràng ruột kết ở chuột) s.c. được điều trị mỗi tuần một lần trong 3 tuần bằng kháng thể chủ vận 4-1BB kháng chuột được hướng đích đến FAP (Efficacy Study 020-GA1401: "Experiment to show efficacy of 4-1BB targeted therapy in combination with a-PD-L1 in MC38-muFAP s.c. model in C57B6 mice."). Các kháng thể được sử dụng là Lob 12.3 muIgG1 Wt (với Fc "loại dại", dòng vô tính Lob 12.3 từ BioXcell Catalog#: BE0169) hoặc cấu trúc M.2 với đột biến DAPG (Fc bất hoạt). Hai kháng thể này được dùng mỗi tuần một lần trong ba tuần liên tiếp. Bốn con/nhóm được giết vào thời điểm 7 ngày sau lần điều trị cuối cùng và gan được kiểm tra qua kính hiển vi.

Các thay đổi ở gan chỉ được quan sát ở các con nhận Lob 12.3 muIgG1 Wt, bao gồm trong ổ bệnh thoái hóa tế bào gan có sự tích tụ của các đại thực bào dương tính với F4/80 và một lượng thấp hơn của quần thể hỗn tạp các tế bào viêm (chủ yếu là lympho bào) thường thể hiện sự phân bố tâm mạch. Đôi khi sự hoại tử tế bào đơn lẻ ở các tế bào gan, và sự xâm nhập của tế bào đơn nhân quanh mạch trong không gian cổng vào được ghi lại. Không quan sát thấy kết quả liên quan đến điều trị ở gan của các con nhận cấu trúc M.2 (Bảng 41).

Bảng 41: Tỷ lệ mắc theo các kết quả mô bệnh học (n=4/nhóm)

Điều trị	Chất dẫn thuốc	Lob 12.3 muIgG1 Wt	Cấu trúc M.2
Ổ bệnh thoái hóa tế bào gan với các đại thực bào và tế bào viêm	-	4	-
Sự xâm nhập của tế bào viêm quanh mạch	-	4	-
Sự hoại tử tế bào đơn lẻ	-	4	-

Bệnh viêm gan, được cho là do sự liên kết ngang với FcγR trong gan, được quan sát thấy ở các bệnh nhân được điều trị bằng Urelumab BMS-663513 (Ascierto P.A. et al. 2010) và ở chuột nhắt bằng cách sử dụng đối tượng thay thế chuột nhắt. Việc không có kết quả ở gan động vật được điều trị bằng kháng thể có Fc bất hoạt bổ trợ cho giả thuyết này.

6.6 Xác định thông số dược động học của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB người

Để thử nghiệm xem phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB người theo sáng chế có thích hợp để sử dụng trong lĩnh vực dược lý hay không, các thông số dược động học (số liệu PK) như độ thanh thải, thể tích phân bố hoặc thời gian bán rã loại trừ ($t_{1/2}$) ở chuột nhắt được xác định. Như vậy, các thử nghiệm sau được tiến hành:

Thử nghiệm A: PK liều đơn của cấu trúc 1.2 và đối chứng B ở các con chuột nhắt NOG khỏe mạnh

Chuột nhắt cái NOG ở độ tuổi trung bình từ 8 đến 10 tuần khi bắt đầu thử nghiệm (mua của Taconic, SOPF facility) được giữ trong điều kiện không có thể gây bệnh đặc hiệu với chu kỳ hằng ngày là 12 giờ sáng/12 giờ tối theo chỉ dẫn đã được cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và phê duyệt bởi chính phủ địa phương (P 2011128). Sau khi đến, các con chuột này được giữ trong một tuần để quen với môi trường mới và để quan sát. Việc theo dõi sức khỏe liên tục được tiến hành trên cơ sở thường xuyên.

Nghiên cứu dược động học liều đơn (SDPK) được thực hiện để đánh giá sự tiếp xúc của Cấu trúc 1.2 và Đối chứng B. Liều lớn i.v. 2,5mg/kg được dùng cho chuột nhắt NOG và các mẫu máu được lấy ở các thời điểm được chọn lọc để đánh giá dược động học. Các mẫu huyết thanh chuột nhắt được phân tích bằng ELISA. 4-1BB người được biotinyl hóa, các mẫu thử nghiệm, kháng thể kháng huCH1 được đánh dấu digoxygenin và kháng thể phát hiện kháng digoxygenin (POD) được bổ sung từng bước vào đĩa vi chuẩn phủ streptavidin có 96 lỗ và được ủ sau mọi bước trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Đĩa được rửa ba lần sau mỗi bước để loại bỏ các chất không gắn kết. Cuối cùng, phức hợp gắn kết peroxidaza được quan sát bằng mắt thường bằng cách bổ sung dung dịch nền ABTS để tạo ra sản phẩm phản ứng có màu. Mật độ sản phẩm phản ứng mà được xác định theo phương pháp quang trắc ở bước sóng 405nm (với bước sóng đối chiếu ở 490nm) tỷ lệ với nồng độ chất phân tích trong mẫu huyết thanh. Khoảng hiệu chỉnh của đường cong tiêu chuẩn đối với các cấu trúc là nằm trong khoảng từ 0,156 đến 10ng/mL, trong đó 3ng/mL là giới hạn định lượng dưới (LLOQ). Fig.28A thể hiện sự giảm nồng độ theo thời gian như được quan sát trong thử nghiệm này.

Thử nghiệm B: PK liều đơn của các cấu trúc 2.1, 2.3, Đối chứng B và Đối chứng C ở các con chuột nhắt NOG có khối u được biến đổi giống như của người bằng tế bào gốc

Nghiên cứu dược động học liều đơn (SDPK) được thực hiện để đánh giá sự tiếp xúc của các Cấu trúc 2.1, 2.3, Đối chứng B và Đối chứng C. Chuột nhắt cái NSG đã được truyền tế bào gốc của người được phân phối bởi Jackson Laboratories. Chuột nhắt được giữ trong điều kiện không có thể gây bệnh đặc hiệu với chu kỳ hằng ngày là 12 giờ sáng/12 giờ tối theo chỉ dẫn đã được cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương

pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và phê duyệt bởi chính phủ địa phương (ZH193-2014). Sau khi đến, các con chuột này được giữ trong một tuần để quen với môi trường mới và để quan sát. Việc theo dõi sức khỏe liên tục được tiến hành trên cơ sở thường xuyên.

Tế bào MKN45 người (caxinom dạ dày người) ban đầu thu được từ ATCC và sau khi mở rộng thì được nộp lưu tại ngân hàng tế bào nội bộ Glycart. Các tế bào được nuôi cấy trong DMEM chứa FCS 10%. Các tế bào này được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường bão hòa trong nước ở CO_2 5%. Đường cấy chuyển 9 *in vitro* được sử dụng để tiêm dưới da, với khả năng sống sót là 97%. Các nguyên bào sợi người NIH-3T3 được xử lý kỹ thuật tại Roche Nutley để biểu hiện FAP người. Dòng vô tính 39 được sử dụng ở đường cấy chuyển *in vitro* số 12 và với khả năng sống sót là 98%. 50 microlit huyền phù tế bào ($1x10^6$ tế bào MKN45 + $1x10^6$ 3T3-huFAP) trộn với 50 microlit Matrigel được tiêm dưới da ở sườn chuột nhắt đã được gây mê. Liều lớn i.v. 10mg/kg được dùng cho chuột nhắt đã được biến đổi giống như của người khi khối u đạt kích thước trung bình là $190mm^3$. Các mẫu máu được lấy ở các thời điểm được chọn lọc để đánh giá dược động học. Các mẫu huyết thanh chuột nhắt được phân tích bằng ELISA. 4-1BB người được biotinyl hóa, các mẫu thử nghiệm, kháng thể kháng huCH1 được đánh dấu digoxygenin và kháng thể phát hiện kháng digoxygenin (POD) được bổ sung từng bước vào đĩa vi chuẩn phủ streptavidin có 96 lỗ và được ủ sau mọi bước trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Đĩa này được rửa ba lần sau mỗi bước để loại bỏ các chất không gắn kết. Cuối cùng, phức hợp gắn kết peroxidaza được quan sát bằng mắt thường bằng cách bổ sung dung dịch nền ABTS để tạo ra sản phẩm phản ứng có màu. Mật độ sản phẩm phản ứng mà được xác định theo phương pháp quang trắc ở bước sóng 405nm (với bước sóng đối chiếu ở 490nm) tỷ lệ với nồng độ chất phân tích trong mẫu huyết thanh. Khoảng hiệu chỉnh của đường cong tiêu chuẩn đối với các cấu trúc là nằm trong khoảng từ 0,156 đến 10ng/mL, trong đó 3ng/mL là giới hạn định lượng dưới (LLOQ). Fig.28B thể hiện sự giảm nồng độ của các cấu trúc theo thời gian như được quan sát trong thử nghiệm này.

Thử nghiệm C: PK liều đơn của các cấu trúc 2.1 và 2.3 ở các con chuột nhắt NOG khỏe mạnh

Chuột nhắt cái NOG ở độ tuổi trung bình từ 8 đến 10 tuần khi bắt đầu thử nghiệm (mua của Taconic, SOPF facility) được giữ trong điều kiện không có thể gây bệnh đặc

hiệu với chu kỳ hằng ngày là 12 giờ sáng/12 giờ tối theo chỉ dẫn đã được cam kết (GV-Solas; Felasa; TierschG). Phương pháp nghiên cứu thử nghiệm được xem xét và phê duyệt bởi chính phủ địa phương (P 2011128). Sau khi đến, các con chuột này được giữ trong một tuần để quen với môi trường mới và để quan sát. Việc theo dõi sức khỏe liên tục được tiến hành trên cơ sở thường xuyên.

Nghiên cứu dược động học liều đơn (SDPK) được thực hiện để đánh giá sự tiếp xúc của cấu trúc 2.1 và cấu trúc 2.3. Liều lớn i.v. 2,5mg/kg được dùng cho chuột nhắt NOG và các mẫu máu được lấy ở các thời điểm được chọn lọc để đánh giá dược động học. Các mẫu huyết thanh chuột nhắt được phân tích bằng ELISA. 4-1BB người được biotinyl hóa, các mẫu thử nghiệm, kháng thể kháng huCH1 được đánh dấu digoxygenin và kháng thể phát hiện kháng digoxygenin (POD) được bổ sung từng bước vào đĩa vi chuẩn phủ streptavidin có 96 lỗ và được ủ sau mọi bước trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Đĩa này được rửa ba lần sau mỗi bước để loại bỏ các chất không gắn kết. Cuối cùng, phức hợp gắn kết peroxidaza được quan sát bằng mắt thường bằng cách bổ sung dung dịch nền ABTS để tạo ra sản phẩm phản ứng có màu. Mật độ sản phẩm phản ứng, được xác định theo phương pháp quang trắc ở bước sóng 405nm (với bước sóng đối chiếu ở 490nm), tỷ lệ với nồng độ chất phân tích trong mẫu huyết thanh. Khoảng hiệu chỉnh của đường cong tiêu chuẩn đối với các cấu trúc là nằm trong khoảng từ 0,156 đến 10ng/mL, trong đó 3ng/mL là giới hạn định lượng dưới (LLOQ). Fig.28C thể hiện sự giảm nồng độ quan sát được theo thời gian.

Các cấu trúc thử nghiệm 2.1 và 2.3 đủ ổn định trong cơ thể và có các thông số PK nằm trong khoảng thích hợp để phát triển dược phẩm. Dựa vào các kết quả, cũng có thể kết luận rằng cấu trúc 2.1 ổn định hơn một chút.

6.7 tỷ lệ hiện hành FAP trong khối u người

Tỷ lệ hiện hành của FAP trong các khối u ở người được đánh giá như được mô tả trong WO 2014/161845 để hiểu các cách sử dụng lâm sàng có thể có của cấu trúc được hướng đích FAP.

Kháng thể sepraza chuột cống kháng người (IgG2a, dòng vô tính D8) từ Vitatex (MABS1001) được sử dụng để nhuộm miễn dịch các đoạn FFPET dài 2,5µm từ các chỉ định khối u khác nhau trên Ventana Benchmark XT. Các đoạn này được xử lý CC1 tiêu chuẩn sau đó ủ kháng thể trong 60 phút ở nhiệt độ 37°C ở nồng độ bằng 5µg/mL trong

chất pha loãng kháng thể Dako (S3022) và sự nhuộm dương được phát hiện bằng cách sử dụng hệ thống phát hiện Ultraview DAB (Ventana #760-4456). Kháng thể isotyp ghép cặp từ Abcam (ab18450) được sử dụng làm đối chứng âm. Sự xâm nhập FAP+ vào mô đệm có trong khối u người có các chỉ định khác nhau bao gồm caxinom tế bào vảy đầu và cổ (HNSCC), ung thư vú, ung thư trực tràng ruột kết (CRC), ung thư tuyến tụy (PAC), ung thư dạ dày, caxinom phổi tế bào không nhỏ (NSCLC) và u trung biểu mô là các chỉ định lâm sàng đáng chú ý đối với cấu trúc được hướng đích FAP (Bảng 42).

Bảng 42: Tỷ lệ hiện hành FAP ở khối u người

Loại khối u	% trường hợp có mức xâm nhập FAP^+ từ vừa phải đến cao	Số lượng mẫu được nghiên cứu
HNSCC	90	10
Ung thư vú	77	105
BC bộ ba âm tính	80	7
CRC	77	90
PAC	74	19
Ung thư dạ dày	68	28
NSCLC	66	90
U trung biểu mô	60	10

Ví dụ 7

7.1 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CD19 (8B8-018)

7.1.1 Tạo ra, tinh chế và đặc trưng hóa thể dung hợp Fc kháng nguyên CD19 cho chiến dịch biểu hiện thể thực khuẩn

Để biểu hiện và tinh chế miền ngoài CD19 của người và khỉ đuôi dài ở trạng thái monome (CD19 người, xem SEQ ID NO:31), mảnh ADN tương ứng được dung hợp với đoạn gen Fc IgG1 người chứa đột biến "khóa" (ở người: SEQ ID NO: 186; khỉ đuôi dài: SEQ ID NO: 188) và được chuyển nhiễm với "ổ Fc" kèm theo (SEQ ID NO: 86) (Merchant et al., 1998). Vị trí phân tách IgA (PTPPTP) được đưa vào giữa miền ngoài kháng nguyên và chuỗi khóa Fc. Đuôi Avi để biotinyl hóa trực tiếp được đưa vào đầu tận C của chuỗi khóa Fc-kháng nguyên và các đột biến H435R và Y436F được đưa vào ổ Fc nhằm mục đích tinh chế (Jendeberg L. et al, J. Immunological Methods, 1997). Sự kết hợp giữa chuỗi khóa Fc-kháng nguyên chứa các đột biến S354C/T366W (ở người: SEQ ID NO: 187; khỉ đuôi dài: SEQ ID NO: 189), với chuỗi ổ Fc chứa các đột biến Y349C/T366S/L368A/ Y407V (SEQ ID NO: 90) cho phép tạo ra mảnh dung hợp Fc heterodime bao gồm một bản sao của miền ngoài CD19 (tương tự với cấu trúc 4-1BB trên Fig.5C). Bảng 43 liệt kê trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của cấu trúc dung hợp Fc kháng nguyên.

Bảng 43: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử dung hợp Fc(kih) kháng nguyên CD19 monome ở người và khỉ đuôi dài

SEQ ID NO:	Kháng nguyên	Trình tự
86	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc	Xem Bảng 32
186	Trình tự nucleotit dđuôi Avi của chuỗi	CCCGAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGG CGACAATGCCGTGCTGCAGTGCCTGAAGGGCACCT CCGATGGCCCTACCCAGCAGCTGACCTGGTCCAGA GAGAGCCCCCTGAAGCCCTTCCTGAAGCTGTCTCTG

	khóa Fc của kháng nguyên CD19 người	GGCCTGCCTGGCCTGGGCATCCATATGAGGCCTCTG GCCATCTGGCTGTTCATCTTCAACGTGTCCCAGCAG ATGGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCCTGGCCCCCCA TCTGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGCTGGACCGTGAA CGTGGAAGGATCCGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACG TGTCCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAAG AACAGATCTAGCGAGGGCCCCAGCAGCCCCAGCGG CAAACTGATGAGCCCCAAGCTGTACGTGTGGGCCA AGGACAGACCCGAGATCTGGGAGGGCGAGCCTCCT TGCCTGCCCCCTAGAGACAGCCTGAACCAGAGCCT GAGCCAGGACCTGACAATGGCCCCTGGCAGCACAC TGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCTGTGT CTAGAGGCCCTCTGAGCTGGACCCACGTGCACCCTA AGGGCCCTAAGAGCCTGCTGAGCCTGGAACTGAAG GACGACAGGCCCGCCAGAGATATGTGGGTCATGGA AACCGGCCTGCTGCTGCCTAGAGCCACAGCCCAGG ATGCCGGCAAGTACTACTGCCACAGAGGCAACCTG ACCATGAGCTTCCACCTGGAAATCACCGCCAGACCC GTGCTGTGGCACTGGCTGCTGAGAACAGGCGGCTG GAAGGTCGACGCTAGCGGTGGTAGTCCGACACCTC CGACACCCGGGGGTGGTTCTGCAGACAAAACTCAC ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT GCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG

		TGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCG GAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATT GAATGGCACGAG
90	Trình tự polypeptit chuỗi ổ Fc	Xem Bảng 32
187	Trình tự polypeptit đuôi Avi của chuỗi khóa Fc của kháng nguyên CD19 người	PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRES PLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGF YLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLG GLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIW EGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPD SVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWV METGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITARP VLWHWLLRTGGWKVDASGGSPTPPTPGGGSADKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KSGGLNDIFEAQKIEWHE
188	Trình tự nucleotit đuôi avi của chuỗi khóa Fc của kháng	CCCCAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGG CGACAATGCCGTGCTCCAGTGCCTGGAAGGCACCTC CGATGGCCCTACACAGCAGCTCGTGTGGTGCAGAG ACAGCCCCTTCGAGCCCTTCCTGAACCTGTCTCTGG GCCTGCCTGGCATGGGCATCAGAATGGGCCCTCTGG

	nguyên CD19 khỉ đuôi dài	GCATCTGGCTGCTGATCTTCAACGTGTCCAACCAGA
		CCGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCCTGGCCTGCCAA
		GCGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGTGTCC
		GTGGAAGGATCTGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGT
		GTCCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAAGA
		ACAGAAGCAGCGAGGGCCCTAGCAGCCCCAGCGGC
		AAGCTGAATAGCAGCCAGCTGTACGTGTGGGCCAA
		GGACAGACCCGAGATGTGGGAGGGCGAGCCTGTGT
		GTGGCCCCCCTAGAGATAGCCTGAACCAGAGCCTG
		AGCCAGGACCTGACAATGGCCCCTGGCAGCACACT
		GTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCTGTGTC
		CAGAGGCCCTCTGAGCTGGACACACGTGCGGCCAA
		AGGGCCCTAAGAGCAGCCTGCTGAGCCTGGAACTG
		AAGGACGACCGGCCCGACCGGGATATGTGGGTGGT
		GGATACAGGCCTGCTGCTGACCAGAGCCACAGCCC
		AGGATGCCGGCAAGTACTACTGCCACAGAGGCAAC
		TGGACCAAGAGCTTTTACCTGGAAATCACCGCCAG
		ACCCGCCCTGTGGCACTGGCTGCTGAGAATCGGAG
		GCTGGAAGGTCGACGCTAGCGGTGGTAGTCCGACA
		CCTCCGACACCCGGGGGTGGTTCTGCAGACAAAAC
		TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGC
		AGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC
		CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
		CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
		CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG
		GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
		GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
		CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
		AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGA
		GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG
		GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
		CATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC
		CTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC

		ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA TCCGGAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAA GATTGAATGGCACGAG
189	Trình tự polypeptit đuôi avi của chuỗi khóa Fc của kháng nguyên CD19 khỉ đuôi dài	PQEPLVVKVEEGDNAVLQCLEGTSDGPTQQLVWCRD SPFEPFLNLSLGLPGMGIRMGPLGIWLLIFNVSNQTGG FYLCQPGLPSEKAWQPGWTVSVEGSGELFRWNVSDL GGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLNSSQLYVWAKDRPEM WEGEPVCGPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVP PDSVSRGPLSWTHVRPKGPKSSLLSLELKDDRPDRDM WVVDTGLLLTRATAQDAGKYYCHRGNWTKSFYLEIT ARPALWHWLLRIGGWKVDASGGSPTPPTPGGGSADK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE

Để sản xuất phân tử dung hợp kháng nguyên/Fc monome, các tế bào CHO huyền phù sinh trưởng theo cấp số mũ được chuyển nhiễm đồng thời với hai plasmit mã hóa hai thành phần của protein dung hợp (chuỗi khóa và chuỗi ổ) bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn.

Protein tiết ra được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng Protein A, sau đó đến phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Đối với phương pháp sắc ký ái lực, phần dịch nổi trên bề mặt được nạp lên trên cột MabSelect Sure thể tích (CV) = 5-15mL, nhựa từ GE Healthcare) đã được cân

bằng với Natri Phosphat (20mM), Natri xitrat (20mM), dung dịch đệm natri clorua 0,5M (độ pH = 7,5). Protein không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa với ít nhất 6 thể tích cột của cùng một dung dịch đệm. Protein gắn kết được rửa giải bằng cách sử dụng gradien tuyến tính; bước 1, 10 CV từ 0 đến 60% dung dịch đệm rửa giải (natri xitrat 20mM, dung dịch đệm natri clorua 500mM (độ pH = 2,5)); bước 2, 2 CV từ 60 đến 100% dung dịch đệm rửa giải. Đối với gradien tuyến tính, bước rửa giải 2 thể tích cột bổ sung với dung dịch đệm rửa giải 100% được sử dụng.

Độ pH của các đoạn đã gom được điều chỉnh bằng cách bổ sung 1/40 (thể tích/thể tích) của Tris 2M, độ pH = 8,0. Protein được cô và lọc trước khi nạp lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) đã được cân bằng với MOPS 2mM, natri clorua 150mM, dung dịch natri azit 0,02% (trọng lượng/thể tích) có độ pH = 7,4.

Bảng 44 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của protein dung hợp Fc(kih) kháng nguyên CD19 monome ở người và khỉ đuôi dài.

Bảng 44 - Phân tích sinh hóa của protein dung hợp Fc(kih) kháng nguyên CD19 monome ở người và khỉ đuôi dài

Cấu trúc	Monome [%] (giây)	Hiệu suất [mg/l]
Protein dung hợp Fc(kih) CD19 monome ở người	91	0,2
Protein dung hợp Fc(kih) CD19 monome ở khỉ đuôi dài	95	3,56

Một phần của kháng nguyên đã tinh chế được biotinyl hóa *in vitro* bằng cách sử dụng bộ kit phản ứng tiêu chuẩn BirA biotin-protein ligaza (Avidity, Cat. # BirA500) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Mức biotinyl hóa đối với thể dung hợp chứa CD19 người là 94%, đối với cấu trúc CD19 khỉ đuôi dài tương ứng là 100%. Protein đã được biotinyl hóa sau đó được sử dụng để chọn lọc, sàng lọc và đặc trưng hóa dòng vô tính thu được từ 8B8 trưởng thành ái lực không có điểm nóng khử amit hóa N27d và N28.

7.1.2 Tạo ra dòng vô tính 8B8-018 kháng CD19

7.1.2.1 Miễn dịch hóa và tạo ra kháng thể chuột nhắt kháng CD19 người (tế bào lai)

Chuột nhắt Balb/c được miễn dịch hóa sáu lần và tăng cường bằng tế bào HEK293 đã chuyển nhiễm CD19 (mật độ thụ thể trung bình 35000 trong mỗi tế bào). Đáp ứng miễn dịch được theo dõi bằng cách thử nghiệm các mẫu huyết thanh bằng CD19-cell-ELISA trên tế bào NIH-3T3 đã chuyển nhiễm CD19 người. Các tế bào lá lách từ chuột nhắt có đủ độ chuẩn của kháng thể CD19 kháng người được sử dụng để làm bất tử bằng cách dung hợp với dòng tế bào u tủy chuột nhắt P3X63 Ag8.653. Ba lần dung hợp được tiến hành và phần dịch nổi trên bề mặt tế bào lai được sàng lọc bằng cell-ELISA trên tế bào NIH-3T3 đã chuyển nhiễm CD19 người và thử nghiệm gắn kết FACS sử dụng tế bào Daudi (CD19+) và CD19- cho các kháng thể đặc hiệu CD19 kháng người (xem Ví dụ 1 của WO 2011/147834).

7.1.2.2 Sàng lọc tế bào lai và đánh giá chức năng sinh học của tế bào của kháng thể kháng CD19

Cell-ELISA để sàng lọc các kháng thể kháng CD19 người

Phương pháp cell ELISA được sử dụng để sàng lọc các tế bào lai, và để nhận biết các tế bào lai tiết ra kháng thể kháng CD19 người. Tế bào NIH3T3 đã được chuyển nhiễm bằng CD19 người được sử dụng làm tế bào dương; tế bào NIH3T3 không được chuyển nhiễm được sử dụng làm tế bào đối chứng âm. Để đánh giá các tế bào lai dương, tỷ lệ OD giữa tế bào NIH3T3 được chuyển nhiễm và không được chuyển nhiễm được định lượng.

- Môi trường nuôi cấy: DMEM glucoza cao (4,5mg/ml), FCS 10%, Na-Pyruvat, NEAA, Glutamin
- Kháng thể đối chứng dương: kháng thể đơn dòng kháng CD19 (IgG1) Pharmingen Cat# 555409 c = 1mg/ml
- Kháng thể phát hiện: Thể liên hợp IgG (H+L) HRP dê kháng chuột nhắt Bio-Rad Cat# 170-06516
- Pha loãng tỷ leek 1: 2000 trong 1x chất thử nghiệm phong bế ELISA
- Các chất phản ứng khác: Fibronectin Roche Cat# 838039 c = 1mg/ml
- Glutardialdehyt: 25% dung dịch gốc // Grade Agar Scientific #R102 nồng độ cuối cùng: 0,05% trong PBS

- Chất phản ứng phong bế ELISA: 10x dung dịch gốc // Roche Cat# 1112589
- Cơ chất TMB: Roche Cat# 11432559
- Dung dịch dừng: H_2SO_4 1M
- BioRad Cat# 170-6516 Pha loãng tyr leej 1: 2000 trong 1x chất phản ứng phong bế ELISA

Ngày 1:

- Phủ fibronectin: 5µg/cm² trong PBS; đĩa 96 lỗ = 32 cm²; 160µg/đĩa trong 6ml
- PBS, 50µL/lỗ
- Ủ 45 phút ở nhiệt độ trong phòng, hút dung dịch phủ ra
- Gieo cấy 1,25 x 10^4 tế bào/lỗ trong 50µL môi trường nuôi cấy trong đĩa 96 lỗ
- Ủ 40 giờ ở nhiệt độ 37°C
- Bổ sung vào nửa trên của đĩa: tế bào NIH3T3 biểu hiện CD19
- Bổ sung vào nửa dưới của đĩa: tế bào NIH3T3 không được chuyển nhiễm

Ngày 3:

- Bổ sung kháng thể hoặc mẫu đối chứng dương (phần dịch nổi trên bề mặt hoặc huyết thanh chuột nhắt) trong 50µL môi trường nuôi cấy
- Ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 4°C
- Loại bỏ môi trường, cố định các tế bào bằng 100µL Glutardialdehyt (0,05% trong PBS)
- Rửa hai lần bằng 200µL PBS
- Bổ sung kháng thể phát hiện 1:2000, 50µL/lỗ
- Ủ 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng
- Rửa ba lần bằng 200µL PBS
- Bổ sung 50µL TMB, ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng,
- Dừng bằng cách bổ sung 25µL H_2SO_4 1M; ghi lại kết quả triệt tiêu ở bước sóng 450nm/620nm
- Tính kết quả: tỷ lệ OD NIH3T3 CD19:OD NIH3T3 không được chuyển nhiễm

Kháng thể được chọn lọc cho thấy khả năng gắn kết đặc hiệu với tế bào NIH3T3 đã được chuyển nhiễm CD19 so với tế bào NIH3T3 không được chuyển nhiễm (xem Ví dụ 2 của WO 2011/147834).

7.1.2.3 Biến đổi giống như của người cho kháng thể kháng CD19

Độ đặc hiệu gắn kết CD19 của kháng thể chuột được chuyển lên trên khung của thụ thể người để loại bỏ các mô sinh miễn dịch tiềm ẩn phát sinh khi duỗi trình tự mà cơ thể người sẽ nhận diện là ngoại lai. Việc này được thực hiện bằng cách ghép toàn bộ vùng quyết định thể bổ sung (CDR) của kháng thể chuột (đối tượng cho) lên trên khung kháng thể (thụ thể) người, và được gọi là ghép CDR hoặc biến đổi giống như của người cho kháng thể.

Trình tự axit amin của chuột được căn thẳng với tập hợp các gen V của kháng thể dòng mầm người, và được phân loại theo độ đồng nhất trình tự và độ tương đồng trình tự. Trước khi chọn lọc một trình tự thụ thể cụ thể, cấu trúc gọi là cấu trúc vòng kiểu mẫu của kháng thể cho phải được xác định (Morea, V., et al., Methods, Vol 20, Issue 3 (2000) 267-279). Các cấu trúc vòng kiểu mẫu này được xác định bằng loại gốc có mặt ở các vị trí gọi là vị trí kiểu mẫu. Các vị trí này nằm (một phần) bên ngoài các vùng CDR, và phải được duy trì sự tương đương về mặt chức năng trong cấu trúc cuối cùng để giữ được cấu dạng CDR của kháng thể (cho) gốc. Trình tự dòng mầm người VBASE_VH1_1 được chọn làm thụ thể cho chuỗi nặng và trình tự VBASE_VK2_5 được chọn cho chuỗi nhẹ.

7.1.2.4 Loại bỏ các điểm nóng khử amit hóa

Đã phát hiện ra rằng kháng thể CD19 loại dại kháng người được biến đổi giống như của người có ba điểm nóng khử amit hóa trong HVR-L1: NSNGNT (SEQ ID NO: 190). Ngoài ra, đã phát hiện ra rằng, trong HVR-H2 còn có thêm một điểm nóng khử amit hóa nữa: KFNG (SEQ ID NO: 191). Để định vị điểm nóng khử amit hóa trong HVR-H2, đột biến điểm N (Asn) thành Q (Gln) ở vị trí 64 (đánh số theo Kabat) được đưa vào. Như vậy, kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả có HVR-H2 chứa trình tự axit amin TEKFQGRVTM (SEQ ID NO: 192).

Để chỉ định đến điểm nóng khử amit hóa trong chuỗi nhẹ và để thu được kháng thể CD19 kháng người được biến đổi giống như của người có độ ổn định khử amit tốt hơn, các đột biến đơn lẻ ở vị trí Kabat 27d, 27e, 28 và 29 và đột biến đôi ở vị trí 27e và 28 (đánh số theo Kabat) được đưa vào. Tổng cộng có 9 biến thể (var.1 đến var.9) của kháng thể loại dại được biến đổi giống như của người (var.0) được tạo ra (xem Bảng 45).

Bảng 45: các biến thể của kháng thể CD19 loại dại được biến đổi giống như của người

Kabat	2222	Kabat	6
Vị trí	7789	vị trí	4
LC:	de	HC:	
var.0:wt	QSLENSNGNTYLNW		TEKFNGKATM
var.1:N27dH	QSLE**H**SNGNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.2:N27dQ	QSLE**Q**SNGNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.3:S27eA	QSLEN**A**NGNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.4:S27eV	QSLEN**V**NGNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.5:S27eP	QSLEN**P**NGNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.6:N28Q	QSLENS**Q**GNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.7:G29A	QSLENSN**A**NTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.8:G29V	QSLENSN**V**NTYLNW		TEKF**Q**GRVTM
var.9:S27eP/N28S	QSLEN**PS**GNTYLNW		TEKF**Q**GRVTM

Biến thể → ↓thông số	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
K_D (BIAcore) [nM]	5	250	136	2	1	6	54	4	16	45
$t_{1/2}$ [phút]	-	0,1	1,1	105,2	191,5	43,6	4,4	51,5	17,6	4
Gắn kết CD19 người sau khi ủ độ pH = 7,4 [%]	46	0	75	84	85	95	91	72	83	83
Gắn kết CD19 người sau khi ủ độ pH = 6,0 [%]	90	0	95	95	97	99	97	86	91	87

Biến thể → ↓thông số	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Đỉnh chính SEC sau khi ủ [%]	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	-

Đã phát hiện ra rằng, với đột biến đơn ở vị trí 27e theo Kabat từ S (serin) sang P (prolin), tất cả các điểm nóng khử amit hóa trong HVR-L1 đều có thể được định vị. Đây là đột biến không phải của gốc khử amit hóa nghiêng về phía N (asparagin) mà là của gốc lân cận.

Như vậy, kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả có HVR-L1 chứa trình tự axit amin LENPNGNT (SEQ ID NO: 193). Theo một phương án, kháng thể CD19 kháng người được biến đổi giống như của người bao gồm HVR-L1 có trình tự axit amin LENPSGNT (SEQ ID NO: 194).

Ngoài ra, các kháng thể này duy trì khả năng phản ứng chéo với CD19 khỉ đuôi dài như được thể hiện trong Bảng 46 sau.

EC50 [µg/ml]	var.0	var.5	var.9
huCD19 ECD	0,087	0,084	0,089
cyCD19 ECD	0,313	0,255	0,435

Kháng thể CD19 kháng người loại dại được biến đổi giống như của người (var.0) sau khi tinh chế thể hiện mức khử amit hóa khoảng 7,5%. Sau khi bảo quản trong hai tuần ở độ pH = 7,4, lượng kháng thể được khử amit hóa tăng lên đến khoảng 18,5%. Kháng thể biến thể có đột biến S27eP (var.5) thể hiện mức khử amit hóa khoảng 2% và tạo ra 2% sucxinimit sau khi tinh chế. Trong khi bảo quản ở độ pH = 7,4 trong hai tuần, chỉ kháng thể được khử amit hóa khoảng 7,5% là có mặt. Var. 5 được đặt tên là dòng vô tính 8B8-018 và được chọn để tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF hướng đích CD19.

7.1.3 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-254) hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một với miền CH1-CL lai có các gốc mang điện (Cấu trúc 3.1)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng như được thể hiện trên Fig.29A: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL. Polypeptit người chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và được dung hợp với miền IgG1-CH người, được tách dòng như được mô tả trên Fig.29B: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH người.

Polypeptit mã hóa phối tử 4-1BB dime đã dung hợp với miền CL người được tái tạo dòng thuần trong khung với miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên khóa (Merchant, Zhu et al. 1998). Để cải thiện khả naăng ghép cặp chính xác, các đột biến sau được đưa vào trong CH-CL lai. Trong phối tử 4-1BB dime được dung hợp với CL người là E123R và Q124K được đưa vào. Trong phối tử 4-1BB monome được dung hợp với CH1 người là K147E và K213E được đưa vào.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-018, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831.

Sự kết hợp giữa phối tử dime - chuỗi khóa Fc chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp CH1 monome, chuỗi ổ Fc kháng CD19 được hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng CD19 cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và Fab gắn kết CD19 (Fig.30, Cấu trúc 3.1).

Bảng 47 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một có CH-CL lai và các gốc mang điện (cấu trúc 3.1).

Bảng 47: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc(kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19 (8B8-018) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 3.1). * đối với các gốc mang điện

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
129	Trình tự nucleotit Hu 4-1BBL dime (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3
130	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL monome (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
203	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGT CAAGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATG CAAGGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTATA TCATGCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCAA GGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCATAT AATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTCA GGGAAGAGTCACTATGACATCTGACACCAGTA TCAGCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTTC GGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTGTGCCA GGGGCACATATTACTACGGCTCAGCTCTGTTCG ACTATTGGGGGCAGGGAACCACAGTAACCGTG AGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTC CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGA

		ACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTAT AGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGC AGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACT CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCT GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCC CATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC AGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCG TGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
204	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	GACATCGTCATGACCCAGACACCCCTGTCCCTC TCTGTGACCCCTGGCCAGCCAGCCTCAATTAGC TGCAAGTCCTCTCAAAGTCTGGAGAACCCCAAT GGGAACACTTACCTTAATTGGTATCTGCAGAAA

		CCCGGACAATCCCCTCAACTCCTGATCTACAGG GTCTCTAAGAGATTCTCAGGCGTGCCAGATCGC TTTAGCGGTTCCGGGTCTGGCACAGACTTCACC TTGAAGATTAGTCGGGTTGAAGCTGAGGATGTG GGAGTCTATTACTGTCTGCAGCTCACTCATGTG CCCTACACCTTTGGTCAGGGCACAAAACTGGA GATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTT CATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTC CGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGG AAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTC CCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGG ACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCC TGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTG TACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGA GTGC
115	Hu 4-1BBL dime (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3
116	hu 4-1BBL monome (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
205	Chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYI MHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQ GRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARG TYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL

		TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
206	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGN TYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTF GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

7.1.4 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-254) hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một với miền CH1-CL lai không có gốc mang điện (Cấu trúc 3.2)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng tương tự như được thể hiện trên Fig.29A, nhưng không có các đột biến axit amin trong miền CL: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL. Polypeptit người chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và được dung hợp với miền IgG1-CH1 người, được tách dòng tương tự như được thể hiện trên Fig.29B, nhưng không có các đột biến axit amin trong miền CH1: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH1 người.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-018, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người.

Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831. Sự kết hợp giữa phối tử dime - chuỗi khóa Fc chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp CH1 monome, chuỗi ổ Fc kháng CD19 được hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng CD19 cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và Fab gắn kết CD19 (Fig.30, Cấu trúc 3.2).

Bảng 48 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (cấu trúc 3.2).

Bảng 48: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (cấu trúc 3.2).

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
165	Trình tự nucleotit phối tử dime (71-254)– Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 22
166	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL monome (71-254) – CH1	Xem Bảng 22
203	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
204	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
117	Phối tử dime (71-254) - Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 22

118	Phối tử monome (71-254) -CH1	Xem Bảng 22
205	Chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
206	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47

7.1.5 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB trime (71-254) hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị hai (Cấu trúc 3.3)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$ dung hợp với đầu tận C của chuỗi ổ Fc IgG1 người, như được thể hiện trên Fig.29C: ổ Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người. Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và được dung hợp với đầu tận C của chuỗi khóa Fc IgG1 người như được mô tả trên Fig.29D: khóa Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-018, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ, khóa hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831. Sự kết hợp giữa chuỗi ổ của phối tử dime huIgG1 kháng CD19 chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V, chuỗi khóa của phối tử monome huIgG1 kháng CD19 chứa đột biến S354C/T366W và chuỗi nhẹ kháng CD19 cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và hai Fab gắn kết CD19 (Fig.30, cấu trúc 3.3).

Bảng 49 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị hai (cấu trúc 3.3).

Bảng 49: Trình tự cặp bazơ của thể dung hợp Fc (kih) PGLALA của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị hai (cấu trúc 3.3)

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
207	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc của phối tử dime kháng CD19(8B8-018)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGT CAAGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATG CAAGGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTATA TCATGCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCAA GGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCATAT AATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTCA GGGAAGAGTCACTATGACATCTGACACCAGTA TCAGCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTTC GGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTGTGCCA GGGGCACATATTACTACGGCTCAGCTCTGTTCG ACTATTGGGGGCAGGGAACCACAGTAACCGTG AGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTC CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGA ACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTAT AGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGC AGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACT CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCT GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA

		GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
		CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC
		ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
		TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCC
		ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
		GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCC
		CATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC
		AGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCC
		AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
		GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC
		CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCG
		TGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
		CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
		CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
		GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGG
		AAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTG
		AGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGG
		ACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGG
		CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGT
		CCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGT
		CACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGAC
		ACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGT
		GTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAG
		AGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTC
		TCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGC
		TGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGA
		TCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAG
		CGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCT
		GTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGC
		ACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAG
		CTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC
		AGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCT

		TCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGG CGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAACTGT CCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGA GACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAG AATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGG TACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTG ACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAA AGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACT ATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGG TGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGG CTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTG GCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGC CACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCC TTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGC GCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATAC TGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGA CTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCG TGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTGCCAAGCC CTAGATCAGAA
208	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc của phối tử monome kháng CD19(8B8-018)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGT CAAGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATG CAAGGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTATA TCATGCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCAA GGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCATAT AATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTCA GGGAAGAGTCACTATGACATCTGACACCAGTA TCAGCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTTC GGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTGTGCCA GGGGCACATATTACTACGGCTCAGCTCTGTTCG ACTATTGGGGGCAGGGAACCACAGTAACCGTG AGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC

		CCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
		GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
		CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA
		CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT
		CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC
		CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG
		CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA
		TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
		AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACA
		CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCA
		GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA
		CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
		GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
		CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
		GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
		AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC
		CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
		GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
		GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA
		GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
		GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGC
		AGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCT
		GTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGA
		TATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC
		CTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTG
		CTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCC
		AAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCA
		GGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG
		AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC
		CTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAG
		CGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGC
		TGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACC

		TGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCC AGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCT GGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCAC TGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACC AAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTA CTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGT GGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGC TGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCT GCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCG CATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGT CTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCAC ACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCT GACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCA GAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTT CTCCAAGAAGCGAA
204	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
209	Chuỗi ổ Fc của phối tử dime kháng CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYI MHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQ GRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARG TYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA

		VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
210	Chuỗi khóa Fc của phối tử monome kháng CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYI MHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQ GRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARG TYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT

		VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSE
206	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47

7.1.6 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một với miền CH1-CL lai có các gốc mang điện (Cấu trúc 3.4)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng tương tự như phương pháp được thể hiện trên Fig.29A: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL. Polypeptit người chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248) và được dung hợp với miền IgG1-CH người, được tách dòng tương tự với phương pháp được mô tả trên Fig.29B: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH người.

Polypeptit mã hóa phối tử 4-1BB dime đã dung hợp với miền CL người được tái tạo dòng thuần trong khung với miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên khóa (Merchant, Zhu et al. 1998). Để cải thiện khả năng ghép cặp chính xác, các đột biến sau được đưa vào trong CH-CL lai. Trong phối tử 4-1BB dime được dung hợp với CL người, là E123R và Q124K. Trong phối tử 4-1BB monome được dung hợp với CH1 người, là K147E và K213E.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-018, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nhẹ ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831. Sự kết hợp giữa phối tử dime - chuỗi khóa Fc chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp CH1 monome, chuỗi ổ Fc kháng CD19 được hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng CD19 cho phép

tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và Fab gắn kết CD19 (Fig.30, cấu trúc 3.4).

Bảng 50 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một có CH-CL lai và các gốc mang điện (cấu trúc 3.4).

Bảng 50: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 3.4). * các gốc mang điện

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
169	Trình tự nucleotit phối tử dime (71-248) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 24
170	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL monome (71-248) – CH1*	Xem Bảng 24
203	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
204	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
119	Phối tử dime (71-248) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 24
120	Phối tử monome (71-248)-CH1*	Xem Bảng 24
205	Chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
206	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47

7.1.7 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một với miền CH1-CL lai không có các gốc mang điện (Cấu trúc 3.5)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng tương tự như được thể hiện trên Fig.29A, nhưng không có các đột biến axit amin trong miền

CL: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL. Polypeptit người chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248) và được dung hợp với miền IgG1-CH1 người, được tách dòng tương tự như được thể hiện trên Fig.29B, nhưng không có các đột biến axit amin trong miền CH1: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH1 người.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-018, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831. Sự kết hợp giữa phối tử dime - chuỗi khóa Fc chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp CH1 monome, chuỗi ổ Fc kháng CD19 được hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng CD19 cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và Fab gắn kết CD19 (Fig.30, Cấu trúc 3.5).

Bảng 51 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (cấu trúc 3.5).

Bảng 51: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (cấu trúc 3.5).

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
171	Trình tự nucleotit phối tử dime (71-248) – Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 25
172	Trình tự nucleotit phối tử monome (71-248)-CH1	Xem Bảng 25
203	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
204	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
173	Phối tử dime (71-248) – Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 25
174	Phối tử monome (71-248)-CH1	Xem Bảng 25
205	Chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
206	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47

7.1.8 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị hai (Cấu trúc 3.6)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$ được dung hợp với đầu tận C của chuỗi ổ Fc IgG1 người, như được thể hiện trên Fig.29C: ổ Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người. Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và được dung hợp với đầu tận C của chuỗi khóa Fc IgG1 người như được mô tả trên Fig.29D: khóa Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-018, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ, khóa hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến

Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831. Sự kết hợp giữa chuỗi ổ phối tử dime huIgG1 kháng CD19 chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V, chuỗi khóa phối tử monome huIgG1 kháng CD19 chứa đột biến S354C/T366W và chuỗi nhẹ kháng CD19 cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và hai Fab gắn kết CD19 (Fig.30, cấu trúc 3.6).

Bảng 52 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị hai (cấu trúc 3.6).

Bảng 52: trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị hai (cấu trúc 3.6)

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
211	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc của phối tử dime (71-248) kháng CD19(8B8-018)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGT CAAGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATG CAAGGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTATA TCATGCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCAA GGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCATAT AATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTCA GGGAAGAGTCACTATGACATCTGACACCAGTA TCAGCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTTC GGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTGTGCCA GGGGCACATATTACTACGGCTCAGCTCTGTTCG ACTATTGGGGGCAGGGAACCACAGTAACCGTG AGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTC CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGA

		ACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACC
		TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTAT
		AGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGC
		AGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
		GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
		AGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACT
		CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCT
		GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA
		AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC
		CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
		GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
		TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
		GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
		CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC
		ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
		TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCC
		ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
		GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCC
		CATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC
		AGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCC
		AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
		GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC
		CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCG
		TGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
		CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
		CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
		GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGG
		AAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTG
		AGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGG
		ACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGG
		CCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGT
		CCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGT

		CACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGAC ACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGT GTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAG AGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTC TCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGC TGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGA TCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATA GCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACC TGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGC ACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAG CTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGG AGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAG AAGGACCCGAGCTGTCCCCCGACGATCCCGCT GGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTCGCT CAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGAC GGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTG GCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTAC AAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAA AGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGA ACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAG GATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCAC TGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCC CTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAG GCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACG CCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGG GAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGG CATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTG CTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCA GCCGGGCTC

212	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc của phối tử (71-248) monome kháng CD19(8B8-018)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGT CAAGAAACCCGGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATG CAAGGCAAGCGGATACACCTTCACCGACTATA TCATGCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCAA GGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCATAT AATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAGTTTCA GGGAAGAGTCACTATGACATCTGACACCAGTA TCAGCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCTTC GGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTGTGCCA GGGGCACATATTACTACGGCTCAGCTCTGTTCG ACTATTGGGGGCAGGGAACCACAGTAACCGTG AGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC

		GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGC AGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGA TATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC CTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTG CTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCC AAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCC CTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAG CGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGC TGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACC TGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCC AGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCT GGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCAC TGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACC AAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTA CTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGT GGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCT GGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGC TGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCT GCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCG CATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGT CTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCAC ACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCT GACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCA GAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
204	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47

213	Chuỗi ổ Fc của phối tử dime (71-248) kháng CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYI MHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQ GRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARG TYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQL VAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGL
214	Chuỗi khóa Fc của phối tử (71-248) monome kháng CD19(8B8-018)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYI MHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQ GRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARG TYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY

		ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
206	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47

7.2 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CD19 (trưởng thành ái lực thu được từ 8B8) và các phân tử đối chứng tương ứng

7.2.1 Tạo ra tác nhân liên kết kháng CD19 trưởng thành ái lực thu được từ 8B8 không có các điểm nóng

7.2.1.1 Chọn lọc kháng thể đặc hiệu CD19 trưởng thành ái lực

Việc khử amit hóa gốc asparagin ở vị trí 27d và 28, nằm trong CDR1 của chuỗi nhẹ của dòng vô tính được biến đổi giống như của người 8B8, dẫn đến sự giảm đáng kể hoạt tính sinh học. Do đó, 2 thư viện biểu hiện thể thực khuẩn được tạo ra trong đó a) cả hai gốc asparagin ở vị trí 27d và 28 đều được loại bỏ và b) các CDR bổ sung của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được sắp xếp ngẫu nhiên để chọn lọc các biến thể 8B8 có ái lực cải thiện.

7.2.1.2 Tạo ra thư viện trưởng thành ái lực 8B8 không có điểm nóng LCDR1

Quy trình tạo ra kháng thể thu được từ 8B8 trưởng thành ái lực mà không có vị trí khử amit hóa N27d và N28, nằm trong LCDR1, được tiến hành bằng cách biểu hiện thể thực khuẩn bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn (Silacci et al, 2005). Trong bước thứ nhất, trình tự ADN của VL và VH của dòng vô tính gốc 8B8 được biến đổi giống như của người (SEQ ID NO: 215 và SEQ ID NO: 216) được tái tạo dòng thuần thành phagemit mà sau đó được sử dụng làm khuôn mẫu để sắp xếp ngẫu nhiên. Trong bước tiếp theo, hai thư viện được tạo ra để chọn lọc các dòng vô tính ưu tiên bằng cách biểu hiện thể thực khuẩn. Để loại bỏ các vị trí điểm nóng nêu trên, đoạn mồi chọn ngẫu nhiên LCDR1 (SEQ ID NO: 217) mà chỉ cho phép các axit amin S T Q E ở vị trí 27d và 28 được sử dụng cho cả hai thư viện. Thư viện trưởng thành 1 được chọn ngẫu nhiên trong CDR1 và 2 của cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong khi thư viện trưởng thành 2 được chọn ngẫu nhiên trong CDR1 và 3 của chuỗi nhẹ và trong CDR3 của chuỗi nặng. Các vị trí được chọn ngẫu nhiên ở các vùng CDR tương ứng được thể hiện trên Fig.31A. Để tạo ra thư viện trưởng thành 1, được chọn ngẫu nhiên trong CDR1 và 2 của cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, ba mảnh được lắp ráp bằng phương pháp PCR "bắt cặp tại vùng gối lên nhau" (SOE) và được tách dòng thành vectơ thể thực khuẩn (Fig.31B). Các tổ hợp đoạn mồi sau được sử dụng để tạo ra các mảnh thư viện: mảnh 1 (LMB3 (SEQ ID NO: 222) và CD19 L1 nghịch ngẫu nhiên (SEQ ID NO: 217), mảnh 2 (CD19 L2 thuận ngẫu nhiên (SEQ ID NO: 218) và CD19 H1 nghịch ngẫu nhiên (SEQ ID NO: 219), và mảnh 3 (CD19 H2 thuận ngẫu nhiên (SEQ ID NO: 220) và CD19 H3 nghịch cố định (SEQ ID NO: 221) (Bảng 53). Sau khi lắp ráp đủ số lượng để mảnh được chọn ngẫu nhiên có độ dài đầy đủ, nó được phân hủy bằng *Nco*I/*Nhe*I cùng với vectơ phagemit của thụ thể được xử lý y hệt. Lượng mol dư gấp 3 lần của cải biến xen vào thư viện được buộc với 10µg vectơ phagemit. Các phần buộc đã tinh chế được sử dụng cho 20 lần biến nạp thu được 2 × 10 mũ 9 thể biến nạp. Các hạt phagemit biểu hiện thư viện trưởng thành ái lực 8B8 được cứu và tinh chế bằng kỹ thuật tinh chế PEG/NaCl cần dùng để chọn lọc.

Quy trình tạo ra thư viện thứ hai, được chọn ngẫu nhiên trong CDR1 và 3 của chuỗi nhẹ và trong CDR3 của chuỗi nặng, được thực hiện tương tự. Các tổ hợp đoạn mồi sau được sử dụng để tạo ra các mảnh thư viện: mảnh 1 (LMB3 (SEQ ID NO: 222) và CD19 L1 nghịch ngẫu nhiên (SEQ ID NO: 217), mảnh 2 (CD19 L1 thuận cố định (SEQ ID NO 223) và CD19 L3 nghịch ngẫu nhiên (SEQ ID NO 224), và mảnh 3 (CD19 L3 thuận

cố định (SEQ ID NO: 225) và CD19 H3 nghịch ngẫu nhiên (SEQ ID NO: 226) (Bảng 54). Sau khi lắp ráp đủ số lượng để mảnh được chọn ngẫu nhiên có độ dài đầy đủ, nó được phân hủy bằng *Nco*I/*Kpn*I cùng với vectơ phagemit của thụ thể được xử lý y hệt. Lượng mol dư gấp 3 lần của cải biến xen vào thư viện được nối với 20ug vectơ phagemit. Các phần nối đã tinh chế được sử dụng cho 40 lần biến nạp thu được 2 × 10 mũ 9 thể biến nạp. Các hạt phagemit biểu hiện thư viện trưởng thành ái lực 8B8 được cứu và tinh chế bằng kỹ thuật tinh chế PEG/NaCl cần dùng để chọn lọc.

Bảng 53: Các đoạn mồi dùng để làm trưởng thành ái lực 8B8 và loại bỏ điểm nóng L1_L2 / H1_H2

SEQ ID	Tên	Trình tự
217	CD19 L1 nghịch ngẫu nhiên	CAG CTG CGG GCT CTG ACC CGG TTT CTG GAG ATA CCA GTT CAG 1 CGT 2 GCC 3 GGA 4 TTC CAG AGA TTG GCT GGA TTT GCA AGA AAT G 1: 40% Y, 6% A/S/T/G/P/D/N/E/Q/V, 2: 40% N, 6% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 3: 25% S/T/Q/E, 4: 25% S/T/Q/E
218	CD19 L2 thuận ngẫu nhiên	CTC CAG AAA CCG GGT CAG AGC CCG CAG CTG CTG ATC TAC 5 GTA TCT 6 CGC 7 8 GGC GTT 9 GAT CGT TTC AGC GGT TCT GGA TCC GGC ACC 5: 30% R, 20% E, 5% A/S/T/Y/G/P/D/N/Q/V. 6: 30% K, 20% S, 5% A/N/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 7: 40% F, 5% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V/I/L, 8: 40% S, 6.6% A/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 9: 50% P, 50% L
219	CD19 H1 nghịch ngẫu nhiên	CAT CCA CTC CAG ACC CTG GCC CGG GGC CTG ACG AAC CCA 10 CAT 11 12 13 14 GAA 15 GTA ACC AGA TGC TTT GCA GCT CAC TTT AAC GGA AGC

		10: 52% H, 4% G/A/S/P/T/N/Y/D/E/Q/V/I,11: 30% I, 15% Y, 5% G/A/S/T/P/N/H/D/E/Q/V,12: 52% Y, 4% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I,13: 30% D, 15% G, 5% A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 14: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 15: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I
220	CD19 H2 thuận ngẫu nhiên	CAG GCC CCG GGC CAG GGT CTG GAG TGG ATG GGC 16 ATT 17 CCA 18 19 20 21 TCC 22 TAT ACC 23 AAA TTC CAG GGC CGC GTC ACG ATG ACC 16: 45% Y, 5% A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 17: 52% N, 4% G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 18: 40% Y, 5% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 19: 30% N, 15% S, 5% G/A/T/P/Y/H/D/E/Q/V/I, 20: 30% D, 15% G, 5% A/S/T/P/Y/N/H/E/Q/V/I, 21: 52% G, 4% N/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 22: 30% K, 15% N, 4% G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 23: 30% E, 15% Q, 5% G/A/S/T/P/Y/N/H/D/V/I
221	CD19 H3 nghịch cố định	CGTCACCGGTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAG
222	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC

Bảng 54: Các đoạn mồi dùng để làm trưởng thành ái lực 8B8 và loại bỏ điểm nóng L1_L3 / H3

SEQ ID	Tên	Trình tự

223	CD19 L1 thuận cố định	TGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAG
217	CD19 L1 nghịch ngẫu nhiên	Xem Bảng 53
224	CD19 L3 nghịch ngẫu nhiên	TTT AAT TTC CAG TTT AGT TCC TTG ACC GAA GGT 24 25 26 27 28 29 CTG CAG ACA ATA GTA GAC GCC AAC GTC TTC AGC 24: 52% Y, 4% G/A/S/T/N/P/D/E/Q/V/L/I, 25: 52% P, 4% G/A/S/T/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 26: 42% V, 10% L, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I, 27: 52% H, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I, 28: 42% T, 10% I, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/L, 29: 45% L, 11% G, 4% A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I
225	CD19 L3 thuận cố định	ACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAAACG
226	CD19 H3 nghịch ngẫu nhiên	TT GGT GCT AGC AGA GCT TAC GGT CAC CGT GGT ACC TTG GCC CCA GTA ATC AAA 30 31 32 33 34 35 36 37 38 GCG TGC ACA ATA GTA AAC AGC GGT GTC 30: 50% L, 3.8% G/A/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 31: 50% A, 4.2% G/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 32: 50% S, 4.2% G/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 33: 50% G, 4.2% S/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 34: 50% Y, 4.2% G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 35: 50% Y, 4.2% G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 36: 50% Y, 4.2%

		G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 37: 50% T, 4.2% G/A/Y/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 38: 50% G, 4.2% Y/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I
222	LMB3	Xem Bảng 53

7.2.1.3 Chọn lọc dòng vô tính thu được từ 8B8 trưởng thành ái lực không có điểm nóng LCDR1 N27d và N28

Để chọn lọc dòng vô tính trưởng thành ái lực không có điểm nóng LCDR1 N27d và N28, hai phương pháp chọn lọc bằng cách biểu hiện thể thực khuẩn được thực hiện:

Trong phương pháp thứ nhất, việc chọn lọc được thực hiện trên protein dung hợp CD19-Fc người sử dụng cả hai thư viện biểu hiện thể thực khuẩn. Các chu kỳ sàng lọc được thực hiện trong dung dịch theo mô hình sau: 1. Gắn kết ~ 10^{12} hạt phagemit với protein CD19-Fc đã được biotinyl hóa 30nM trong 0,5 giờ trong tổng thể tích bằng 1ml, 2. Bắt protein CD19-Fc đã được biotinyl hóa và đặc biệt là các hạt thể thực khuẩn gắn kết bằng cách bổ sung 5,4 × 10^7 hạt từ tính phủ streptavidin trong 10 phút, 3. Rửa các hạt bằng cách sử dụng 5x 1ml PBS/Tween20 và 5x 1ml PBS, 4. Rửa giải các hạt thể thực khuẩn bằng cách bổ sung 1ml TEA 100mM trong 10 phút và trung hòa bằng cách bổ sung 500ul Tris 1M/HCl độ pH = 7,4, 5. Cho lây nhiễm lại vi khuẩn *E. coli* TG1 sinh trưởng theo cấp số mũ, và 6. Cho lây nhiễm thể thực khuẩn trợ giúp VCSM13 và sau đó kết tủa PEG/NaCl cho các hạt phagemit cần sử dụng trong các vòng chọn lọc tiếp đó. Việc chọn lọc được tiến hành trong 3 vòng bằng cách sử dụng các nồng độ kháng nguyên giảm (30x10^{-9}M, 10x10^{-9}M, và 3x10^{-9}M). Trong vòng 2 và 3, việc bắt phức hợp kháng nguyên:thể thực khuẩn được thực hiện bằng cách sử dụng đĩa neutravidin thay vì hạt streptavidin. Đĩa neutravidin được rửa bằng 5x PBS/Tween20 và 5x PBS. Trong vòng 3, đĩa neutravidin được ủ qua đêm trong 2 lít PBS để chọn lọc "tốc độ phân ly" trước khi thể thực khuẩn được rửa giải từ đĩa. Ngoài ra, protein CD19-Fc khỉ đuôi dài được sử dụng trong vòng 2 để làm giàu tác nhân gắn kết phản ứng chéo.

Trong phương pháp chọn lọc thứ hai, việc sàng lọc thể thực khuẩn được thực hiện trên các tế bào biểu hiện thoáng qua ECD CD19 người hoặc khỉ đuôi dài trên bề mặt tế bào. Để chuyển nhiễm tạm thời tế bào HEK, plasmit biểu hiện được tạo ra mang trình tự ADN (từ 5' đến 3') cho các đoạn protein sau: đuôi Flag, đuôi SNAP, CD19 ECD có

nguồn gốc từ người hoặc khỉ đuôi dài, và vùng xuyên màng của thụ thể yếu tố sinh trưởng thu được từ tiểu cầu (PDGFR) (Các trình tự SEQ ID NO: 227 và SEQ ID NO: 228). Sự biểu hiện của các protein tương ứng (Các trình tự SEQ ID NO: 229 và SEQ ID NO: 230) trên bề mặt tế bào được xác nhận bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy bằng cách sử dụng kháng thể kháng Flag để phát hiện. Cả hai thư viện được cho tiếp xúc trong vòng chọn lọc thứ nhất với tế bào biểu hiện thể dung hợp protein chứa ECD CD19 người hoặc khỉ đuôi dài. Đối với các vòng sàng lọc tiếp đó, loài CD19 ECD được thay thế theo đó. Các tế bào đã được chuyển nhiễm tạm thời bằng protein màng không liên quan được sử dụng để làm sạch trước.

Vòng sàng lọc được thực hiện theo mô hình sau:

1. Chuyển nhiễm tế bào HEK bằng các cấu trúc biểu hiện CD19 ECD hoặc protein xuyên màng không thích hợp theo quy trình chuẩn được mô tả ở trên,

2. Ủ các tế bào trong tổng cộng 48 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ với môi trường CO_2 5% 3. Phân lập các tế bào bằng cách ly tâm (3 phút ở tốc độ 2500m/s^2) và tạo lại huyền phù 1×10E^7 tế bào dương tính với CD19 ECD và 1×10E^7 tế bào âm tính trong PBS/5% BSA, một cách tương ứng,

3. Làm sạch trước thể thực khuẩn không đặc hiệu bằng cách ủ thư viện thể thực khuẩn với 1×10^7 tế bào âm tính với CD19 trong 60 phút ở nhiệt độ 4°C bằng cách sử dụng thiết bị xoay ống chuyển động xoay nhẹ nhàng,

4. Ly tâm các tế bào ở tốc độ 2500m/s^2 trong 3 phút và truyền phần dịch nổi trên bề mặt vào ống sạch và bổ sung 1×10E^7 tế bào dương tính với CD19 và ủ trong 60 phút ở nhiệt độ 4°C bằng cách xoay nhẹ trên thiết bị xoay ống,

5. Rửa các tế bào bằng cách ly tâm trong 1 phút ở tốc độ 2500m/s^2, hút phần dịch nổi trên bề mặt ra, và tạo lại huyền phù trong 1ml PBS (8 lần),

6. Rửa giải thể thực khuẩn bằng 1ml TEA 100mM, ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng, và trung hòa chất rửa giải bằng 500ul Tris-HCl 1M, pH = 7,6,

7. Cho lây nhiễm lại vi khuẩn *E. coli* TG1 sinh trưởng theo cấp số mũ, và 8. Cho lây nhiễm thể thực khuẩn trợ giúp VCSM13 và kết tủa PEG/NaCl sau đó của các hạt phagemit cần sử dụng trong các vòng chọn lọc sau đó. Việc chọn lọc được tiến hành trong 3 vòng.

Đối với cả hai phương pháp chọn lọc, các tác nhân gắn kết đặc hiệu được nhận biết bằng ELISA như sau: 100ul protein CD19-Fc đã biotinyl hóa 30nM trong mỗi lỗ được phủ trên đĩa neutravidin. Phần dịch nổi trên bề mặt vi khuẩn chứa Fab được bổ sung và Fab gắn kết được phát hiện thông qua đuôi Flag của chúng bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp kháng Flag/HRP.

Dòng vô tính dương tính với ELISA trên CD19 người tái tổ hợp được thử nghiệm thêm trong quy trình ELISA dựa trên tế bào bằng cách sử dụng các tế bào đã chuyển nhiễm tạm thời bằng plasmit biểu hiện chứa CD19 ECD người (SEQ ID NO: 227). Phân tích này được thực hiện như sau: 48 giờ sau khi chuyển nhiễm, tế bào HEK được thu gom và được ly tâm ở tốc độ 2500m/s^2 trong 5 phút. Sau đó các tế bào này được tạo lại huyền phù trong PBS đá lạnh/BSA 2% đến nồng độ 4 x 10^6 tế bào/mL và được ủ trong 20 phút trên đá để phong bế vị trí không gắn kết đặc hiệu. 4 ×10^5 tế bào trong 100ul được phân bố vào từng lỗ của đĩa 96 lỗ và được ly tâm ở tốc độ 2500m/s^2 và nhiệt độ 4°C trong 3 phút. Phần dịch nổi trên bề mặt được hút ra và 50ul phần dịch nổi trên bề mặt vi khuẩn chứa mảnh Fab hòa tan được pha loãng với 50ul PBS đá lạnh/BSA 2%, được bổ sung vào đĩa, được trộn với các tế bào và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, các tế bào này được rửa 3 lần bằng PBS đá lạnh trước khi 100ul PBS BSA 2% trong mỗi lỗ chứa phần pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 của kháng thể kháng Fab-HRP được bổ sung vào. Sau thời gian ủ là 1 giờ, các tế bào được rửa lại 3 lần bằng PBS đá lạnh. Để nghiên cứu, 100ul cơ chất "ultra TMB-ELISA một bước" được bổ sung và trong mỗi lỗ. Sau thời gian ủ là 10 phút, phần dịch nổi trên bề mặt được chuyển đến đĩa 96 lỗ mới chứa 40ul H_2SO4 1M trong mỗi lỗ và mức hấp thụ được đo ở bước sóng 450nM. Dòng vô tính biểu hiện tín hiệu ý nghĩa trên nền được đưa vào thử nghiệm sàng lọc động học bằng phân tích SPR sử dụng ProteOn XPR36.

7.2.1.4 Nhận biết biến thể thu được từ 8B8 trưởng thành ái lực bằng SPR

Để đặc trưng hơn nữa cho dòng vô tính dương tính với ELISA, tốc độ phân ly được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt và được so sánh với dòng vô tính gốc 8B8 được biến đổi giống như của người.

Đối với thử nghiệm này, 7000RU kháng thể đa dòng Fab kháng người được cố định trên tất cả 6 kênh của chíp GLM bằng cách ghép cặp amin (Naaxetat pH = 4,5, 25µL/phút, 240 giây) (hướng thẳng đứng). Mỗi phần dịch nổi trên bề mặt vi khuẩn chứa

kháng thể được lọc và được pha loãng gấp 2 lần với PBS, và sau đó được bơm trong 360 giây ở 25µL/phút để đạt được mức độ cố định nằm trong khoảng từ 100 đến 400 đơn vị đáp ứng (RU) theo hướng thẳng đứng. Bơm CD19-Fc monome: để đo động học một lần ngắm, hướng bơm được thay đổi sang hướng ngang, dãy pha loãng gấp ba lần của CD19-Fc monome đã được tinh chế (thay đổi nồng độ trong khoảng từ 150 đến 6nM) được bơm đồng thời ở tốc độ 50µL/phút dọc theo các kênh 1-4 riêng rẽ, với thời gian kết hợp là 180 giây, và thời gian phân ly là 300 giây. Mảnh IgG Fc người (150nM) được bơm trong kênh 5 làm đối chứng âm để gắn kết đặc hiệu với CD19-Fc monome. Dung dịch đệm (PBST) được bơm dọc theo kênh thứ sáu để tạo ra khoảng trống "nội tuyến" để đối chiếu. Việc tái tạo được thực hiện bằng hai xung của glyxin 10mM pH = 1,5 và NaOH 50mM trong 30 giây ở tốc độ 90ul/phút (hướng ngang). Hằng số tốc độ phân ly (k_{off}) được tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết langmuir một với một đơn giản trong phần mềm ProteOn Manager v3.1 bằng cách khớp đồng thời các biểu đồ cảm biến. Dòng vô tính biểu hiện Fab có hằng số tốc độ phân ly thấp nhất được nhận biết (Bảng 55). Lưu ý là, hằng số tốc độ phân ly của dòng vô tính 5A07 và 5B08 có thể không được xác định do không đủ khớp. Tuy nhiên, cả hai dòng vô tính này vẫn được chọn do các kết quả thu được cho thấy sự phân ly rất chậm. Các miền biến đổi của phagemit tương ứng được giải trình tự. Quan trọng là, cả hai gốc asparagin trong LCDR1 (vị trí 27d và vị trí 28) đều được thay thế bằng serin hoặc threonin, cho thấy rằng cả hai vị trí khử amit hóa đều được loại bỏ. Quy trình căn thẳng được thể hiện trên Fig.32. Các CDR của dòng vô tính tốt nhất được liệt kê trong Bảng 56 (vùng biến đổi của chuỗi nhẹ) và Bảng 57 (vùng biến đổi của chuỗi nặng) (dòng vô tính 5H09: (SEQ ID NO:231-236); dòng vô tính 7H07: (SEQ ID NO:237-242); dòng vô tính 2B03: (SEQ ID NO: 243-248); dòng vô tính 2B11: (SEQ ID NO:249-254); dòng vô tính 5A07: (SEQ ID NO:255-260); dòng vô tính 5B08: (SEQ ID NO:261-266); dòng vô tính 5D08: (SEQ ID NO:267-272).

Bảng 55: Hằng số phân ly của các dòng vô tính được chọn lọc thu được trong phân tích sàng lọc với phần dịch nổi trên bề mặt vi khuẩn

Dòng vô tính	Hằng số phân ly kd (1/s)
8B8 gốc	3,01E-4

5H09	2,58E-4
7H07	5,75E-5
2B03	3,24E-5
2B11	4,37E-6
5A07	n.d.
5B08	n.d.
5D08	1,95E-4

Bảng 56: Trình tự CDR của chuỗi nhẹ 8B8 được chọn

Dòng vô tính	SEQ ID NO	CDR-L1	SEQ ID NO	CDR-L2	SEQ ID NO	CDR-L3
5H09	231	KSSQSLESSTGNTYLN	232	RVSKRFS	233	LQLIDYPVT
7H07	237	KSSQSLETSTGNTYLN	238	RVSKRFS	239	LQATHIPYT
2B03	243	KSSQSLETSTGNTYLN	244	RVSKRFS	245	LQLTHVPYT
2B11	249	KSSQSLETSTGTTYLN	250	RVSKRFS	251	LQLLEDPYT
5A07	255	KSSQSLETSTGNTYLN	256	RVSKRFS	257	LQPGHYPGT
5B08	261	KSSQSLETSTGNTYLN	262	RVSKRFS	263	LQLDSYPNT

5D08	267	KSSQSLETSTGNTYLN	268	RVSKRFS	269	LQLTHEPYT

Bảng 57: Trình tự CDR của chuỗi nặng 8B8 được chọn

Dòng vô tính	SEQ ID NO	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
5H09	234	DYIMH	235	YINPYNDGSKYTEKFQG	236	GTYYYGSALFDY
7H07	240	DYIMH	241	YINPYNDGSKYTEKFQG	242	GTYYYGSELFDY
2B03	246	DYITH	247	YINPYNDGSKYTEKFQG	248	GTYYYGPDLFDY
2B11	252	DYIMH	253	YINPYNDGSKYTEKFQG	254	GTYYYGPQLFDY
5A07	258	DYIMH	259	YINPYNDGSKYTEKFQG	260	GTYYYGSALFDY
5B08	264	DYIMH	265	YINPYNDGSKYTEKFQG	266	GTYYYGPQLFDY
5D08	270	DYIMH	271	YINPYNDGSKYTEKFQG	272	GTYYYGSELFDY

7.2.2 Đặc trưng hóa kháng thể thu được từ 8B8 trưởng thành ái lực

7.2.2.1 Tách dòng miền kháng thể biến đổi vào các vectơ biểu hiện

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các tác nhân liên kết kháng CD19 đã chọn lọc được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Trong chuỗi nặng, đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế số WO 2012/130831 A1.

Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của IgG kháng CD19 được thể hiện trong Bảng 58 và Bảng 59, một cách tương ứng. Tất cả các trình tự mã hóa kháng thể

được tái tạo dòng thuần thành vectơ biểu hiện mà điều khiển sự phiên mã của cải biến cài xen với gen khởi đầu MPSV khảm và chứa trình tự tín hiệu poly A tổng hợp nằm ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, vectơ này chứa trình tự EBV OriP để duy trì episom của plasmit.

Bảng 58: trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của dòng vô tính kháng CD19 8B8 trong mô hình P329GLALA IgG1 người

SEQ ID NO:	Dòng vô tính và chuỗi	Trình tự
273	8B8 chuỗi nhẹ gốc	GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCA GAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTATTTGAACTGG TACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAACTCCTGATCT ACAGGGTTTCCAAACGATTTTCTGGGGTCCTAGACAGGTT CAGTGGTAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTTCTGCC TACAACTTACACATGTCCCGTACACGTTCGGAGGGGGGAC CAAGCTGGAAATAAAA*CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCT* *TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC* *CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC* *AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC* *TCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC* *TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC* *GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC* *CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT*
274	8B8 chuỗi nặng gốc	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGC CTGGGGCTTCAGTGAAGATGGCCTGCAAGGCTTCTGGATA CACATTCACTGACTATATTATGCACTGGGTGAAGCAGAAG ACTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTT

		ACAATGATGGTTCTAAGTACACTGAGAAGTTCAACGGCAA GGCCACACTGACTTCAGACAAATCTTCCATCACAGCCTAC ATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCT ATTACTGTGCAAGAGGGACCTATTATTATGGTAGCGCCCT CTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCC TCG*GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC* *TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG* *CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG* *GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG* *CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT* *GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG* *CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA* *AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCG* *TGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC* *TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC* *CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC* *CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG* *CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC* *ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC* *TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA* *GCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA* *GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC* *CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTG* *GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG* *AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC* *GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCA* *CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT* *GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA* *AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA*

275	8B8 chuỗi nhẹ gốc	DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLENSNGNTYLNWYL QKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVLDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDLGVYFCLQLTHVPYTFGGGTKLEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C*
276	8B8 chuỗi nặng gốc	EVQLQQSGPELVKPGASVKMACKASGYTFTDYIMHWVKQK TGQGLEWIGYINPYNDGSKYTEKFNGKATLTSDKSSITAYME LSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTLTVSS*AST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*

Bảng 59: trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của dòng vô tính kháng CD19 trưởng thành ái lực trong mô hình P329GLALA IgG1 người

SEQ ID NO:	Dòng vô tính và chuỗi	Trình tự
277	2B11 chuỗi nhẹ	GATATTGTCATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCACCACGTACCTGAACTGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA

		GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGCTGCTGGAAGATCCATACACCTTCGGTCAAGGAACGA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGT
278	2B11 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATA CAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGC GTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACA TGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTA CTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGCTG TTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGCT CTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC

		CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
279	2B11 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCLQLLEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
280	2B11 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV

		KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
281	7H07 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGGCAACCCATATCCCATACACCTTCGGTCAAGGAACTA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGT
282	7H07 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCC CGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATA CAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGC GTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTACA TGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTTTA CTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTTCTGAACTGT TTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGCTC TGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC

		GTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGC GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
283	7H07 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCLQATHIPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
284	7H07 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSELFDYWGQGTTVTVSSA

		STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
285	2B03 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGTTGACCCACGTTCCGTACACCTTCGGTCAAGGAANNA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
286	2B03 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCACGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA

		CATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCAGATC TGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A

287	2B03 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCLQLTHVPYTFGQGXKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
288	2B03 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYITHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPDLFDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
289	5A07 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGCCAGGTCATTACCCAGGTACCTTCGGTCAAGGAACTA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA

		GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
290	5A07 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACTTACTACTACGGTTCCGCCCT CTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGC TCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC

		TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
291	5A07 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCLQPGHYPGTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
292	5A07 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
293	5D08 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG

		CAGCTGACCCATGAACCATACACCTTCGGTCAAGGAACTA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
294	5D08 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTTCTGAAC TGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA

		ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
295	5D08 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCLQLTHEPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
296	5D08 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSELFDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

297	5B08 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAAACCTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGCTGGATTCTTACCCAAACACCTTCGGTCAAGGAACTA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
298	5B08 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTCCACAGC TGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG

		CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
299	5B08 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCLQLDSYPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
300	5B08 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

		SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
301	5H09 chuỗi nhẹ	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAA TCTCTGGAATCTTCCACCGGCAACACGTACCTGAACTGGT ATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTA CCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCA GCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAG CCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTG CAGCTGATCGATTACCCAGTTACCTTCGGTCAAGGAACTA AACTGGAAATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
302	5H09 chuỗi nặng	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAAC CGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTA CACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCC CCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCAT ACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCC GCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATCTCCACCGCGTA CATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTGACGACACCGCTGTT

		TACTATTGTGCACGCGGTACCTACTACTACGGTTCTGCACT GTTTGATTACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAGC TCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAAT GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC GGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
303	5H09 chuỗi nhẹ	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLESSTGNTYLNWYLQ KPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCLQLIDYPVTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT

		EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
304	5H09 chuỗi nặng	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

7.2.2.2 Xác định ái lực của các kháng thể được chọn lọc bằng SPR

Để xác định ái lực chính xác bằng SPR, các kháng thể kháng CD19 đã chọn lọc được sản xuất bằng cách đồng chuyển nhiễm tế bào HEK293-EBNA bằng vectơ biểu hiện của động vật có vú bằng cách sử dụng polyetylenimin. Các tế bào này được chuyển nhiễm bằng các vectơ biểu hiện tương ứng với tỷ lệ 1:1 ("vectơ chuỗi nặng":"vectơ chuỗi nhẹ") theo quy trình chuẩn. 7 ngày sau khi chuyển nhiễm, độ chuẩn kháng thể trong phần dịch nổi trên bề mặt được đo và tất cả các độ chuẩn được cân bằng đến 10µg/mL.

Ái lực (K_D) của kháng thể gốc 8B8 cũng như các dẫn xuất của nó được đo bằng SPR bằng cách sử dụng công cụ ProteOn XPR36 (Biorad) ở nhiệt độ 25°C. 7000RU kháng thể đa dòng Fab kháng người được cố định trên tất cả 6 kênh của chíp GLM bằng cách ghép cặp amin (Naaxetat pH = 4,5, 25ul/phút, 240 giây) (hướng thẳng đứng). Mỗi phần dịch nổi trên bề mặt HEK chứa kháng thể được lọc, được pha loãng với PBST (phosphat 10mM, natri clorua 150mM độ pH = 7,4, Tween 20 0,005%) đến nồng độ bằng 10ug/ml, và sau đó được bơm trong 360 giây ở tốc độ 25µL/phút để đạt được mức cố định nằm trong khoảng từ 500 đến 800 đơn vị đáp ứng (RU) theo hướng thẳng đứng. Bơm CD19-Fc monome: để đo động học một lần ngắm, hướng bơm được thay đổi thành hướng ngang, dãy pha loãng gấp ba lần của CD19-Fc monome đã tinh chế (thay đổi

nồng độ trong khoảng từ 150 đến 6nM) được bơm đồng thời ở tốc độ 50µl/phút dọc theo các kênh 1-4 riêng rẽ, với thời gian kết hợp là 180 giây, và thời gian phân ly là 300 giây. Mảnh IgG Fc người (150nM) được bơm trong kênh 5 làm đối chứng âm để gắn kết đặc hiệu với CD19-Fc monome. Dung dịch đệm (PBST) được bơm dọc theo kênh thứ sáu để tạo ra khoảng trống "nội tuyến" để đối chiếu. Nhận xét tổng quát về các biểu đồ cảm biến tương ứng được thể hiện trên Fig.33. Việc tái tạo được thực hiện bằng hai xung của glyxin 10mM pH = 1,5 và NaOH 50mM trong 30 giây ở tốc độ 90ul/phút (hướng thẳng đứng). Hằng số tốc độ kết hợp (k_{on}) và hằng số tốc độ phân ly (k_{off}) được tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một với một đơn giản trong phần mềm ProteOn Manager v3.1 bằng cách khớp đồng thời các biểu đồ cảm biến kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính là tỷ lệ k_{off}/k_{on}. Tóm tắt về số liệu động học và nhiệt động học được thể hiện trên Bảng 60. Hằng số phân ly của tất cả các dòng vô tính trưởng thành ái lực đều được cải thiện hơn so với dòng vô tính gốc 8B8 của nó.

Bảng 60: Tóm tắt số liệu động học và nhiệt động học đối với tương tác giữa huIgG1 kháng CD19 và CD19 người

Dòng vô tính	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
8B8 gốc	5,66E+4	1,34E-4	2,36E-9
5H09	7,91E+4	1,50E-5	1,89E-10
7H07	7,45E+4	5,57E-5	7,47E-10
2B03	6,02E+4	5,00E-5	8,31E-10
2B11	6,34E+4	3,14E-5	4,95E-10
5A07	6,98E+4	3,07E-5	4,40E-10
5B08	6,81E+4	5,26E-5	7,72E-10

Dòng vô tính	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
5D08	8,88E+4	8,44E-5	9,51E-10

7.2.2.3 Tạo ra và tinh chế IgG1 P329G LALA kháng CD19

Kháng thể kháng CD19 đã chọn lọc được sản xuất bằng cách đồng chuyển nhiễm tế bào HEK293-EBNA bằng vectơ biểu hiện của động vật có vú bằng cách sử dụng polyetylenimin. Các tế bào này được chuyển nhiễm bằng các vectơ biểu hiện tương ứng với tỷ lệ 1:1 ("vectơ chuỗi nặng":"vectơ chuỗi nhẹ").

Để sản xuất trong bình lắc 500mL, 400 triệu tế bào HEK293 EBNA được gieo cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Trước khi chuyển nhiễm, các tế bào này được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 2100m/s^2, và phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện (200µg ADN tổng thể) được trộn trong 20mL môi trường CD CHO. Sau khi bổ sung 540µL PEI, dung dịch này được khuấy xoáy trong 15 giây và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500mL và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ với môi trường khí CO_2 5%. Sau khi ủ, 160mL môi trường F17 được bổ sung vào và các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau khi chuyển nhiễm, axit valproic 1nM và Feed 7% với các thành phần bổ sung được bổ sung vào. Sau khi nuôi cấy trong 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt được gom bằng cách ly tâm trong 15 phút ở tốc độ 2100m/s^2. Dung dịch được lọc vô trùng (thiết bị lọc kích cỡ 0,22µm), được bổ sung natri azit đến nồng độ cuối cùng là 0,01% (trọng lượng/thể tích), và duy trì ở nhiệt độ 4°C.

Việc tinh chế phân tử kháng thể từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được tiến hành bằng phương pháp sắc ký ái lực có sử dụng Protein A như được mô tả ở trên để tinh chế thể dung hợp Fc kháng nguyên. Protein được cô và lọc trước khi nạp lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) đã cân bằng với Histidin 20mM, dung dịch NaCl 140mM có độ pH = 6,0.

Nồng độ protein của các kháng thể đã tinh chế được xác định bằng cách đo OD ở bước sóng 280 nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của các kháng thể được phân tích bằng phương pháp CE-SDS

khi có và không có chất khử (Invitrogen, USA) bằng cách sử dụng LabChipGXII (Caliper). Hàm lượng kết tụ của các mẫu kháng thể được phân tích bằng cách sử dụng cột phân tích loại trừ theo kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) đã được cân bằng trong K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125mM, L-Arginin Monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), dung dịch đệm vận hành độ pH = 6,7 ở nhiệt độ 25°C (Bảng 61).

Bảng 61: Phân tích sinh hóa dòng vô tính P329G LALA IgG1 kháng CD19

Dòng vô tính	Hiệu suất [mg/l]	Monome [%]	CE-SDS (không phải màu đỏ)
8B8 gốc	25,3	100	99,1
2B11	35,4	100	98,4
7H07	89,8	100	99,4
2B03	182	100	100
5A07	90,2	100	99,4
5D08	90,2	100	99,3
5B08	24,1	99,6	100
5H09	29,9	100	98,1

Để tạo ra cấu trúc hai đặc hiệu, dòng vô tính 2B11 được chọn do nó thiếu ba điểm nóng khử amit hóa.

Phần mã hóa trình tự ADN của miền ngoài (axit amin 71-254 và 71-248) của phối tử 4-1BB người được tổng hợp theo trình tự P41273 trên cơ sở dữ liệu Uniprot.

7.2.3 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB trime (71-254) hướng đích CD19 (8B8-2B11) hóa trị một với miền CH1-CL lai có các gốc mang điện (Cấu trúc 4.1)

Cấu trúc 4.1 được tạo ra như được mô tả đối với cấu trúc 3.1 (Fig.30), nhưng sử dụng vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-2B11.

Bảng 62 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một có CH-CL lai và các gốc mang điện (cấu trúc 4.1).

Bảng 62: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 4.1). * đối với gốc mang điện

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
129	Trình tự nucleotit Hu 4-1BBL dime (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3
130	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL monome (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
305	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTA AAAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTG CAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATAT CATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGG GTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACA

	2B11)	ACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAG GGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATC TCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTGCGT TCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGC GGTACCTACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGAT TACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCC CCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCG GCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACA GCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC CCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCC TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTC TCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC

		TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT CTCCCTGTCTCCGGGTAAA
277	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 59
115	Hu 4-1BBL dime (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3
116	hu 4-1BBL Monome (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
306	Chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYI MHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQ GRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARG TYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG

		SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
206	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-2b11)	Xem Bảng 59

7.2.4 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB trime (71-254) hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một với miền CH1-CL lai không có gốc mang điện (Cấu trúc 4.2)

Cấu trúc 4.2 được tạo ra như được mô tả đối với cấu trúc 3.2 (Fig.30), nhưng sử dụng vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-2B11.

Bảng 63 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (cấu trúc 4.2).

Bảng 63: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (cấu trúc 4.2).

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
165	Trình tự nucleotit phối tử dime (71-254)– Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 22
166	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL monome (71-254) – CH1	Xem Bảng 22
305	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 62
277	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 59
117	Phối tử dime (71-254) - Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 22
118	Phối tử monome (71-254) -CH1	Xem Bảng 22
306	Chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 62
279	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 59

7.2.5 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB trime (71-254) hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị hai (Cấu trúc 4.3)

Cấu trúc 4.3 được tạo ra như được mô tả đối với cấu trúc 3.3 (Fig.30), nhưng sử dụng vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-2B11.

Bảng 64 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19 (8B8-2B11) hóa trị hai (cấu trúc 4.3).

Bảng 64: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) PGLALA của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị hai (cấu trúc 4.3)

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
307	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc của phối tử dime kháng CD19(8B8-2B11)	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTA AAAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTG CAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATAT CATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGG GTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACA ACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAG GGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATC TCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTGCGT TCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGC GGTACCTACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGAT TACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCC* *CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGC* *ACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT* *TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGG* *AGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCC* *GTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCA* *GCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCAC* *CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCA* *GCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAA* *GAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGC* *CCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT* *TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG* *ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG* *TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT* *CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT*

		GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
		GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
		GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
		TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCA
		TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
		CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCC
		CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCT
		CGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
		GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
		AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
		CGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACC
		GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
		TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
		CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
		GTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCA
		GAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGC
		TGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCT
		CAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATG
		GCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGC
		TGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAA
		GAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCG
		GCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGG
		AGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGT
		CTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGC
		TGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGAT
		CTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCG
		CATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCT
		GCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAG
		AGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACA
		GGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACC
		CCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAA
		GCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAT

		CTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGATCC AGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTC GCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTG ACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCT GGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTAC AAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGC TGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGA GGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTG TGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCT GCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGG ACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACAG CGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTG AGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATA CTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGAC TCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTG ACACCTGAGATCCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTA GATCAGAA
308	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc của phối tử monome kháng CD19(8B8-2B11)	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTA AAAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTG CAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATAT CATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGG GTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACA ACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAG GGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATC TCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTGCGT TCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGC GGTACCTACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGAT TACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT*

		CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC
		GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG
		TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
		GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC
		AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
		AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC
		TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
		CACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT
		CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT
		CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGA
		CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
		TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
		AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
		GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
		CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
		AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA
		GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
		GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAG
		ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTG
		TCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCC
		GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACA
		ACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGA
		CGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGG
		ACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG
		CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC
		TACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCG
		GAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAG
		AGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG
		ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAG
		CTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCC
		CCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGG
		CGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG

		GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCG TGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGA GTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTC TGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGC TGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTG CCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCAT TTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGC CGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAG GCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGG GCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCC CGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGC GAA
277	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 59
309	Chuỗi ổ Fc của phối tử dime kháng CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYI MHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQ GRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARG TYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV*

		YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
310	Chuỗi khóa Fc của phối tử monome kháng CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYI MHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQ GRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARG TYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSE*
279	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 59

7.2.6 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một với miền CH1-CL lai có các gốc mang điện (Cấu trúc 4.4)

Cấu trúc 4.4 được tạo ra như được mô tả đối với cấu trúc 3.4 (Fig.30), nhưng sử dụng vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-2B11.

Bảng 65 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một có CH-CL lai và các gốc mang điện (cấu trúc 4.4).

Bảng 65: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc)kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 4.4). * các gốc mang điện

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
169	Trình tự nucleotit phối tử dime (71-248) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 24
170	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL monome (71-248) – CH1*	Xem Bảng 24
305	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 62
277	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 59
119	Phối tử dime (71-248) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 24
120	Phối tử monome (71-248)-CH1*	Xem Bảng 24
306	Chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 62
279	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 59

7.2.7 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một với miền CH1-CL lai không có gốc mang điện (Cấu trúc 4.5)

Cấu trúc 4.5 được tạo ra như được mô tả đối với cấu trúc 3.5 (Fig.30), nhưng sử dụng vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-2B11.

Bảng 66 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (Cấu trúc 4.5).

Bảng 66: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc)kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (Cấu trúc 4.5).

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
171	Trình tự nucleotit phối tử dime (71-248) – Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 25
172	Trình tự nucleotit phối tử monome (71-248)-CH1	Xem Bảng 25
305	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 62
277	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 59
173	Phối tử dime (71-248) – Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 25
174	Phối tử monome (71-248)-CH1	Xem Bảng 25
306	Chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 62
279	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 59

7.2.8 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị hai (Cấu trúc 4.6)

Cấu trúc 4.6 được tạo ra như được mô tả đối với cấu trúc 3.6 (Fig.30), nhưng sử dụng vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CD19, dòng vô tính 8B8-2B11.

Bảng 67 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị hai (cấu trúc 3.6).

Bảng 67: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị hai (cấu trúc 4.6)

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
311	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc của phối tử dime (71-248) kháng CD19(8B8-2B11)	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTA AAAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTG CAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATAT CATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGG GTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACA ACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAG GGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATC TCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTGCGT TCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGC GGTACCTACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGAT TACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCC* *CTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGC* *ACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT* *TCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGG* *AGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCC* *GTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCA* *GCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCAC* *CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCA* *GCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAA* *GAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGC* *CCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCT* *TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG* *ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG* *TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT* *CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT*

		GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
		GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT
		GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
		TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCA
		TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC
		CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCC
		CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCT
		CGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
		GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
		AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
		CGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACC
		GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
		TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
		CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
		GTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCA
		GAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGC
		CGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCC
		CAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATG
		GCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGC
		TGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAA
		GAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCG
		GCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGG
		AGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGT
		CTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCT
		GCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATC
		TGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGC
		ATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTG
		CCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGA
		GGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAG
		GGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCC
		CCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGAT
		CTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCT

		GTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTG AGACAGGGCATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGA ATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTAC TCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTG GGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTG GTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTT TCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGA GGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTG CAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCAC TGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTC CGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGA CGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGG GAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCA TGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTG GGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCG GGCTC
312	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc của phối tử (71-248) monome kháng CD19(8B8-2B11)	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTA AAAAAACCGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTG CAAAGCATCTGGTTACACCTTCACTGACTATAT CATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAGG GTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACA ACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAATTCCAG GGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTATC TCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTGCGT TCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGC GGTACCTACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGAT TACTGGGGCCAAGGTACCACGGTGACCGTAAG CTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC*

		GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG
		TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
		GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC
		AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
		AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC
		TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
		CACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT
		CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT
		CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGA
		CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
		TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
		AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
		GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
		CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
		AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGA
		GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
		GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAG
		ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTG
		TCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCC
		GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACA
		ACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGA
		CGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGG
		ACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG
		CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC
		TACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCG
		GAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAG
		AGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGG
		ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAG
		CTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCC
		CCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGG
		CGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG
		GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCG

		TGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGA GTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTC TGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCT GGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGC CTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATT TGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCC GGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGG CCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGG CGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCC GAGATTCCTGCCGGGCTC
277	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-2B11)	Xem Bảng 59
313	Chuỗi ổ Fc của phối tử dime (71-248) kháng CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYI MHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQ GRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARG TYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA*

		ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQL VAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTK ELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGL
314	Chuỗi khóa Fc của phối tử (71-248) monome kháng CD19(8B8-2B11)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYI MHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQ GRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARG TYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSS*ASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL*
279	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 59

7.3 Tạo ra thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách và không hướng đích và IgG người làm phân tử đối chứng

7.3.1 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB người không được hướng đích (phân tử đối chứng)

Các phân tử đối chứng này được tạo ra như được mô tả ở trên đối với cấu trúc hướng đích CD19 3.1 (gọi là đối chứng B), 3.3 (gọi là đối chứng C), 3.4 (gọi là đối chứng D) và 3.5 (gọi là đối chứng E) với khác biệt duy nhất là chất gắn kết kháng CD19 (VH-VL) được thay thế bằng đối chứng dòng mầm, gọi là DP47, không gắn kết với kháng nguyên (xem Fig.30).

Bảng 68 thể hiện, một cách tương ứng, trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện, đối chứng B.

Bảng 69 thể hiện, một cách tương ứng, trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kịh) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị hai, đối chứng C.

Bảng 70 thể hiện, một cách tương ứng, trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện, đối chứng D.

Bảng 71 thể hiện, một cách tương ứng, trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một không có gốc mang điện trong CH-CL lai, đối chứng E.

Bảng 68: trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một với CH-CL lai và có các gốc mang điện (đối chứng B). * các gốc mang điện

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
96	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL dime (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3

97	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL monome (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
79	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc DP47	Xem Bảng 18
80	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18
98	Hu 4-1BBL dime (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3
99	hu 4-1BBL Monome (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
81	Chuỗi ổ Fc DP47	Xem Bảng 18
82	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18

Bảng 69: trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị hai (đối chứng C).

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
177	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc DP47 được dung hợp với hu 4-1BBL dime (71-254)	Xem Bảng 27
178	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc DP47 được dung hợp với hu 4-1BBL monome (71-254)	Xem Bảng 27
80	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18

179	Chuỗi ổ Fc DP47 được dung hợp với hu 4-1BBL dime (71-254)	Xem Bảng 27
180	Chuỗi khóa Fc DP47 được dung hợp với hu 4-1BBL monome (71-254)	Xem Bảng 27
82	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18

Bảng 70: trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-248) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một với CH-CL lai và có các gốc mang điện (đối chứng D). * các gốc mang điện

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
169	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL dime (71-248) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 24
170	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL monome (71-248) – CH1*	Xem Bảng 24
79	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc DP47	Xem Bảng 18
80	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18
119	Hu 4-1BBL dime (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 24
120	hu 4-1BBL Monome (71-254) – CH1*	Xem Bảng 24
81	Chuỗi ổ Fc DP47	Xem Bảng 18
82	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18

Bảng 71: trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-248) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một với CH-CL lai và không có gốc mang điện (đối chứng E).

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
171	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL dime (71-248) – Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 25
172	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL monome (71-248) – CH1	Xem Bảng 25
79	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc DP47	Xem Bảng 18
80	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18
173	Hu 4-1BBL dime (71-248) – Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 25
174	hu 4-1BBL Monome (71-248) – CH1	Xem Bảng 25
81	Chuỗi ổ Fc DP47	Xem Bảng 18
82	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18

7.3.2 Các kháng thể làm phân tử đối chứng

Hai IgG1 người đối chứng chứa PGLALA được tạo ra.

Bảng 72 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của huIgG1 PGLALA kháng CD19 (dòng vô tính 8B8-018), tức là đối chứng G.

Bảng 73 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của đối chứng dòng mầm DP47 huIgG1 PGLALA (đối chứng F).

Bảng 72: trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của huIgG1 PGLALA kháng CD19(8B8-018) (đối chứng G)

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
315	Trình tự nucleotit chuỗi nặng CD19(8B8-018) (huIgG1 PGLALA)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCC GAGGTCAAGAAACCCGGGGCTTCTGTG AAGGTTTCATGCAAGGCAAGCGGATAC ACCTTCACCGACTATATCATGCATTGG GTCAGGCAGGCCCCTGGCCAAGGTCTC GAATGGATGGGCTACATTAACCCATAT AATGATGGCTCCAAATACACCGAGAAG TTTCAGGGAAGAGTCACTATGACATCT GACACCAGTATCAGCACTGCTTACATG GAGCTGTCCCGCCTTCGGTCTGATGAC ACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGC ACATATTACTACGGCTCAGCTCTGTTCG ACTATTGGGGGCAGGGAACCACAGTAA CCGTGAGCTCCGCAAGTACTAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAAGCAGCTGGGGGACCGTCAGT

		CTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGG GCAAA
204	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47
316	Chuỗi nặng CD19(8B8-018) (huIgG1 PGLALA)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPY NDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST

		SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
206	Chuỗi nhẹ CD19(8B8-018)	Xem Bảng 47

Bảng 73: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của đối chứng dòng mầm DP47 huIgG1 PGLALA (đối chứng F)

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
181	Trình tự nucleotit chuỗi nặng DP47 (hu IgG1 PGLALA)	Xem Bảng 29
80	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18
182	Chuỗi nặng DP47 (hu IgG1 PGLALA)	Xem Bảng 29
82	Chuỗi nhẹ DP47	Xem Bảng 18

7.4 Sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CD19 và các phân tử đối chứng của chúng

Các trình tự mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích và không hướng đích được tái tạo dòng thuần thành vectơ plasmit mà điều khiển sự biểu hiện của cải biến cài xen từ gen khởi đầu MPSV và chứa trình tự polyA tổng hợp nằm ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, vectơ này chứa trình tự EBV OriP để duy trì episom của plasmit.

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách được sản xuất bằng cách đồng chuyển nhiễm các tế bào HEK293-EBNA bằng vectơ biểu hiện ở động vật có vú sử dụng polyetylenimin. Các tế bào này được chuyển nhiễm bằng các vectơ biểu hiện tương ứng. Đối với các biến thể 1,2,4,5 và đối chứng B, D và E của nó, với tỷ lệ 1:1:1:1 ("vectơ phối tử dime -CL- chuỗi khóa": "vectơ thể dung hợp phối tử monome-CH1":"vectơ Fab kháng CD19-chuỗi ổ":"vectơ chuỗi nhẹ kháng CD19"). Đối với biến thể 3, 6 và đối chứng C của nó, với tỷ lệ 1:1:1 ("vectơ chuỗi ổ Fc phối tử dime huIgG1":"vectơ chuỗi khóa Fc phối tử monome huIgG1":"vectơ chuỗi nhẹ kháng CD19"). IgG người, được sử dụng làm đối chứng trong thử nghiệm, được sản xuất như đối với cấu trúc hai đặc hiệu (để chuyển nhiễm, chỉ có vectơ cho chuỗi nhẹ và vectơ cho chuỗi nặng được sử dụng với tỷ lệ 1:1).

Để sản xuất trong bình lắc 500mL, 300 triệu tế bào HEK293 EBNA được gieo cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, các tế bào được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 2100m/s^2, và phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20mL môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện (200µg ADN tổng thể) được khuấy xoáy trong 20mL môi trường CD CHO. Sau khi bổ sung 540µL PEI vào, dung dịch này được khuấy trong 15 giây và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào này được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500mL và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ với môi trường khí CO_2 5%. Sau khi ủ, 160mL môi trường Excell đã bổ sung L-Glutamin 6mM, PEPSOY 5g/L và axit valproic 1,2mM được bổ sung vào và các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau chuyển nhiễm, Feed 12% (axit amin và glucoza) được bổ sung vào. Sau khi nuôi cấy trong 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt được gom bằng cách ly tâm trong 30-40 phút ở tốc độ ít nhất là 4000m/s^2. Dung dịch được lọc vô trùng (thiết bị lọc kích cỡ 0,22µm), được bổ sung natri azit đến nồng độ cuối cùng là 0,01% (trọng lượng/thể tích), và duy trì ở nhiệt độ 4°C.

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách, cũng như IgG, được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào bằng phương pháp sắc ký ái lực có sử dụng Protein A, sau đó đến phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Đối với phương pháp sắc ký ái lực, phần dịch nổi trên bề mặt được nạp lên trên cột MabSelect Sure (CV = 5-15mL, nhựa từ GE Healthcare) đã cân bằng với natri phosphat (20mM), dung dịch đệm natri sitrat (20mM) (độ pH = 7,5). Protein không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa với ít nhất 6 thể tích cột của cùng một dung dịch đệm. Protein gắn kết được rửa giải bằng cách sử dụng gradien tuyến tính (20 CV) hoặc bước rửa giải (8 CV) bằng natri xitrat 20mM, natri clorua 100mM, dung dịch đệm glyxin 100mM (độ pH = 3,0). Đối với gradien tuyến tính, bước rửa giải 4 thể tích cột bổ sung được áp dụng.

Độ pH của các đoạn đã gom được điều chỉnh bằng cách bổ sung 1/10 (thể tích/thể tích) của natri phosphat 0,5M, độ pH = 8,0. Protein được cô trước khi nạp lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) đã cân bằng với Histidin 20mM, natri clorua 140mM, dung dịch Tween20 0,01% (thể tích/thể tích) có độ pH = 6,0.

Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang học (OD) ở bước sóng 280nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime được hướng đích được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE khi có và không có chất khử (1,4-dithiotreitol 5mM) và nhuộm bằng Coomassie SimpleBlue™ SafeStain (Invitrogen USA). Hàm lượng kết tụ của các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng cột phân tích loại trừ theo kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) đã cân bằng trong K_2HPO_4 25mM, NaCl 125mM, L-arginin monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), dung dịch đệm vận hành độ pH = 6,7 ở nhiệt độ 25°C.

Bảng 74 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của phân tử kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CD19.

Bảng 74: Phân tích sinh hóa của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CD19

Cấu trúc	Monome [%] (giây)	Hiệu suất [mg/l]
Thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 3.1)	98	8,6
Thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị hai (cấu trúc 3.3)	100	11,3
Thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 3.4)	99	11,5
Thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (cấu trúc 3.5)	97	13,3
Thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị hai (cấu trúc 3.6)	96	19,9
Thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-2B11) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện	99,2	21,2

(cấu trúc 4.4)		

Bảng 75 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách không hướng đích DP47, cả hóa trị một (đối chứng B, D và E) và hóa trị hai (đối chứng C).

Bảng 75: Phân tích sinh hóa của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách không hướng đích DP47

Cấu trúc	Monome [%] (giây)	Hiệu suất [mg/l]
Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một (đối chứng B)	99	15,4
Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị hai (đối chứng C)	98	12,6
Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một (đối chứng D)	99,5	25,9
Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một (đối chứng E)	93,3	4,1

Bảng 76 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của kháng CD19 (8B8-018) và dòng mầm DP47 IgG1 PGLALA người (đối chứng F).

Bảng 76: Phân tích sinh hóa của đối chứng IgG1 PGLALA người

Cấu trúc	Monome [%] (giây)	Hiệu suất [mg/l]
huIgG1 PGLALA kháng CD19(8B8-018)	100	36,6
Dòng mầm DP47 IgG1 PGLALA người	100	50

Ví dụ 8

Đặc trưng hóa chức năng cho phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CD19

8.1. Cộng hưởng plasmon bề mặt (ái lực)

Sự gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CD19 (các cấu trúc 3.4 và 3.6) với 4-1BB Fc(kih) tái tổ hợp và CD19 được đánh giá bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Tất cả các thử nghiệm SPR được thực hiện trên Biacore T200 ở nhiệt độ 25°C với HBS-EP làm dung dịch đệm vận hành (HEPES 0,01M độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%, Biacore, Freiburg/Đức).

Tương tác với 4-1BB người và khỉ đuôi dài

Kháng thể kháng Fab người (Biacore, Freiburg/Đức) được ghép cặp trực tiếp trên chíp CM5 ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin tiêu chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). Mức độ cố định là khoảng 8000RU. Các thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CD19 được bắt trong 60 giây ở 2 và 5nM (đối chứng D cũng được bơm). 4-1BB avi His người hoặc khỉ đuôi dài tái tổ hợp được cho đi qua tế bào chảy ở nồng độ nằm trong khoảng từ 2,7 đến 2000 nM (pha loãng gấp 3 lần) với tốc độ dòng chảy là 30µL/phút trong 120 giây. Sự phân ly được theo dõi trong 180 giây. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi đáp ứng thu được trên

tế bào chảy đối chiếu. Ở đây, kháng nguyên được để trôi trên bề mặt với kháng thể kháng Fab người cố định nhưng trên đó bơm HBS-EP chứ không phải kháng thể này.

Tương tác với CD19 người

Kháng thể Fab kháng người (Biacore, Freiburg/Đức) được ghép cặp trực tiếp trên chíp CM5 ở độ pH = 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin tiêu chuẩn (Biacore, Freiburg/Đức). Mức độ cố định là khoảng 8000RU. Thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CD19, hoặc kháng thể đối chứng (huIgG1 PGLALA kháng CD19(8B8-018)) được bắt trong 60 giây ở 20nM. CD19-Fc(kih) người tái tổ hợp được cho đi qua tế bào chảy ở nồng độ nằm trong khoảng từ 7,8 đến 500nM (pha loãng gấp 2 lần) với tốc độ dòng chảy bằng 30µL/phút trong 120 giây. Sự phân ly được theo dõi trong 120/1800 giây. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi đáp ứng thu được trên tế bào chảy đối chiếu. Ở đây, kháng nguyên được để trôi trên bề mặt với kháng thể kháng Fab người cố định nhưng trên đó bơm HBS-EP thay vì kháng thể này.

Hằng số động học thu được bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 (vAA, Biacore AB, Uppsala/Thụy Điển), để khớp các đẳng thức tốc độ dùng cho mô hình gắn kết Langmuir 1:1 bằng cách tích phân số.

Các cấu trúc hai đặc hiệu 3.4, 3.6 và đối chứng D gắn kết một cách tương tự với 4-1BB. Bảng 77 thể hiện giá trị trung bình với chênh lệch chuẩn (trong ngoặc đơn) từ hai thử nghiệm (sử dụng dung dịch bắt cấu trúc ở 2nM hoặc 5nM). Các cấu trúc hai đặc hiệu 3.4 và 3.6 gắn kết CD19 người với ái lực tương tự như IgG. Hằng số ái lực cho tương tác này được xác định bằng cách khớp với mô hình gắn kết Langmuir 1:1. Đối với các phép đo với hu4-1BB và cy4-1BB, giá trị trung bình và chênh lệch chuẩn (trong ngoặc đơn) được thể hiện (hai thử nghiệm với dung dịch bắt 2 hoặc 5nM).

Bảng 77: sự gắn kết của thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CD19 với (hu) 4-1BB người tái tổ hợp, (cy) 4-1BB khỉ đuôi dài tái tổ hợp và (hu) CD19 người tái tổ hợp.

	Kháng nguyên	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 3.4)	hu 4-1BB	7,2E+04 *(5,9E+03)*	2,5E-02 *(1,0E-05)*	3,4E-07 *(2,8E-08)*
	cy 4-1BB	1,2E+05 *(8,6E+03)*	1,3E-02 *(1,8E-04)*	1,1E-07 *(9,9E-09)*
	hu CD19	2,77E+04	2,67E-04	9,64E-09
Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CD19(8B8-018) hóa trị hai (cấu trúc 3.6)	hu 4-1BB	6,9E+04 *(1,7E+03)*	2,4E-02 *(1,5E-04)*	3,5E-07 *(1,1E-08)*
	cy 4-1BB	1,1E+05 *(7,7E+03)*	1,4E-02 *(3,1E-04)*	1,3E-07 *(1,3E-08)*
	hu CD19	2,55E+04	2,69E-04	1,06E-08
Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-248) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một với CH-CL lai và có các gốc mang điện (đối chứng D)	hu 4-1BB	7,3E+04 *(3,9E+03)*	2,6E-02 *(6,3E-04)*	3,5E-07 *(1,0E-08)*
	cy 4-1BB	1,2E+05 *(1,9E+03)*	1,4E-02 *(1,0E-04)*	1,2E-07 *(2,9E-09)*
huIgG1 PGLALA kháng CD19(8B8-018)	hu CD19	2,12E+04	2,61E-04	1,23E-08

8.2. Cộng hưởng plasmon bề mặt (gắn kết đồng thời)

Khả năng gắn kết đồng thời 4-1BB Fc(kih) người và CD19 người được đánh giá bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Tất cả các thử nghiệm SPR đều được thực hiện trên Biacore T200 ở nhiệt độ 25°C với HBS-EP làm dung dịch đệm vận hành (HEPES 0,01M độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%, Biacore, Freiburg/Đức). 4-1BB Fc(kih) người đã biotinyl hóa được ghép cặp trực tiếp với tế bào chảy của chíp cảm biến streptavidin (SA). Mức độ cố định tối đa 250 đơn vị cộng hưởng (RU) được sử dụng.

Cấu trúc 4-1BB chia tách trime được hướng đích CD19 (các cấu trúc 3.1, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 4.4) được cho đi qua tế bào chảy ở khoảng nồng độ bằng 200nM với tốc độ dòng chảy 30µL/phút trong 90 giây và sự phân ly được thiết lập đến không giây. CD19 người được bơm dưới dạng chất phân tích thứ hai với tốc độ dòng chảy bằng 30µL/phút thông qua tế bào chảy trong 90 giây ở nồng độ bằng 500nM (Fig.34A). Sự phân ly được theo dõi trong 120 giây. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi đáp ứng thu được trong tế bào chảy đối chiếu, trong đó không có protein nào được cố định.

Như có thể quan sát trong các biểu đồ trên Fig.35, tất cả các cấu trúc hai đặc hiệu có thể gắn kết đồng thời 4-1BB người và CD19 người.

Ví dụ 9

Đặc trưng hóa chức năng cho phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CD-19

9.1. Gắn kết trên PBMC người đã được hoạt hóa của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CD19

Để xác định khả năng gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime 4-1BBL với PBMC người, các nồng độ đã chuẩn độ khác nhau của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime 4-1BBL hướng đích CD19 được sử dụng trong thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 5.2.

Các hình vẽ Fig.36A và Fig.36B thể hiện khả năng gắn kết của các cấu trúc 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 và 3.6 như được tạo ra trong Ví dụ 7 trên tế bào T CD4+ và tế bào T CD8+ biểu hiện 4-1BB đã được hoạt hóa, một cách tương ứng. Các cổng được thiết lập trên tế

bào T CD4+ CD3+ CD45+ hoặc tế bào T CD8+ CD3+ CD45+ còn sống và MFI của mảnh F(ab`)2 dê đặc hiệu với mảnh Fcγ IgG kháng IgG người tinh khiết ái lực liên hợp PE được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ đã chuẩn độ của biến thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách được hướng đích. Bảng 78 thể hiện các giá trị EC_{50} như được đo đối với các cấu trúc 3.1, 3.3. 3.4, 3.5 và 3.6 và các phân tử đối chứng.

Bảng 78: Gắn kết trên tế bào T CD4+ và tế bào T CD8+ biểu hiện 4-1BB đã được hoạt hóa

Cấu trúc	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD8$^+$	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD4$^+$
Đối chứng B	0,05	0,26
Đối chứng C	0,02	0,30
Đối chứng D	0,04	0,28
Đối chứng E	0,13	1,22
3.1	0,03	0,28
3.3	0,01	0,29
3.4	0,15	2,04
3.5	0,04	1,03
3.6	0,05	0,21

9.2 Gắn kết với tế bào khối u biểu hiện CD19

Đối với các thử nghiệm gắn kết trên tế bào khối u biểu hiện CD19, các dòng tế bào u lympho biểu hiện CD19 người sau được sử dụng: dòng tế bào SU-DHL-8 (DSMZ ACC573) u lympho tế bào B không phải Hodgkin lớn lan tỏa (B-NHL), dòng tế bào Nalm6 (DSMZ ACC-128) bệnh bạch cầu dạng lympho tiền chất tế bào B cấp tính, dòng tế bào Toledo (ATCC CRL-2631) u lympho nguyên bào lympho tế bào lớn tan tỏa và dòng tế bào OCI-Ly18 (DSMZ ACC-699) u lympho tế bào B lớn lan tỏa. Các thử

nghiệm được thực hiện như được mô tả đối với dòng tế bào khối u MV-3 và WM-266-4 biểu hiện FAP trong Ví dụ 5.3.

Các cổng được thiết lập trên tế bào khối u còn sống và MFI của mảnh F(ab`)2 dê đặc hiệu với mảnh Fcγ IgG kháng IGg người tinh khiết ái lực liên hợp PE được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ đã chuẩn độ của cấu trúc dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách được hướng đích.

Fig.37A thể hiện khả năng gắn kết của các cấu trúc 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 và 3.6 như được tạo ra trong Ví dụ 7.1 với dòng tế bào SU-DHL-8 u lympho tế bào B không phải Hodgkin lớn lan tỏa (B-NHL) và trên Fig.37B là khả năng gắn kết của các cấu trúc 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 và 3.6 với dòng tế bào Nalm6 bệnh bạch cầu dạng lympho tiền chất tế bào B cấp tính được thể hiện. Fig.37C thể hiện khả năng gắn kết của các cấu trúc 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 và 3.6 với dòng tế bào Toledo u lympho nguyên bào lympho tế bào lớn tan tỏa và Fig.37D thể hiện khả năng gắn kết của các cấu trúc 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 và 3.6 với dòng tế bào OCI-Ly18 của u lympho tế bào B lớn lan tỏa. Bảng 79 thể hiện các giá trị EC_{50} như được đo đối với các cấu trúc 3.1, 3.3, 3.4, 3.5 và 3.6 và các phân tử đối chứng.

Bảng 79: Gắn kết với tế bào khối u biểu hiện CD19

Cấu trúc	EC_{50} [nM] SU-DHL-8	EC_{50} [nM] Nalm6	EC_{50} [nM] Toledo	EC_{50} [nM] OCI-Ly18
3.1	0,64	0,43	0,29	0,29
3.3	0,15	0,14	0,10	0,09
3.4	0,31	0,39	0,29	0,26
3,5	0,54	0,43	0,27	0,31
3.6	0,14	0,12	0,09	0,10
Đối chứng G	0,09	0,10	0,06	0,07

Ví dụ 10

Hoạt tính sinh học của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CD19

10.1. Sự hoạt hóa NF-κB trong tế bào HeLa biểu hiện 4-1BB người

Tế bào HeLa biểu hiện 4-1BB người và NF-κB-luciferaza được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 6.1.

Sự hoạt hóa NF-κB trong các tế bào HeLa biểu hiện 4-1BB người được nuôi cấy đồng thời với tế bào khối u biểu hiện CD19

Tế bào Hela 4-1BB NF-κB-luciferaza ở người được thu gom và được tạo lại huyền phù trong môi trường DMEM đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích) và GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích) đến nồng độ bằng 0,2 x 10^6 tế bào/mL. 100µL (2 x 10^4 tế bào) của huyền phù tế bào này được chuyển vào từng lỗ của đĩa nuôi cấy mô đáy phẳng màu trắng vô trùng có 96 lỗ có nắp (greiner bio-one, Cat. No. 655083) và đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5% qua đêm. Ngày tiếp theo, 50µL môi trường chứa nồng độ đã chuẩn độ của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CD19 (trime 4-1BBL đã chia tách CD19) hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB không được hướng đích DP47 (trime 4-1BBL đã chia tách DP47) được bổ sung vào. Dòng tế bào u lympho tế bào B biểu hiện CD19 (dòng tế bào SU-DHL-8 u lympho tế bào B không phải Hodgkin lớn lan tỏa (B-NHL) (DSMZ ACC573) và dòng tế bào Pfeiffer u lympho tế bào B không phải Hodgkin ở người (ATCC CRL-2632)) được tạo lại huyền phù trong môi trường DMEM đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích) và GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích) đến nồng độ bằng 2 x 10^6 tế bào/mL.

Huyền phù chứa tế bào u lympho tế bào B biểu hiện CD19 (50µL, tỷ lệ cuối cùng 1:5) hoặc chỉ có môi trường được bổ sung vào từng lỗ và các đĩa được ủ trong 6 giờ ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5%. Các tế bào này được rửa hai lần bằng 200µL/lỗ DPBS. 40µL dung dịch đệm phân giải chất báo cáo mới được điều chế (Promega, Cat-No: E3971) được bổ sung vào từng lỗ và đĩa được bảo quản qua đêm ở nhiệt độ -20°C. Ngày tiếp theo, đĩa tế bào đã đông lạnh và dung dịch đệm phát hiện (Hệ thử nghiệm Luciferaza 1000, Promega, Cat. No. E4550) được rã đông ở nhiệt độ trong phòng. 100µL dung dịch đệm phát hiện được bổ sung vào từng lỗ và hoạt tính luciferaza được đo nhanh nhất có

thể bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa SpectraMax M5/M5e và phần mềm SoftMax Pro (Molecular Devices) đếm lượng ánh sáng phát ra tính theo URL (đơn vị ánh sáng phát ra trong 0,5giây/lỗ) hoặc thiết bị đọc đĩa đếm nhiều nhãn Victor3 1420 (Perkin Elmer) và phần mềm quản lý Perkin Elmer 2030 Manager đếm lượng ánh sáng phát ra dưới dạng số đếm trong mỗi giây (CPS) và được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm.

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CD19 các cấu trúc từ 3.1 và 3.3 khởi phát sự hoạt hóa của con đường truyền tín hiệu NF-kB trong dòng tế bào báo cáo khi có mặt tế bào u lympho tế bào B biểu hiện CD19. Ngược lại, các phân tử đối chứng không được hướng đích không khởi phát được tác dụng này ở nồng độ thử nghiệm bất kỳ (Fig.38).

Ví dụ 11

11.1 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CEA (T84.66-LCHA)

11.1.1 Biến đổi giống như của người cho dòng vô tính T84.66 kháng CEA

Biến thể được biến đổi giống như của người mới của kháng thể chuột T84.66 (Wagener et al., J Immunol 130, 2308 (1983), Neumaier et al., J Immunol 135, 3604 (1985)) được tạo ra bằng cách ghép các CDR lên trên trình tự khung của thụ thể dòng mầm người.

Việc biến đổi giống như của người cho kháng thể có nguồn gốc không phải người chủ yếu bao gồm bước cấy chuyển các gốc CDR từ kháng thể không phải của người (đối tượng cho) lên trên khung của kháng thể (thụ thể) người. Thông thường, khung của thụ thể được chọn lọc bằng cách căn thẳng trình tự của đối tượng cho vào tập hợp các trình tự thụ thể có thể có và chọn lựa một trình tự có độ tương đồng hợp lý với đối tượng cho, hoặc thể hiện các axit amin tương tự ở một số vị trí quan trọng về mặt cấu trúc và hoạt tính. Trong trường hợp này, việc tìm kiếm khung của thụ thể kháng thể được thực hiện bằng cách căn thẳng trình tự protein chuột nhắt T84.66 (NCBI Acc No: CAA36980 đối với chuỗi nặng (SEQ ID NO:317), và CAA36979 (SEQ ID NO:318) đối với chuỗi nhẹ) vào tập hợp trình tự dòng mầm người và cho thấy là các trình tự người này thể hiện độ đồng nhất trình tự cao. Ở đây, trình tự IGHV1-69*08 từ cơ sở dữ liệu IMGT được chọn làm trình tự khung thụ thể chuỗi nặng (IMGT Acc No. Z14309, SEQ ID NO:319), và

trình tự IGKV3-11*01 (IMGT Acc No. X01668, SEQ ID NO:320) được chọn là khung thụ thể cho chuỗi nhẹ. Trên hai khung thụ thể này, ba vùng quyết định thể bổ sung (CDR) của miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của chuột nhắt được ghép. Do vùng khung 4 (FR4) không phải là một phần của vùng biến đổi của gen V dòng mầm nên việc căn thẳng đối với vị trí đó được thực hiện riêng lẻ. Trình tự JH4 được chọn đối với chuỗi nặng, và trình tự JK2 được chọn đối với chuỗi nhẹ.

11.1.2 Khả năng gắn kết của các biến thể đã được biến đổi giống như của người khác nhau của T84.66 IgG với tế bào

Khả năng gắn kết của các biến thể đã được biến đổi giống như của người khác nhau của T84.66 IgG được thử nghiệm trên các tế bào caxinom tuyến dạ dày ở người biểu hiện CEA (MKN45, DSMZ ACC 409).

Các tế bào được thu gom, đếm, kiểm tra khả năng sống sót và được tạo lại huyền phù ở $2x10^6$ tế bào/mL trong dung dịch đệm FACS (100µL PBS BSA 0,1%). 100µL huyền phù tế bào (chứa $0,2x10^6$ tế bào) được ủ trong đĩa 96 lỗ đáy tròn trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C với các nồng độ gia tăng của CEA IgG (4ng/mL– 60µg/mL), được rửa hai lần bằng PBS lạnh BSA 0,1%, được ủ lại trong 30 phút nữa ở nhiệt độ 4°C với kháng thể thứ cấp đặc hiệu mảnh Fcg IgG dê kháng người của mảnh F(ab')2 tinh khiết ái lực được liên hợp PE (Jackson Immuno Research Lab PE #109-116-170), được rửa hai lần bằng PBS lạnh BSA 0,1% và được phân tích ngay bằng FACS bằng cách sử dụng FACS CantoII (Phần mềm FACS Diva). Các đường cong gắn kết và các giá trị EC_{50} được thu thập và được tính bằng cách sử dụng GramPadPrism5.

Fig.39 thể hiện mô hình gắn kết khác nhau của các biến thể biến đổi giống như của người được chọn của T84.66 IgG với CEA người, được biểu hiện trên tế bào MKN45. Dựa vào các giá trị gắn kết EC_{50} đã tính được (Bảng 80), biến thể biến đổi giống như của người 1 được chọn để đánh giá thêm.

Bảng 80: Khả năng gắn kết của các biến thể biến đổi giống như của người khác nhau của T84.66 IgG với tế bào (giá trị EC_{50}, dựa vào các đường cong gắn kết được thể hiện trên Fig.39, được tính bằng GraphPad Prism).

	EC_{50} (µg/ml)
T84.66 khảm gốc	0,99
Biến thể biến đổi giống như của người 1	1,5
Biến thể biến đổi giống như của người 2	8,6
Biến thể biến đổi giống như của người 3	1,4
Biến thể biến đổi giống như của người 4	3,1
Biến thể biến đổi giống như của người 5	-
Biến thể biến đổi giống như của người 6	-

Biến thể biến đổi giống như của người 1 được gọi theo T84.66-LCHA sau đây. Trình tự axit amin của các CDR của nó và của VH và VL cũng như trình tự axit amin của miền VH và miền VL của dòng vô tính T84.66 khảm gốc được thể hiện trong Bảng 81.

Bảng 81: Trình tự axit amin của các miền biến đổi của CEA dòng vô tính T84.66-LCHA và kháng thể gốc T84.66 của nó

Mô tả	Trình tự	SEQ ID NO:
CEA CDR-H1	DTYMH	321
CEA CDR-H2	RIDPANGNSKYVPKFQG	322
CEA CDR-H3	FGYYVSDYAMAY	323
CEA CDR-L1	RAGESVDIFGVGFLH	324

CEA CDR-L2	RASNRAT	325
CEA CDR-L3	QQTNEDPYT	326
VH của tác nhân gắn kết CEA gốc	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDT YMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNSKYVP KFQGKATITADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVY YCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTSVTVSS	327
VL của tác nhân gắn kết CEA gốc	DIVLTQSPASLAVSLGQRATMSCRAGESVDIF GVGFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPV RFSGTGSRTDFTLIIDPVEADDVATYYCQQTN EDPYTFGGGTKLEIK	328
Tác nhân gắn kết CEA được biến đổi giống như của người CEA (T84.66-LCHA) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKD TYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKY VPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSS	329
Tác nhân gắn kết CEA được biến đổi giống như của người CEA (T84.66-LCHA) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFG VGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTNE DPYTFGQGTKLEIK	330

11.2 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CEA (T84.66-LCHA)

Các mảnh khác nhau của phần mã hóa trình tự ADN của miền ngoài (axit amin 71-254 và 71-248) của phối tử 4-1BB người được tổng hợp theo trình tự P41273 trên cơ sở dữ liệu Uniprot (SEQ ID NO:42).

11.2.1 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB trime (71-254) hướng đích CEA (T84.66-LCHA) hóa trị một với miền CH1-CL lai có các gốc mang điện (Cấu trúc 5.1)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng như

được thể hiện trên Fig.29A: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL. Polypeptit người chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và được dung hợp với miền IgG1-CH người, được tách dòng như được mô tả trên Fig.29B: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH người.

Để cải thiện khả năng ghép cặp chính xác, các đột biến sau được đưa vào CH-CL lai. Trong phối tử 4-1BB dime được dung hợp với CL người, là E123R và Q124K. Trong phối tử 4-1BB monome được dung hợp với CH1 người, là K147E và K213E.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân gắn kết đặc hiệu với CEA, dòng vô tính T84.66-LCHA, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831.

Sự kết hợp giữa phối tử dime - chuỗi khóa Fc chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp CH1 monome, chuỗi ổ Fc kháng CEA được hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng CEA cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và Fab gắn kết CEA (Fig.40, Cấu trúc 5.1).

Bảng 82 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA (T84.66-LCHA) hóa trị một có CH-CL lai và các gốc mang điện (cấu trúc 5.1).

Bảng 82: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 5.1). * đối với gốc mang điện

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
129	Trình tự nucleotit Hu 4-1BBL dime (71-	Xem Bảng 3

	254) – CL* chuỗi khóa Fc	
130	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL Monome (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
331	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CEA(T84.66-LCHA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGT GAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACC TACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACA GGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCG CCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTC CAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAG CACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCT GCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTG CCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCA TGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACC GTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTG TTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAG CGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCT GGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTG TATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCT AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA GCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG

		GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTG CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
332	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66-LCHA)	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCACCCTG TCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCCACCCTGAG CTGTAGAGCCGGCGAGAGCGTGGACATCTTCG GCGTGGGATTTCTGCACTGGTATCAGCAGAAGC CCGGCCAGGCCCCCAGACTGCTGATCTACAGA GCCAGCAACCGGGCCACAGGCATCCCCGCCAG ATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCAC CCTGACAATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGACT TCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGACCAACGAG GACCCCTACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTG GAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTC TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT

		AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACT CCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGT
115	Hu 4-1BBL dime (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3
116	hu 4-1BBL Monome (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
333	Chuỗi ổ Fc kháng CEA (T84.66-LCHA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTY MHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQ GRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPF GYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV

		DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
334	Chuỗi nhẹ kháng CEA (T84.66-LCHA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGF LHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

11.2.2 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB trime (71-254) hướng đích CEA (T84.66-LCHA) hóa trị một với miền CH1-CL lai không có gốc mang điện (Cấu trúc 5.2)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng tương tự như được thể hiện trên Fig.29A, nhưng không có các đột biến axit amin trong miền CL: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL. Polypeptit người chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và được dung hợp với miền IgG1-CH1 người, được tách dòng tương tự như được thể hiện trên Fig.29B, nhưng không có các đột biến axit amin trong miền CH1: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH1 người.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân gắn kết đặc hiệu với CEA, dòng vô tính T84.66-LCHA, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người.

Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831. Sự kết hợp giữa phối tử dime - chuỗi khóa Fc chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp CH1 monome, chuỗi ổ Fc kháng CEA được hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng CEA cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và Fab gắn kết CEA (Fig.40, Cấu trúc 5.2).

Bảng 83 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA (T84.66-LCHA) hóa trị một chứa CH-CL lai lai không có gốc mang điện (cấu trúc 5.2).

Bảng 83: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA (T84.66-LCHA) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (cấu trúc 5.2)

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
165	Trình tự nucleotit phối tử dime (71-254)– chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 22
166	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL monome (71-254) – CH1	Xem Bảng 22
331	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CEA (T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
332	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CEA (T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
117	Phối tử dime (71-254) - chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 22
118	Phối tử monome (71-254) -CH1	Xem Bảng 22
333	Chuỗi ổ Fc kháng CEA (T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
334	Chuỗi nhẹ kháng CEA (T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82

11.2.3 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB trime (71-254) hướng đích CEA (T84.66-LCHA) hóa trị hai (Cấu trúc 5.3)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$ đã dung hợp với đầu tận C của chuỗi ổ Fc IgG1 người, như được thể hiện trên Fig.29C: ổ Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người,

tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người. Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và được dung hợp với đầu tận C của chuỗi khóa Fc IgG1 người như được mô tả trên Fig.29D: khóa Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân gắn kết đặc hiệu với CEA, dòng vô tính T84.66-LCHA, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ, khóa hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831. Sự kết hợp giữa chuỗi ổ phối tử dime huIgG1 kháng CEA chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V, chuỗi khóa phối tử monome huIgG1 kháng CEA chứa đột biến S354C/T366W và chuỗi nhẹ kháng CEA cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và hai Fab gắn kết CEA (Fig.40, cấu trúc 5.3).

Bảng 84 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị hai (cấu trúc 5.3).

Bảng 84: trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) PGLALA của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị hai (cấu trúc 5.3)

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
335	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc của dime 4-1BBL (71-254) kháng CEA(T84.66-LCHA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGT GAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACC TACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACA GGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCG CCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTC CAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAG CACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCT

		GCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTG CCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCA TGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACC GTGTCCTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGT* *TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG* *CGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC* *TACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACA* *GCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCC* *CGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTG* *AGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGG* *GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAG* *CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGC* *CCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACC* *GTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCA* *GTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCT* *CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG* *GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA* *AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA* *TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC* *AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG* *TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA* *CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCC* *CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA* *GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCA* *TCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC* *TCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC* *ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG* *GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG* *ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTC* *ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC* *GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA* *CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC*

		CGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTT GCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCG ATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACT GGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTAC AAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGG CCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTG CGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAA GCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGT GGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAAT AGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACC TGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCA CACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTG ACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAG TGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCC AAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGG AGGATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGAC GATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAA TGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCT GATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCA GGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTG TCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGC TAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGG AACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAG GATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTG CGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGA CTGTGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAG AAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTG CATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATC TGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCA

		GCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTT CGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTGCCAA GCCCTAGATCAGAA
336	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc của 41-BBL (71-254) monome kháng CEA(T84.66-LCHA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGT GAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACC TACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACA GGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCG CCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTC CAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAG CACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCT GCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTG CCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCA TGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACC GTGTCCTCT*GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCG TGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT

		CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC *AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCC* *CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA* *GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCC* *TGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCC* *TGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGAT* *ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCT* *GAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGG* *ACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTG* *ACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAAC* *GTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC* *ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAG* *CCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAG* *GATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGA* *TCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATG* *TTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT* *CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGA* *CTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCT* *ACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAA* *GGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAC* *TGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCT* *CTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGA* *AGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAG* *TGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAA* *TAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCAC* *CTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGC* *ACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCT* *GACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGA* *GTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTC* *CAAGAAGCGAA*

332	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
337	Chuỗi ổ Fc của 41-BBL (71-254) dime kháng CEA(T84.66-LCHA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTY MHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQ GRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPF GYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSE*
338	Chuỗi khóa Fc của 4-1BBL (71-	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTY MHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQ

	254) monome kháng CEA(T84.66-LCHA)	GRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPF GYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSS*ASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGV YYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSE*
334	Chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82

11.2.4 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị một với miền CH1-CL lai có các gốc mang điện (Cấu trúc 5.4)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng tương tự với phương pháp được thể hiện trên Fig.29A: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL. Polypeptit người chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248) và được dung hợp với miền IgG1-CH người, được tách dòng tương tự với phương pháp được mô tả trên Fig.29B: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH người.

Polypeptit mã hóa phối tử 4-1BB dime đã dung hợp với miền CL người được tái tạo dòng thuần trong khung với miền CH2 và CH3 của chuỗi nặng IgG1 người trên khóa (Merchant, Zhu et al. 1998). Để cải thiện khả năng ghép cặp chính xác, các đột biến sau được đưa vào trong CH-CL lai. Trong phối tử 4-1BB dime được dung hợp với CL người, là E123R và Q124K. Trong phối tử 4-1BB monome được dung hợp với CH1 người, là K147E và K213E.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân gắn kết đặc hiệu với CEA, dòng vô tính T84.66-LCHA, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831. Sự kết hợp giữa phối tử dime - chuỗi khóa Fc chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp CH1 monome, chuỗi ổ Fc kháng CD19 được hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng CD19 cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và Fab gắn kết CEA (Fig.40, Cấu trúc 5.4).

Bảng 85 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị một có CH-CL lai và các gốc mang điện (Cấu trúc 5.4).

Bảng 85: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (Cấu trúc 5.4). * các gốc mang điện

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
169	Trình tự nucleotit phối tử dime (71-248) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 24
170	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL monome (71-248) – CH1*	Xem Bảng 24

331	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
332	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
119	Phối tử dime (71-248) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 24
120	Phối tử monome (71-248)-CH1*	Xem Bảng 24
333	Chuỗi ổ Fc kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 62
334	Chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 59

11.2.5 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) được hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị một với miền CH1-CL lai không có gốc mang điện (Cấu trúc 5.5)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng tương tự như được thể hiện trên Fig.29A, nhưng không có các đột biến axit amin trong miền CL: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL. Polypeptit người chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248) và được dung hợp với miền IgG1-CH1 người, được tách dòng tương tự như được thể hiện trên Fig.29B, nhưng không có các đột biến axit amin trong miền CH1: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH1 người.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân gắn kết đặc hiệu với CEA, dòng vô tính T84.66-LCHA, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831. Sự kết hợp giữa phối tử dime - chuỗi khóa Fc chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp CH1 monome, chuỗi ổ Fc kháng CEA được hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng CEA cho phép

tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và Fab gắn kết CD19 (Fig.40, Cấu trúc 5.5).

Bảng 86 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (cấu trúc 5.5).

Bảng 86: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị một chứa CH-CL lai không có gốc mang điện (cấu trúc 5.5).

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
171	Trình tự nucleotit phối tử dime (71-248) – Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 25
172	Trình tự nucleotit phối tử monome (71-248)-CH1	Xem Bảng 25
331	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
332	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
173	Phối tử dime (71-248) – Chuỗi khóa Fc CL	Xem Bảng 25
174	Phối tử monome (71-248)-CH1	Xem Bảng 25
333	Chuỗi ổ Fc kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
334	Chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82

11.2.6 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa trime phối tử 4-1BB (71-248) được hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị hai (Cấu trúc 5.6)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-248), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$ được dung hợp với đầu tận C của chuỗi ổ Fc IgG1 người, như được thể hiện trên Fig.29C: ổ Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người. Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và được dung hợp với đầu tận C của chuỗi khóa Fc IgG1 người như

được mô tả trên Fig.29D: khóa Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa chất gắn kết đặc hiệu với CEA, dòng vô tính T84.66-LCHA, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ, khóa hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831. Sự kết hợp giữa chuỗi ổ phối tử dime huIgG1 kháng CEA chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V, chuỗi khóa phối tử monome huIgG1 kháng CEA chứa đột biến S354C/T366W và chuỗi nhẹ kháng CEA cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và hai Fab gắn kết CEA (Fig.40, cấu trúc 5.6).

Bảng 87 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị hai (cấu trúc 5.6).

Bảng 87: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CEA (T84.66-LCHA) hóa trị hai (cấu trúc 5.6)

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
339	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc của 4-1BBL (71-248) dime kháng CEA (T84.66-LCHA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGT GAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACC TACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACA GGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCG CCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTC CAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAG CACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCT GCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTG CCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCA

		TGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACC
		GTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTG
		TTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAG
		CGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCA
		AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCT
		GGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC
		ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTG
		TATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCT
		AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
		CGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG
		ACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAA
		ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA
		GCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC
		CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
		GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT
		GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
		GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
		AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
		GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
		TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
		AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC
		CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG
		GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTG
		CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA
		GGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTA
		TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
		ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG
		CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
		CTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
		GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
		GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
		AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGC

		GGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGG
		GCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGAC
		TGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGC
		TGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCC
		CCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTG
		GCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAA
		GAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGC
		CGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACT
		GCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCT
		CTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGA
		GATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGA
		CAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCC
		GGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGC
		TGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTG
		CATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGC
		CTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGG
		GCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAG
		GCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGA
		TCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCCGACGA
		TCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCAT
		GTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCT
		GATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCC
		AGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGAC
		TGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTG
		GTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTT
		CAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGA
		GGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCT
		GCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAG
		CACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTT
		CTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCC
		AAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAG
		CGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAG

		AGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGG CAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTG AGATCCCAGCCGGGCTC
340	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc của (71-248) 4-1BBL monome kháng CEA (T84.66-LCHA)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGT GAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCT GCAAGGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACC TACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGACA GGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCG CCAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTC CAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCAG CACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCT GCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTG CCCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCA TGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACC GTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTC TTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAG CTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC

		ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACC CCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC GGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCC CCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCT GTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCG GCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGG CCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACT GCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCT GGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCC CCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTG GCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAA GAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGC CGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACT GCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCT CTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGA GATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGA CAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCC GGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGC TGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTG CATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGC CTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGG GCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCG GGCTC

332	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CEA (T84.66-LCHA)	Xem Bảng 82
341	Chuỗi ổ Fc của 4-1BBL (71-248) dime kháng CEA (T84.66-LCHA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTY MHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQ GRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPF GYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQL VAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGL
342	Chuỗi khóa Fc của (71-248) 4-	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTY MHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQ

	1BBL monome kháng CEA (T84.66-LCHA)	GRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPF GYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPG LAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQL ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALAL TVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
334	Chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)	Xem Bảng 82

11.2.7 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB trime (71-254) được hướng đích CEA(T84.66) hóa trị một với miền CH1-CL lai có các gốc mang điện (Cấu trúc 5.7)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng như được thể hiện trên Fig.29A: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL. Polypeptit người chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và được dung hợp với miền IgG1-CH người, được tách dòng như được mô tả trên Fig.29B: phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH người.

Để cải thiện khả năng ghép cặp chính xác, các đột biến sau được đưa vào trong CH-CL lai. Trong phối tử 4-1BB dime được dung hợp với CL người, là E123R và Q124K. Trong phối tử 4-1BB monome được dung hợp với CH1 người, là K147E và K213E.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CEA, dòng vô tính T84.66, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831.

Sự kết hợp giữa phối tử dime - chuỗi khóa Fc chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp CH1 monome, chuỗi ổ Fc kháng CD19 được hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng CD19 cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và Fab gắn kết CEA. Cấu trúc 5.7 tương ứng với Cấu trúc 5.1 như được thể hiện trên Fig.40.

Bảng 88 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66) hóa trị một có CH-CL lai và các gốc mang điện (cấu trúc 5.7).

Bảng 88: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 5.7). * đối với các gốc mang điện

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
129	Trình tự nucleotit Hu 4-1BBL dime (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3

130	Trình tự nucleotit hu 4-1BBL Monome (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
343	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng CEA(T84.66)	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACT GGTGGAACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTG TACCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCT ACATGCACTGGGTCAAGCAGCGGCCTGAGCAG GGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCGACCCCGC CAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCC AGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCAGC AGCAACACAGCCTACCTGCAGCTGACCAGCCT GACCTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCAT GGCCTATTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCG TGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGT TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGC GGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGT ATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTA GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAG CTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG

		GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
344	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66)	GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCTCTCTG GCCGTGTCTCTGGGACAGAGGGCCACCATGTCT TGCAGAGCCGGCGAGAGCGTGGACATCTTCGG CGTGGGATTTCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCC CGGCCAGCCCCCCAAGCTGCTGATCTACAGAG CCAGCAACCTGGAAAGCGGCATCCCCGTGCGG TTTAGCGGCACCGGCAGCAGAACCGACTTCAC CCTGATCATCGACCCCGTGGAAGCCGACGACG TGGCCACCTACTACTGCCAGCAGACCAACGAG GACCCCTACACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCT GGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGT CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA ATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACT

		CCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGT
115	Hu 4-1BBL dime (71-254) – CL* chuỗi khóa Fc	Xem Bảng 3
116	hu 4-1BBL Monome (71-254) – CH1*	Xem Bảng 3
345	Chuỗi ổ Fc kháng CEA (T84.66)	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYM HWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGK ATITADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVYYCAPFGYY VSDYAMAYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK

346	Chuỗi nhẹ kháng CEA (T84.66)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATMSCRAGESVDIFGV GFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPVRFSGT GSRTDFTLIIDPVEADDVATYYCQQTNEDPYTFG GGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

11.2.8 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB trime (71-254) được hướng đích CEA(T84.66) hóa trị hai (Cấu trúc 5.8)

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254), được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$ được dung hợp với đầu tận C của chuỗi ổ Fc IgG1 người, như được thể hiện trên Fig.29C: ổ Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người. Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử 4-1BB (71-254) và được dung hợp với đầu tận C của chuỗi khóa Fc IgG1 người như được mô tả trên Fig.29D: khóa Fc IgG1 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử 4-1BB người.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với CEA, dòng vô tính T84.66, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ, khóa hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831. Sự kết hợp giữa chuỗi ổ của phối tử dime huIgG1 kháng CEA chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V, chuỗi khóa của phối tử monome huIgG1 kháng CEA chứa đột biến S354C/T366W và chuỗi nhẹ kháng CEA cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử 4-1BB trime đã lắp ráp và hai Fab gắn kết CEA. Cấu trúc 5.8 tương ứng với Cấu trúc 5.3 như được thể hiện trên Fig.40.

Bảng 89 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66) hóa trị hai (cấu trúc 5.8).

Bảng 89: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) PGLALA của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66) hóa trị hai (cấu trúc 5.8)

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
347	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc của 4-1BBL (71-254) dime kháng CEA(T84.66)	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACT GGTGGAACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTG TACCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCT ACATGCACTGGGTCAAGCAGCGGCCTGAGCAG GGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCGACCCCGC CAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCC AGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCAGC AGCAACACAGCCTACCTGCAGCTGACCAGCCT GACCTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCAT GGCCTATTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCG TGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGT TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGC GGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTG GAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGT ATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTA GCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAG CTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG

		GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
		AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC
		ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
		CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
		GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCC
		CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG
		CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCC
		CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG
		TCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC
		CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
		GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC
		TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
		CGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT
		GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
		TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
		AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGC
		GGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCC
		CTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGC
		TGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGG
		TGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCC
		TGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCG
		TGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG
		GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGG
		CGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCG
		GAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTG
		TGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAA
		GCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAG
		TGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGA
		ATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGC
		ACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCAT
		CTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTG
		GCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCC

		TGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCC TGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGA TCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGA ACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGA TCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGC TCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAG CTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGT CCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGAT ACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGT GTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCG GGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGT CCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTG CTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGG ACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAAC AGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCAT CTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCT GCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGC AGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTG TTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACTG CCAAGCCCTAGATCAGAA
348	Trình tự nucleotit chuỗi khóa Fc của 4-1BBL (72-254) monome kháng CEA(T84.66)	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCCGAACT GGTGGAACCTGGCGCCTCTGTGAAGCTGAGCTG TACCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACCT ACATGCACTGGGTCAAGCAGCGGCCTGAGCAG GGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCGACCCCGC CAACGGCAACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCC AGGGCAAGGCCACCATCACCGCCGACACCAGC AGCAACACAGCCTACCTGCAGCTGACCAGCCT GACCTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGC CCCCTTCGGCTACTACGTGTCCGACTACGCCAT GGCCTATTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCG

		TGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT
		TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG
		GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
		GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGG
		AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC
		CTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA
		CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG
		CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
		GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
		AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT
		CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCT
		GCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA
		AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC
		CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
		GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG
		TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
		GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA
		CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC
		ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
		TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCC
		ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
		GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
		CCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTG
		TCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCC
		AGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG
		CCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCC
		CTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGT
		ACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGG
		CAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGAT
		GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA
		AGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGC
		GGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCC

		CTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTGC TGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGG TGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCC TGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCG TGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGG CGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCG GAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTG TGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAA GCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAG TGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGA ATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGC ACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCAT CTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTG GCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCC TGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCC TGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
344	Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66)	Xem Bảng 88
349	Chuỗi ổ Fc của 4-1BBL(71-254) dime kháng CEA(T84.66)	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYM HWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGK ATITADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVYYCAPFGYY VSDYAMAYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS

		KAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLD LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLP PASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYK EDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQ LTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
350	Chuỗi khóa Fc của 4-1BBL (71-254) monome kháng CEA(T84.66)	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYM HWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNSKYVPKFQGK ATITADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVYYCAPFGYY VSDYAMAYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR

		VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPR SE
346	Chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66)	Xem Bảng 88

11.3 Tạo ra phân tử dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách vaf không hướng đích và IgG người làm phân tử đối chứng

11.3.1 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB người không được hướng đích (phân tử đối chứng)

Các phân tử đối chứng này được tạo ra như được mô tả ở trên đối với cấu trúc được hướng đích CEA 3.1 (gọi là đối chứng B), 3.3 (gọi là đối chứng C), 3.4 (gọi là đối chứng D) và 3.5 (gọi là đối chứng E) với một khác biệt duy nhất ở chỗ tác nhân liên kết kháng CD19 (VH-VL) được thay thế bằng đối chứng dòng mầm, gọi là DP47, không gắn kết với kháng nguyên (xem Fig.40). Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của đối chứng B, thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện, được thể hiện trong Bảng 68 ở trên (xem Ví dụ 7.3.1). Bảng 69 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kịh) của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị hai, đối chứng C. Bảng 70 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện, đối chứng D. Bảng 71 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime (71-248) chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một không có gốc mang điện trong CH-CL lai, đối chứng E.

11.3.2 Kháng thể làm phân tử đối chứng

Đối chứng bổ sung được sử dụng trong thử nghiệm, gọi là đối chứng F, là đối chứng dòng mầm, IgG1 người, không được hướng đích DP47 chứa đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala, để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama. Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của đối chứng F có thể được tìm thấy trong Bảng 73 ở trên.

11.4 Sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CEA và các phân tử đối chứng của chúng

Các trình tự mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách được hướng đích và không được hướng đích được tái tạo dòng thuần thành vectơ plasmit mà điều khiển sự biểu hiện của cải biến cài xen từ gen khởi đầu MPSV và chứa trình tự polyA tổng hợp nằm ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, vectơ này chứa trình tự EBV OriP để duy trì episom của plasmit.

Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách được sản xuất bằng cách đồng chuyển nhiễm tế bào HEK293-EBNA bằng vectơ biểu hiện ở động vật có vú bằng cách sử dụng polyetylenimin. Các tế bào này được chuyển nhiễm bằng các vectơ biểu hiện tương ứng. Đối với các biến thể 1,2,4,5 và đối chứng B, D và E của nó, với tỷ lệ 1:1:1:1 ("vectơ phối tử dime -CL- chuỗi khóa":"vectơ thể dung hợp phối tử monome -CH1":"vectơ chuỗi ổ Fab kháng CEA":"vectơ chuỗi nhẹ kháng CEA"). Đối với biến thể 3, 6 và đối chứng C của nó, với tỷ lệ 1:1:1 ("vectơ chuỗi ổ Fc phối tử dime huIgG1":"vectơ chuỗi khóa Fc phối tử monome huIgG1":"vectơ chuỗi nhẹ kháng CEA"). IgG người, được sử dụng làm đối chứng trong thử nghiệm, được sản xuất như đối với cấu trúc hai đặc hiệu (để chuyển nhiễm, chỉ có vectơ cho chuỗi nhẹ và vectơ cho chuỗi nặng được sử dụng với tỷ lệ 1:1).

Để sản xuất trong bình lắc 500mL, 300 triệu tế bào HEK293 EBNA được gieo cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, các tế bào này được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 2100m/s^2, và phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20mL môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện (200µg ADN tổng thể) được trộn trong 20mL môi trường CD CHO. Sau khi bổ sung 540µL PEI vào, dung dịch được khuấy xoáy trong 15 giây và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500mL và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ với môi trường CO_2 5%. Sau khi ủ, 160mL môi trường Excell đã bổ sung L-Glutamin 6mM, PEPSOY 5g/L và axit valproic 1,2mM được bổ sung vào và các tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau chuyển nhiễm, Feed 12% (axit amin và glucoza) được bổ sung vào. Sau khi nuôi cấy trong 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt được gom bằng cách ly tâm trong 30-40 phút ở tốc độ ít nhất là 4000m/s^2. Dung dịch được lọc vô trùng (thiết bị lọc kích cỡ 0,22µm), được bổ sung natri azit đến nồng độ cuối cùng là 0,01% (trọng lượng/thể tích), và duy trì ở nhiệt độ 4°C.

Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách, cũng như IgG, được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng Protein A, sau đó là phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Đối với phương pháp sắc ký ái lực, phần dịch nổi trên bề mặt được nạp lên trên cột MabSelect Sure (CV = 5-15 mL, nhựa từ GE Healthcare) đã cân bằng với Natri Phosphat (20mM), dung dịch đệm Natri Xitrat (20mM) (độ pH = 7,5). Protein không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa với ít nhất 6 thể tích cột của cùng một dung dịch đệm. Protein gắn kết được rửa giải bằng cách sử dụng gradien tuyến tính (20 CV) hoặc bước rửa giải (8 CV) với natri xitrat 20mM, natri clorua 100mM, dung dịch đệm glyxin 100mM (độ pH = 3,0). Đối với gradien tuyến tính, bước rửa giải 4 thể tích cột bổ sung được áp dụng.

Độ pH của các đoạn đã gom được điều chỉnh bằng cách bổ sung 1/10 (thể tích/thể tích) của natri phosphat 0,5M, độ pH = 8,0. Protein được cô trước khi nạp lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) đã cân bằng với Histidin 20mM, natri clorua 140mM, dung dịch Tween20 0,01% (thể tích/thể tích) có độ pH = 6,0.

Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang học (OD) ở bước sóng 280nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime được hướng đích được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE khi có và không có chất khử (1,4-dithiotreitol 5mM) và nhuộm bằng Coomassie SimpleBlue™ SafeStain (Invitrogen USA) hoặc CE-SDS bằng cách sử dụng Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer). Hàm lượng kết tụ của các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng cột phân tích loại trừ theo kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) được cân bằng trong K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125mM, L-Arginin Monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), dung dịch đệm vận hành độ pH = 6,7 ở nhiệt độ 25°C.

Bảng 90 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CEA.

Bảng 90: Phân tích sinh hóa thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CEA.

Cấu trúc	Monome [%] (giây)	Hiệu suất [mg/l]
Thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (Cấu trúc 5.4)	98	1,4
Thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime (71-248) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66-LCHA) hóa trị hai (cấu trúc 5.6)	98	0,4
Thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 5.7)	97	15
Thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime (71-254) đã chia tách hướng đích CEA(T84.66) hóa trị hai (cấu trúc 5.8)	96	2

Bảng 91 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của phân tử dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách không hướng đích DP47, cả hóa trị một (đối chứng B, D và E) và hóa trị hai (đối chứng C), và của dòng mầm DP47 IgG1 PGLALA người (đối chứng F).

Bảng 91: Phân tích sinh hóa thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách không hướng đích DP47

Cấu trúc	Monome [%] (giây)	Hiệu suất [mg/l]

Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một (đối chứng B)	99	15,4
Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị hai (đối chứng C)	98	12,6
Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một (đối chứng D)	99,5	25,9
Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime người (71-254) đã chia tách không hướng đích DP47 hóa trị một (đối chứng E)	93,3	4,1
Dòng mầm DP47 IgG1 PGLALA người	100	50

Ví dụ 12

Đặc trưng hóa chức năng cho phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CEA

12.1 Cộng hưởng plasmon bề mặt (gắn kết đồng thời)

Sản xuất hu NA3B3A2 dưới dạng kháng nguyên cho cấu trúc 4-1BBL trime đã chia tách hướng đích CEA

Kháng nguyên được sử dụng để đánh giá sự gắn kết với CEA bằng phương pháp SPR là phân tử lai gồm miền A3 và miền B3 từ CEACAM5 người (CEA) và miền N và miền A2 từ CEACAM1 người (BGP1) tương tự như được mô tả đối với NABA (Durbin H. et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 May 10;91(10):4313-7). Kháng nguyên này được gọi là NA3B3A2 trong bản mô tả này và phần mô tả sơ lược có thể được tìm thấy trên Fig.41A.

Bảng 92 thể hiện trình tự nucleotit và trình tự axit amin của hu NA3B3A2-avi-His.

Bảng 92: Trình tự nucleotit và trình tự axit amin của hu NA3B3A2-avi-His

SEQ ID NO:	Kháng nguyên	Trình tự
351	Trình tự nucleotit hu NA3B3A2-avi His	CAGCTGACCACCGAGTCCATGCCCTTCAACGT GGCCGAGGGCAAAGAGGTGCTGCTGCTGGTC CACAACCTGCCCCAGCAGCTGTTCGGCTACAG CTGGTACAAGGGCGAGCGGGTGGACGGCAAC CGGCAGATCGTGGGCTACGCCATCGGCACCC AGCAGGCCACACCCGGCCCTGCCAATAGCGG CAGAGAGACAATCTACCCCAACGCCAGCCTG CTGATCCAGAACGTGACCCAGAACGACACCG GCTTCTACACACTCCAAGTCATCAAGAGCGAC CTGGTCAACGAGGAAGCCACCGGCCAGTTCC ACGTGTACCCCGAGCTGCCCAAGCCCAGCAT CAGCAGCAACAACAGCAAGCCCGTGGAAGAT AAGGACGCCGTGGCCTTTACCTGCGAGCCCG AGGCCCAGAACACCACCTACCTGTGGTGGGT CAACGGCCAGAGCCTGCCCGTGTCCCCCAGA CTCCAGCTGAGCAACGGCAACAGAACCCTGA CCCTGTTCAACGTGACCCGGAATGACGCCAG AGCCTACGTGTGCGGCATCCAGAACAGCGTG TCCGCCAACCGCAGCGACCCCGTGACCCTGG ATGTGCTGTACGGCCCCGACACCCCCATCATC AGCCCCCCTGACAGCAGCTACCTGAGCGGCG CCAACCTGAACCTGAGCTGCCACAGCGCCAG CAACCCCAGCCCTCAGTACAGCTGGCGGATC AACGGCATCCCCCAGCAGCACACCCAGGTGC TGTTTATCGCCAAGATCACCCCCAACAACAAC GGCACCTACGCCTGCTTCGTGTCCAACCTGGC CACCGGCCGGAACAACAGCATCGTGAAGTCC ATCACCGTGTCCGCCTCCCTGAGCCCCGTGGT

		GGCCAAGCCTCAGATCAAGGCCAGCAAGACC ACCGTGACCGGCGACAAGGACAGCGTGAACC TGACCTGCTCCACCAACGATACCGGCATCAGC ATCCGGTGGTTCTTCAAGAATCAGTCCCTGCC CAGCAGCGAGCGGATGAAGCTGAGCCAGGGC AACATCACCCTGTCCATCAACCCCGTGAAAA GAGAGGACGCCGGCACCTATTGGTGCGAGGT GTTCAACCCCATCAGCAAGAACCAGAGCGAC CCCATCATGCTGAACGTGAACTACAACGCCCT GCCCCAAGAAAACCTGATCAATGTTGATCTG GAAGTGCTGTTCCAGGGCCCAGGCAGCGGCC TGAACGACATCTTCGAAGCCCAGAAAATCGA GTGGCACGAGGCCAGAGCCCACCACCACCAT CACCAC
352	NA3B3A2-avi-His người	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYS WYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGR ETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNE EATGQFHVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFT CEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNR TLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTL DVLYGPDTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPS PQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACF VSNLATGRNNSIVKSITVSASLSPVVAKPQIKAS KTTVTGDKDSVNLTCSTNDTGISIRWFFKNQSLP SSERMKLSQGNITLSINPVKREDAGTYWCEVFN PISKNQSDPIMLNVNYNALPQENLINVDLEVLFQ GPGSGLNDIFEAQKIEWHEARAHHHHHH

Việc sản xuất protein được thực hiện như được mô tả ở trên đối với thể dung hợp Fc-protein (Ví dụ 7.1.1). Protein tiết ra được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào bằng cách sắc ký chelat hóa, sau đó là sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Bước sắc

ký thứ nhất được thực hiện trên hộp chứa NiNTA Superflow Cartridge (5ml, Qiagen) được cân bằng trong natri phosphat 20mM, natri clorua 500nM, độ pH = 7,4. Bước rửa giải được thực hiện bằng cách áp dụng gradien trên 12 thể tích cột từ 5% đến 45% dung dịch đệm rửa giải (natri phosphat 20mM, natri clorua 500nM, Imidazol 500mM, độ pH = 7,4).

Protein được cô và lọc trước khi nạp lên trên cột HiLoad Superdex 75 (GE Healthcare) đã cân bằng voới Histidin 20mM, NaCl 140mM, Tween-20 0,01% độ pH = 6,0. Bảng 93 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của NA3B3A2-avi-His người.

Bảng 93: Phân tích sinh hóa của NA3B3A2-avi-His người

Cấu trúc	Monome [%] (giây)	Hiệu suất [mg/l]
NA3B3A2-avi-His người	88	14,1

Khả năng gắn kết đồng thời 4-1BB Fc (kih) người và NA3B3A2 người được đánh giá bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Tất cả các thử nghiệm SPR đều được thực hiện trên Biacore T200 ở nhiệt độ 25°C với HBS-EP làm dung dịch đệm vận hành (HEPES 0,01M độ pH = 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,005%, Biacore, Freiburg/Đức). 4-1BB Fc (kih) người đã biotinyl hóa được ghép cặp trực tiếp với tế bào chảy của chíp cảm biến streptavidin (SA). Mức độ cố định tối đa 250 đơn vị cộng hưởng (RU) được sử dụng.

Cấu trúc 4-1BBL trime đã chia tách hướng đích CEA (các cấu trúc 5.4, 5.6, 5.7 và 5.8) được cho đi qua tế bào chảy ở khoảng nồng độ bằng 200nM với tốc độ dòng chảy bằng 30µL/phút trong 90 giây và mức phân ly được thiết lập đến không giây. NA3B3A2 người được bơm dưới dạng chất phân tích thứ hai với tốc độ dòng chảy bằng 30µL/phút thông qua tế bào chảy trong 90 giây ở nồng độ bằng 500nM (Fig.41B). Sự phân ly được theo dõi trong 120 giây. Chênh lệch chỉ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ

đi đáp ứng thu được trong tế bào chảy đối chiếu, trong đó không có protein nào được cố định.

Như có thể thấy được trong các biểu đồ trên Fig.42, tất cả các cấu trúc hai đặc hiệu đều có thể gắn kết đồng thời 4-1BB người và NA3B3A2 người.

12.2. Khả năng gắn kết trên PBMC người đã được hoạt hóa của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) chứa phối tử 4-1BB trime được hướng đích CEA

Để xác định khả năng gắn kết của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime 4-1BBL với PBMC người, các nồng độ đã chuẩn độ khác nhau của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime 4-1BBL được hướng đích CEA được sử dụng trong thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 5.2.

Fig.43 thể hiện khả năng gắn kết của các cấu trúc 5.4, 5.6, 5.7 và 5.8 như được tạo ra trong Ví dụ 11 trên tế bào T CD4+ và tế bào T CD8+ biểu hiện 4-1BB đã được hoạt hóa, một cách tương ứng. Các cổng được thiết lập trên tế bào T CD4+ CD3+ CD45+ hoặc tế bào T CD8+ CD3+ CD45+ còn sống và MFI của mảnh F(ab`)2 dê đặc hiệu với mảnh Fcγ IgG kháng IgG người tinh khiết ái lực liên hợp PE được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ đã chuẩn độ của biến thể dung hợp Fc của phối tử 4-1BB trime đã chia tách được hướng đích. Bảng 94 thể hiện các giá trị EC_{50} như được đo đối với cấu trúc 5.4, 5.6, 5.7 và 5.8 và các phân tử đối chứng.

Bảng 94: Khả năng gắn kết trên tế bào T CD4+ và tế bào T CD8+ biểu hiện 4-1BB đã được hoạt hóa

Cấu trúc	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD8$^+$	EC_{50} [nM] 4-1BB$^+$CD4$^+$
Đối chứng B	0,05	0,26
Đối chứng C	0,02	0,30
Đối chứng D	0,04	0,28
Đối chứng E	0,13	1,22
5.4	0,13	0,35

5.6	0,06	0,34
5.7	0,0004	0,36
5.8	0,17	0,38

12.2 Gắn kết với tế bào khối u biểu hiện CEA

Đối với các thử nghiệm gắn kết trên tế bào khối u biểu hiện CEA, các dòng tế bào u lympho biểu hiện CEA người sau được sử dụng: dòng tế bà khối u biểu hiện CEA dòng tế bào ung thư dạ dày người MKN-45 (ATCC TCP-1008) và dòng tế bào caxinom tuyến ruột kết trực tràng người LS180 (ATCC CL-187). Các thử nghiệm được thực hiện như được mô tả đối với các dòng tế bào khối u MV-3 và WM-266-4 biểu hiện FAP trong Ví dụ 5.3.

Các cổng được thiết lập trên tế bào khối u còn sống và MFI của mảnh F(ab`)2 dê đặc hiệu với mảnh Fcγ IgG kháng IgG người tinh khiết ái lực liên hợp PE được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ đã chuẩn độ của cấu trúc dung hợp Fc của phối tử 4-1Bb trime đã chia tách được hướng đích.

Fig.44 thể hiện khả năng gắn kết của cấu trúc 5.7 như được tạo ra trong Ví dụ 11.2.7 với các dòng tế bào dạ dày ở người biểu hiện CEA người MKN-45 (bên trái) và dòng tế bào caxinom tuyến ruột kết trực tràng ở người LS180 (bên phải). Bảng 95 thể hiện các giá trị EC_{50} như được đo đối với dòng tế bào dạ dày người biểu hiện CEA người MKN-45.

Bảng 95: Gắn kết với tế bào khối u biểu hiện CEA

Cấu trúc	EC_{50} [nM] MKN45-8	EC_{50} [nM] LS180
5.7	11,6	14,4

Ví dụ 13

Hoạt tính sinh học của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CEA

13.1. Sự hoạt hóa NF-κB trong tế bào HeLa biểu hiện 4-1BB người

Tế bào HeLa biểu hiện 4-1BB người và NF-κB-luciferaza được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 6.1.

Sự hoạt hóa NF-κB trong tế bào HeLa biểu hiện 4-1BB người được nuôi cấy đồng thời với tế bào khối u biểu hiện CEA người

Tế bào Hela 4-1BB NF-κB-luciferaza người được thu gom và được tạo lại huyền phù trong môi trường DMEM đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích) và GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích) đến nồng độ bằng 0,2 x 10^6 tế bào/mL. 100µL (2 x 10^4 tế bào) huyền phù tế bào này được chuyển vào từng lỗ của đĩa nuôi cấy mô đáy phẳng màu trắng vô trùng có 96 lỗ có nắp (greiner bio-one, Cat. No. 655083) và đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5% qua đêm. Ngày tiếp theo, 50µL môi trường chứa nồng độ đã chuẩn độ của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CEA (trime 4-1BBL đã chia tách CEA) hoặc phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB không được hướng đích DP47 (trime 4-1BBL đã chia tách DP47) được bổ sung vào. Dòng tế bào khối u biểu hiện CEA dòng tế bào ung thư dạ dày người MKN-45 (ATCC TCP-1008) được tạo lại huyền phù trong môi trường DMEM đã cấp FBS 10% (thể tích/thể tích) và GlutaMAX-I 1% (thể tích/thể tích) đến nồng độ bằng 2 x 10^6 tế bào/mL.

Huyền phù chứa tế bào u lympho tế bào B biểu hiện CEA (50µL, tỷ lệ cuối cùng 1:5) hoặc chỉ có môi trường được bổ sung vào từng lỗ và các đĩa được ủ trong 6 giờ ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5%. Các tế bào này được rửa hai lần bằng 200µL/lỗ DPBS. 40µL dung dịch đệm phân giải chất báo cáo mới được tạo ra (Promega, Cat-No: E3971) được bổ sung vào từng lỗ và đĩa được bảo quản qua đêm ở nhiệt độ -20°C. Ngày tiếp theo, đĩa tế bào đã đông lạnh và dung dịch đệm phát hiện (Hệ thử nghiệm Luciferaza 1000, Promega, Cat. No. E4550) được rã đông ở nhiệt độ trong phòng. 100µL dung dịch đệm phát hiện được bổ sung vào từng lỗ và hoạt tính luciferaza được đo nhanh nhất có thể bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa SpectraMax M5/M5e và phần mềm SoftMax Pro (Molecular Devices) đếm lượng phát ánh sáng tính theo URL (đơn vị ánh sáng phát ra

trong 0,5giây/lỗ) hoặc thiết bị đọc đĩa đếm nhiều nhãn Victor3 1420 (Perkin Elmer) và phần mềm quản lý Perkin Elmer 2030 Manager đếm lượng ánh sáng phát ra dưới dạng số lượng trong mỗi giây (CPS) và được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ của các cấu trúc thử nghiệm.

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử 4-1BB được hướng đích CEA các cấu trúc 5.7 và 5.8 khởi phát sự hoạt hóa của con đường truyền tín hiệu NF-kB trong dòng tế bào báo cáo khi có mặt tế bào MKN-45 của dòng tế bào ung thư dạ dày người. Ngược lại, các phân tử đối chứng không được hướng đích không khởi phát được tác dụng này ở nồng độ thử nghiệm bất kỳ (Fig.45). Bảng 96 thể hiện các giá trị EC_{50} tương ứng.

Bảng 96: Gắn kết với tế bào khối u biểu hiện CEA

Cấu trúc	EC_{50} [nM] Không có tế bào khối u MKN-45	EC_{50} [nM] MKN45
5.4	3,1	0,34
5.6	2,05	0,21
5.7	0,85	0,05
5.8	1,52	0,45

Ví dụ 14

14.1 Tạo ra phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử OX40 được hướng đích FAP

Phần mã hóa trình tự ADN của miền ngoài (axit amin 51-183) của phối tử OX40 người được tổng hợp theo trình tự P23510 trên cơ sở dữ liệu Uniprot. Để làm giảm độ thiếu đồng nhất của phối tử OX40 người do glycosyl hóa, các gốc asparagin ở vị trí 90 và vị trí 114 được tạo đột biến thành axit aspartic bằng đột biến định hướng vị trí (theo Compaan D.M., Hymowitz S.G., Structure (2006) 14(8), 1321-30).

Polypeptit chứa hai miền ngoài của phối tử OX40, được tách bằng tác nhân liên kết $(G4S)_2$, và được dung hợp với miền IgG1-CL người, được tách dòng như được thể hiện trên Fig.46A: phối tử OX40 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, phối tử OX40 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CL người.

Polypeptit chứa một miền ngoài của phối tử OX40 và được dung hợp với miền IgG1-CH người, được tách dòng như được mô tả trên Fig.46B: phối tử OX40 người, tác nhân liên kết $(G4S)_2$, CH người.

Để cải thiện khả năng ghép cặp chính xác, các đột biến sau được đưa vào trong CH-CL lai. Trong phối tử 4-1BB dime được dung hợp với CL người, là E123R và Q124K. Trong phối tử 4-1BB monome được dung hợp với CH1 người, là K147E và K213E.

Việc tạo ra và điều chế tác nhân liên kết FAP được mô tả trong WO 2012/020006 A2, được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Vùng biến đổi của trình tự ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mã hóa tác nhân liên kết đặc hiệu với FAP, dòng vô tính 28H11, được tái tạo dòng thuần trong khung với chuỗi nặng hằng định của ổ hoặc chuỗi nhẹ hằng định của IgG1 người. Đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala được đưa vào vùng hằng định của chuỗi nặng khóa và chuỗi nặng ổ để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong WO 2012/130831.

Sự kết hợp giữa phối tử dime - chuỗi khóa Fc chứa đột biến S354C/T366W, thể dung hợp CH1 monome, chuỗi ổ Fc kháng FAP được hướng đích chứa đột biến Y349C/T366S/L368A/Y407V và chuỗi nhẹ kháng FAP cho phép tạo ra heterodime, bao gồm phối tử OX40 trime được lắp ráp và Fab gắn kết FAP (Fig.46C, Cấu trúc 6.1).

Bảng 97 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử OX40 (51-183) trime đã chia tách hướng đích CEA (T84.66-LCHA) hóa trị một có CH-CL lai và các gốc mang điện (cấu trúc 6.1).

Bảng 97: Trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử OX40 trime đã chia tách hướng đích FAP(28H1) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 6.1). * đối với các gốc mang điện

SEQ ID NO:	Mô tả	Trình tự
353	Trình tự nucleotit hu OX40L dime (51-183) – CL* chuỗi khóa Fc	CAGGTGTCCCACAGATACCCCAGAATCCAGAG CATCAAGGTGCAGTTCACCGAGTACAAGAAAG AGAAGGGCTTCATCCTGACCAGCCAGAAAGAG GACGAGATCATGAAGGTGCAGGACAACAGCGT GATCATCAACTGCGACGGCTTCTACCTGATCAG CCTGAAGGGCTACTTCAGCCAGGAAGTGGACA TCAGCCTGCACTACCAGAAGGACGAGGAACCC CTGTTCCAGCTGAAGAAAGTGCGGAGCGTGAA CAGCCTGATGGTGGCCAGCCTGACCTACAAGG ACAAGGTGTACCTGAACGTGACCACCGACAAC ACCAGCCTGGACGACTTCCACGTGAACGGCGG CGAGCTGATCCTGATTCACCAGAACCCCGGCG AGTTCTGCGTGCTGGGAGGCGGAGGATCTGGC GGAGGCGGATCTCAGGTGTCACACCGCTACCC CCGGATTCAGTCCATTAAGGTGCAGTTTACAGA GTATAAGAAAGAAAAAGGCTTTATTCTGACTTC CCAGAAAGAAGATGAGATTATGAAGGTGCAGG ATAATTCTGTGATCATCAATTGTGACGGCTTCT ACCTGATCAGCCTGAAGGGCTACTTCAGCCAG GAAGTGGACATCAGCCTGCACTACCAGAAGGA CGAGGAACCCCTGTTCCAGCTGAAGAAAGTGC GGAGCGTGAACAGCCTGATGGTGGCCAGCCTG ACCTACAAGGACAAGGTGTACCTGAACGTGAC CACCGACAACACCAGCCTGGACGACTTCCACG TGAACGGCGGCGAGCTGATCCTGATCCACCAG AACCCTGGCGAGTTCTGCGTGCTGGGAGGCGG

		AGGCTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGG CTGCACCATCTGTCTTTATCTTCCCACCCAGCG ACCGGAAGCTGAAGTCTGGCACAGCCAGCGTC GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGCGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCT GCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCG AGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTG AGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTA CGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGA CCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAG AGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACAAGACCCA CACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGCTGC TGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAA GCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCC CTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC ACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGAC CAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT GCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

354	Trình tự nucleotit hu OX40L Monome (51-183) – CH1*	CAGGTGTCCCACAGATACCCCAGAATCCAGAG CATCAAGGTGCAGTTCACCGAGTACAAGAAAG AGAAGGGCTTCATCCTGACCAGCCAGAAAGAG GACGAGATCATGAAGGTGCAGGACAACAGCGT GATCATCAACTGCGACGGCTTCTACCTGATCAG CCTGAAGGGCTACTTCAGCCAGGAAGTGGACA TCAGCCTGCACTACCAGAAGGACGAGGAACCC CTGTTCCAGCTGAAGAAAGTGCGGAGCGTGAA CAGCCTGATGGTGGCCAGCCTGACCTACAAGG ACAAGGTGTACCTGAACGTGACCACCGACAAC ACCAGCCTGGACGACTTCCACGTGAACGGCGG CGAGCTGATCCTGATTCACCAGAACCCCGGCG AGTTCTGCGTGCTGGGAGGCGGAGGTTCCGGA GGCGGAGGATCTGCTAGCACAAAGGGCCCCAG CGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCAC ATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGT GGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTC CTGGAATTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGC ACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC TGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCA GCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGC
68	Trình tự nucleotit chuỗi ổ Fc kháng FAP(28H1)	Xem Bảng 2
69	Trình tự nucleotit chuỗi	Xem Bảng 2

	nhẹ kháng FAP(28H1)	
355	hu OX40L dime (51-183) – CL* chuỗi khóa Fc	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEI MKVQDNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVDISLHYQ KDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNV TTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVLGGGGS GGGGSQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQ KEDEIMKVQDNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVDIS LHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKV YLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL GGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
356	hu OX40L Monome (51-183) – CH1*	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEI MKVQDNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVDISLHYQ KDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNV TTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVLGGGGS GGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKV EPKSC

18	Chuỗi ổ Fc kháng FAP(28H1)	Xem Bảng 2
19	Chuỗi nhẹ kháng FAP(28H1)	Xem Bảng 2

14.2 Tạo ra IgG1 người không được hướng đích làm đối chứng F

Phân tử đối chứng được sử dụng trong các thử nghiệm, gọi là đối chứng F (Fig.46D), là đối chứng dòng mầm, IgG1 người, không được hướng đích DP47 chứa đột biến Pro329Gly, Leu234Ala và Leu235Ala, để phá hủy sự gắn kết với thụ thể Fc gama theo phương pháp được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế quốc tế số WO 2012/130831). Quy trình tạo ra phân tử được mô tả trong Ví dụ 2.3, Bảng 29 thể hiện trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của trình tự ADN bổ sung và trình tự axit amin của DP47 huIgG1 PGLALA không được hướng đích (Đối chứng F).

14.3 Sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc của phối tử OX40 trime đã chia tách hướng đích FAP và các phân tử đối chứng của chúng

Các trình tự mã hóa thể dung hợp Fc (kih) của phối tử OX40 trime đã chia tách được hướng đích và không được hướng đích được tái tạo dòng thuần thành vectơ plasmit mà điều khiển sự biểu hiện của cải biến cài xen từ gen khởi đầu MPSV và chứa trình tự polyA tổng hợp nằm ở đầu 3' của CDS. Ngoài ra, vectơ này chứa trình tự EBV OriP để duy trì episom của plasmit.

Thể dung hợp Fc (kih) của phối tử OX40 trime đã chia tách được sản xuất bằng cách đồng chuyển nhiễm tế bào HEK293-EBNA bằng vectơ biểu hiện ở động vật có vú bằng cách sử dụng polyetylenimin. Các tế bào này được chuyển nhiễm bằng các vectơ biểu hiện tương ứng. Đối với các biến thể 1,2,4,5 và đối chứng B, D và E của nó, với tỷ lệ 1:1:1:1 ("vectơ phối tử dime-CL-chuỗi khóa":"vectơ thể dung hợp phối tử monome-CH1":"vectơ chuỗi ổ Fab kháng FAP":"vectơ chuỗi nhẹ kháng FAP"). Đối với biến thể 3, 6 và đối chứng C của nó, với tỷ lệ 1:1:1 ("vectơ chuỗi ổ Fc phối tử dime huIgG1":"vectơ chuỗi khóa Fc phối tử monome huIgG1":"vectơ chuỗi nhẹ kháng FAP"). IgG người, được sử dụng làm đối chứng trong thử nghiệm, được sản xuất như đối với

cấu trúc hai đặc hiệu (để chuyển nhiễm, chỉ có vectơ cho chuỗi nhẹ và vectơ cho chuỗi nặng được sử dụng với tỷ lệ 1:1).

Để sản xuất trong bình lắc 500mL, 300 triệu tế bào HEK293 EBNA được gieo cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Để chuyển nhiễm, các tế bào này được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 2100m/s^2, và phần dịch nổi trên bề mặt được thay thế bằng 20mL môi trường CD CHO được làm ấm từ trước. Các vectơ biểu hiện (200µg ADN tổng thể) được trộn trong 20mL môi trường CD CHO. Sau khi bổ sung 540µL PEI vào, dung dịch được khuấy xoáy trong 15 giây và được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các tế bào này được trộn với dung dịch ADN/PEI, được chuyển vào bình lắc 500mL và được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ với môi trường CO_2 5%. Sau khi ủ, 160mL môi trường Excell đã bổ sung L-Glutamin 6mM, PEPSOY 5g/L và axit valproic 1,2mM được bổ sung và các tế bào này được nuôi cấy trong 24 giờ. Một ngày sau chuyển nhiễm, Feed 12% (axit amin và glucoza) được bổ sung vào. Sau khi nuôi cấy trong 7 ngày, phần dịch nổi trên bề mặt được gom bằng cách ly tâm trong 30-40 phút ở tốc độ ít nhất là 4000m/s^2. Dung dịch được lọc vô trùng (thiết bị lọc kích cỡ 0,22µm), được bổ sung natri azit đến nồng độ cuối cùng là 0,01% (trọng lượng/thể tích), và duy trì ở nhiệt độ 4°C.

Phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử OX40 trime đã chia tách, cũng như IgG, được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng Protein A, sau đó là phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Đối với phương pháp sắc ký ái lực, phần dịch nổi trên bề mặt được nạp lên trên cột MabSelect Sure (CV = 5-15 mL, nhựa từ GE Healthcare) đã cân bằng với Natri Phosphat (20mM), dung dịch đệm Natri Xitrat (20mM) (độ pH = 7,5). Protein không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa với ít nhất 6 thể tích cột của cùng một dung dịch đệm. Protein gắn kết được rửa giải bằng cách sử dụng gradien tuyến tính (20 CV) hoặc bước rửa giải (8 CV) với natri xitrat 20mM, natri clorua 100mM, dung dịch đệm glyxin 100mM (độ pH = 3,0). Đối với gradien tuyến tính, bước rửa giải 4 thể tích cột bổ sung được áp dụng.

Độ pH của các đoạn đã gom được điều chỉnh bằng cách bổ sung 1/10 (thể tích/thể tích) của natri phosphat 0,5M, độ pH = 8,0. Protein được cô trước khi nạp lên trên cột HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) đã cân bằng với Histidin 20mM, natri clorua 140mM, dung dịch Tween20 0,01% (thể tích/thể tích) có độ pH = 6,0.

Nồng độ protein được xác định bằng cách đo mật độ quang học (OD) ở bước sóng 280nm, sử dụng hệ số tắt mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin. Độ tinh khiết và phân tử lượng của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime được hướng đích được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE khi có và không có chất khử (1,4-dithiotreitol 5mM) và nhuộm bằng Coomassie SimpleBlue™ SafeStain (Invitrogen USA) hoặc CE-SDS bằng cách sử dụng Caliper LabChip GXII (Perkin Elmer). Hàm lượng kết tụ của các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng cột phân tích loại trừ theo kích cỡ TSKgel G3000 SW XL (Tosoh) đã cân bằng trong K_2HPO_4 25 mM, NaCl 125mM, L-Arginin Monohydroclorua 200mM, NaN_3 0,02% (trọng lượng/thể tích), dung dịch đệm vận hành độ pH = 6,7 ở nhiệt độ 25°C.

Bảng 98 tóm tắt hiệu suất và hàm lượng monome cuối cùng của phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử OX40 trime đã chia tách hướng đích FAP, và của dòng mầm DP47 IgG1 PGLALA người (đối chứng F).

Bảng 98: Phân tích sinh hóa của thể dung hợp Fc (kih) của phối tử 4-1BB trime đã chia tách hướng đích CEA.

Cấu trúc	Monome [%] (giây)	Hiệu suất [mg/l]
Thể dung hợp Fc của phối tử OX40 trime đã chia tách hướng đích FAP(28H1) hóa trị một chứa CH-CL lai có các gốc mang điện (cấu trúc 6.1)	93,8	19,7
Dòng mầm DP47 IgG1 PGLALA người	100	50

Ví dụ 15

Đặc trưng hóa chức năng cho phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc chứa trime phối tử OX40 được hướng đích

15.1 Khả năng gắn kết với tế bào khối u biểu hiện FAP người

Khả năng gắn kết với bề mặt tế bào FAP được thử nghiệm bằng cách sử dụng các tế bào WM-266-4 (ATCC CRL-1676). 0,5 x 10^5 tế bào WM-266-4 được bổ sung vào từng lỗ của đĩa huyền phù tế bào đáy tròn có 96 lỗ (greiner bio-one, cellstar, Cat. No. 650185). Các tế bào này được nhuộm trong 120 phút ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối trong 50µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh 4°C (DPBS (Gibco by Life Technologies, Cat. No. 14190 326) w/BSA (0,1% thể tích/trọng lượng, Sigma-Aldrich, Cat. No. A9418) chứa cấu trúc kháng thể kháng Ox40 đã được chuẩn độ. Sau ba lần rửa bằng lượng dư của dung dịch đệm FACS, các tế bào này được nhuộm trong 45 phút ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối trong 25µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh 4°C chứa mảnh F(ab`)2 IgG dê đặc hiệu với mảnh Fcγ kháng IgG người tinh khiết ái lực liên hợp với floresxein isothioxyanat (FITC) (Jackson ImmunoResearch, Cat. No. 109 096 098).

Cuối cùng, các đĩa này được tạo lại huyền phù trong 90µL/lỗ dung dịch đệm FACS chứa 0,2µg/mL DAPI (Santa Cruz Biotec, Cat. No. Sc-3598) và đạt kết quả vào cùng ngày bằng cách sử dụng 5-laser LSR-Fortessa (BD Bioscience với phần mềm DIVA).

Như được thể hiện trên Fig.47A, phân tử gắn kết kháng nguyên dung hợp Fc (kih) của phối tử OX40 trime đã chia tách hướng đích FAP(28H1) hóa trị một (FAP-OX40L) mà không phải là đối chứng âm F gắn kết hiệu quả với tế bào đích biểu hiện FAP người. Giá trị EC_{50} để gắn kết với WM-266-4 FAP+ là [6,9nM].

15.2 Khả năng gắn kết với tế bào khối u âm tính với OX40 và FAP

Việc thiếu gắn kết với tế bào khối u âm tính với OX40 âm tính với FAP được thử nghiệm bằng cách sử dụng các tế bào màu đỏ A549 NucLight™ (Essenbioscience, Cat. No. 4491) biểu hiện protein huỳnh quang đỏ NucLight Red đã được giới hạn ở nhân để cho phép tách khỏi tế bào WM266-4 FAP+ người không được đánh dấu. A549 gốc (ATCC CCL-185) được tải nạp bằng Essen CellPlayer NucLight Red Lentivirut (Essenbioscience, Cat. No. 4476; EF1α, puromyxin) ở MOI bằng 3 (TU/tế bào) khi có mặt 8µg/mL polybren theo phương pháp Essen tiêu chuẩn.

Hỗn hợp của 5 x 10^4 tế bào WM266-4 không được đánh dấu và tế bào màu đỏ A549 NucLight™ Red không được đánh dấu trong dung dịch đệm FACS được bổ sung vào từng lỗ của đĩa huyền phù tế bào đáy tròn có 96 lỗ và thử nghiệm gắn kết được thực hiện như được mô tả trong phần 15.1.

Như được thể hiện trên Fig.47B, FAP-OX40L không gắn kết với tế bào khối u người âm tính với Ox40 âm tính với FAP.

15.3 Gắn kết với tế bào biểu hiện OX40 người: tế bào bạch cầu máu đơn nhân ngoại vi (PBMC) chưa qua thí nghiệm và được hoạt hóa ở người

Lớp đệm thu được từ trung tâm hiến máu Zürich. Để phân lập các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) sạch, lớp đệm này được pha loãng với cùng một thể tích của DPBS (Gibco by Life Technologies, Cat. No. 14190 326). Ống ly tâm polypropylen dung tích 50mL (TPP, Cat.-No. 91050) đã cấp 15mL Histopaque 1077 (SIGMA Life Science, Cat.-No. 10771, polysucroza và natri diatrizoat, được điều chỉnh đến mật độ bằng 1,077g/mL) và dung dịch lớp đệm được đặt bên trên Histopaque 1077. Các ống được ly tâm trong 30 phút ở tốc độ 4000m/s^2, nhiệt độ trong phòng, với gia tốc thấp và không nghỉ. Sau đó các PBMC được gom từ bề mặt chung, được rửa ba lần bằng DPBS và được tạo lại huyền phù trong môi trường tế bào T bao gồm môi trường RPMI 1640 (Gibco by Life Technology, Cat. No. 42401-042) đã cấp huyết thanh bào thai bò 10% (FBS, Gibco by Life Technology, Cat. No. 16000-044, Lot 941273, được chiếu xạ gama, không có mycoplasma và được bất hoạt bằng nhiệt ở nhiệt độ 56°C trong 35 phút), GlutaMAX I 1% (thể tích/thể tích) (GIBCO by Life Technologies, Cat. No. 35050 038), Natri-Pyruvat 1mM (SIGMA, Cat. No. S8636), axit amin không thiết yếu MEM 1% (thể tích/thể tích) (SIGMA, Cat.-No. M7145) và β-Mercaptoetanol 50µM (SIGMA, M3148).

PBMC được sử dụng trực tiếp sau khi phân lập (gắn kết trên PBMC người đang nghỉ) hoặc chúng được kích thích để nhận sự biểu hiện mạnh của Ox40 người trên bề mặt tế bào của các tế bào T (gắn kết trên PBMC người đã được hoạt hóa). Do đó các PBMC chưa qua thí nghiệm được nuôi cấy trong bốn ngày trong môi trường tế bào T đã cấp 200U/mL Proleukin (Novartis) và 2ug/mL PHA-L (Sigma-Aldrich, L2769-10) trong đĩa nuôi cấy mô có 6 lỗ và sau đó qua đêm trên đĩa nuôi cấy mô có 6 lỗ đã được phủ twừ trước [4ug/mL] CD3 kháng người (dòng vô tính OKT3, eBioscience, Ca.No. 16-0037-85) và [2ug/mL] CD28 kháng người (dòng vô tính CD28.2, eBioscience, Cat

No.16-0289-85] trong môi trường tế bào T đã cấp 200U/mL Proleukin ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5%.

Để phát hiện Ox40, PBMC người chưa qua thí nghiệm và PBMC người đã được hoạt hóa được trộn. Để có thể phân biệt PBMC người chưa qua thí nghiệm với PBMC người đã được hoạt hóa, các tế bào chưa qua thí nghiệm được đánh dấu trước thử nghiệm gắn kết bằng cách sử dụng thuốc nhuộm tăng sinh tế bào eFluor670 (eBioscience, Cat.-No.65-0840-85).

Để đánh dấu, các tế bào được thu gom, được rửa bằng DPBS đã được làm ấm từ trước (37°C) và được điều chỉnh đến mật độ tế bào bằng 1 x 10^7 tế bào/mL trong DPBS. Thuốc nhuộm tăng sinh tế bào eFluor670 (eBioscience, Cat.-No.65-0840-85) được bổ sung vào huyền phù chứa PBMC người chưa qua thí nghiệm ở nồng độ cuối cùng là 2,5mM và mật độ tế bào cuối cùng bằng 0,5 x 10^7 tế bào/mL trong DPBS. Sau đó các tế bào này được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Để dừng phản ứng đánh dấu, 4mL FBS đã bất hoạt bằng nhiệt được bổ sung vào và các tế bào này được rửa ba lần bằng môi trường tế bào T. Sau đó hỗn hợp tỷ lệ hai với một của 1 x 10^5 PBMC người đang nghỉ đánh dấu eFluor670 và 0,5 x 10^5 PBMC người đã hoạt hóa không được đánh dấu được bổ sung vào từng lỗ của đĩa huyền phù tế bào đáy tròn có 96 lỗ (greiner bio-one, cellstar, Cat. No. 650185).

Các tế bào này được nhuộm trong 120 phút ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối trong 50µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh 4°C chứa cấu trúc kháng thể kháng Ox40 đã được chuẩn độ. Sau ba lần rửa bằng lượng dư của dung dịch đệm FACS, các tế bào này được nhuộm trong 45 phút ở nhiệt độ 4°C trong bóng tối trong 25µL/lỗ dung dịch đệm FACS lạnh 4°C chứa hỗn hợp của CD4 kháng người được đánh dấu huỳnh quang (dòng vô tính RPA-T4, IgG1k chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 300532), CD8 kháng người (dòng vô tính RPa-T8, IgG1k chuột nhắt, BioLegend, Cat.-No. 3010441) và mảnh F(ab`)2 IgG dê đặc hiệu với mảnh Fcγ kháng IgG người tinh khiết ái lực liên hợp với floresxein isothioxyanat (FITC) (Jackson ImmunoResearch, Cat.-No. 109-096-098).

Cuối cùng các đĩa này được tạo lại huyền phù trong 90µL/lỗ dung dịch đệm FACS chứa 0,2µg/mL DAPI (Santa Cruz Biotec, Cat. No. Sc-3598) và đạt kết quả vào cùng ngày bằng cách sử dụng 5-laser LSR-Fortessa (BD Bioscience với phần mềm DIVA).

Như được thể hiện trên các hình vẽ Fig.48A và Fig.48 B, FAP-OX40L không gắn kết với các tế bào T CD4+ hoặc các tế bào T CD8+ nghỉ của người, mà âm tính đối với OX40. Ngược lại, FAP-OX40L lại gắn kết với tế bào T CD8+ hoặc tế bào T CD4+ đã được hoạt hóa, biểu hiện OX40. Khả năng gắn kết với các tế bào T CD4+ mạnh hơn nhiều so với gắn kết với các tế bào T CD8+. Các tế bào T CD8+ người đã được hoạt hóa chỉ biểu hiện một phần lượng OX40 phát hiện được trên các tế bào T CD4+ đã được hoạt hóa. Mức độ biểu hiện đối với OX40 phụ thuộc vào động học và độ bền kích thích và các điều kiện được tối ưu hóa ở đây để biểu hiện Ox40 trên các tế bào T CD4+ nhưng không biểu hiện trên các tế bào T CD8+. Như vậy, chỉ một mức biểu hiện OX40 nhỏ được cảm ứng trên các tế bào T CD8. Giá trị EC_{50} để gắn kết với tế bào T CD4+ hoặc tế bào T CD8+ dương tính với OX40 là [0,15nM].

15.4 Sự hoạt hóa NFκB trong tế bào HeLa biểu hiện OX40 người và gen báo cáo NFκB-luciferaza

Khả năng gắn kết chủ vận của Ox40 với phối tử của nó làm cảm ứng sự truyền tín hiệu xuôi dòng thông qua sự hoạt hóa của yếu tố nhân kappa B (NFκB) (A. D. Weinberg et al., J. Leukoc. Biol. 2004, 75(6), 962-972). Dòng tế bào báo cáo tái tổ hợp HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 được tạo ra để biểu hiện OX40 người trên bề mặt của nó. Ngoài ra, dòng tế bào này cũng giữ plasmit báo cáo chứa gen luciferaza dưới sự kiểm soát của đoạn gen tăng cường nhạy NFκB. Sự khởi phát Ox40 làm cảm ứng sự hoạt hóa phụ thuộc vào liều lượng của NFκB, mà hoán vị trong nhân, trong đó nó gắn kết trên gen tăng cường nhạy NFκB của plasmit báo cáo để làm tăng sự biểu hiện của luciferaza protein. Luciferaza xúc tác sự oxy hóa luciferin tạo ra oxyluciferin mà ánh sáng phát ra. Lượng này có thể được định lượng bằng thiết bị đo lượng ánh sáng phát ra. Như vậy, khả năng của các phân tử kháng Ox40 khác nhau trong việc cảm ứng sự hoạt hóa NFκB ở tế bào báo cáo HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 được phân tích dưới dạng số đo hoạt tính sinh học.

Các tế bào HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 bám dính được thu gom bằng cách sử dụng dung dịch đệm phân ly tế bào (Invitrogen, Cat.-No. 13151-014) trong 10 phút ở nhiệt độ 37°C. Các tế bào này được rửa một lần bằng DPBS và được điều chỉnh đến mật độ tế bào bằng $1,33x10^5$ trong môi trường thử nghiệm bao gồm MEM (Invitrogen, Cat.-No. 22561-021), PBS bất hoạt bằng nhiệt 10% (thể tích/thể tích), Natri-Pyruvat 1mM và axit amin không thiết yếu 1% (thể tích/thể tích). Các tế bào này được gieo cấy ở mật độ bằng

$0,2*10^5$ tế bào trong mỗi lỗ của đĩa nuôi cấy mô đáy phẳng màu trắng vô trùng có 96 lỗ có nắp (greiner bio-one, Cat. No. 655083) và duy trì qua đêm ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5% trong tủ ủ (Hera Cell 150).

Ngày tiếp theo, HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 được kích thích trong 5 giờ bằng cách bổ sung môi trường thử nghiệm chứa FAP-Ox40L đã được chuẩn độ hoặc đối chứng âm F. Để thử nghiệm tác dụng của siêu liên kết ngang trên kháng thể kháng Ox40, 25µL/lỗ môi trường chứa mảnh F(ab`)2 IgG dê đặc hiệu với mảnh Fcγ kháng IgG người của kháng thể thứ cấp (Jackson ImmunoResearch, 109-006-098) được bổ sung theo tỷ lệ 1:2 (kháng thể thứ cấp nhiều hơn gấp 2 lần so với kháng thể sơ cấp). Sau khi ủ, phần dịch nổi trên bề mặt được hút ra và các đĩa được rửa hai lần bằng DPBS. Việc định lượng lượng ánh sáng phát ra được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thử nghiệm luciferaza 100 và dung dịch đệm phân giải chất báo cáo (cả hai đều của Promega, Cat.-No. E4550 và Cat-No: E3971) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Nói một cách gắn gọn, các tế bào này được phân giải trong 10 phút ở nhiệt độ -20°C bằng cách bổ sung 30uL/lỗ 1x dung dịch đệm phân giải. Các tế bào được rã đông trong 20 phút ở nhiệt độ 37°C trước khi bổ sung chất thử nghiệm luciferaza cấp với lượng 90uL trong mỗi lỗ. Lượng ánh sáng phát ra được định lượng ngay lập tức bằng thiết bị đọc vi đĩa SpectraMax M5/M5e (Molecular Devices, USA) bằng cách sử dụng thời gian kết hợp 500ms, không có bất cứ thiết bị lọc nào để thu thập tất cả các bước sóng. Đơn vị ánh sáng tương đối được phát ra (URL) được hiệu chỉnh bằng lượng phát quang cơ sở của tế bào HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 và được vẽ biểu đồ dựa trên nồng độ kháng thể sơ cấp theo logarit bằng cách sử dụng Prism4 (Phần mềm GraphPad, Mỹ). Các đường cong được khớp bằng cách sử dụng đáp ứng liều lượng xích ma vốn có.

Như được thể hiện trên Fig.49, sự hoạt hóa NFkB phụ thuộc vào liều lượng có giới hạn dễ dàng được cảm ứng bằng cách bổ sung FAP -Ox40L (bên trái) vào dòng tế bào báo cáo. Siêu liên kết ngang của FAP -Ox40L với kháng thể thứ cấp đặc hiệu với IgG kháng người làm gia tăng mức cảm ứng sự hoạt hóa luciferaza qua trung gian NFκB theo cách phụ thuộc vào nồng độ (bên phải).

Do đó, các tác giả sáng chế thử nghiệm khả năng hoạt hóa NFkB của FAP -Ox40L có siêu liên kết ngang của các cấu trúc với các dòng tế bào khối u FAP+.

Dòng tế bào khối u được thử nghiệm là NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39. NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39 được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm dòng tế bào NIH/3T3 nguyên bào sợi phôi chuột nhắt (ATCC CRL-1658) bằng vectơ biểu hiện pETR4921 để biểu hiện huFAP trong điều kiện chọn lọc 1,5µg/mL Puromyxin. Mức biểu hiện FAP trên bề mặt được định lượng bằng cách sử dụng Quifikit (Dako Cat. No. K0078) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Kháng thể sơ cấp dùng để phát hiện sự biểu hiện FAP trên bề mặt tế bào là dòng vô tính phản ứng chéo F11-24 người/chuột nhắt (IgG1 chuột nhắt, Calbiochem, Ca. No. OP188). Mức biểu hiện trên bề mặt đối với NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39 là khoảng 90000 huFAP trong mỗi tế bào.

Như được mô tả trên đây, tế bào HeLa_hOx40_NFkB_Luc1 bám dính được nuôi cấy qua đêm ở mật độ tế bào bằng $0,2*10^5$ tế bào trong mỗi lỗ và được kích thích trong 5 giờ với môi trường thử nghiệm chứa FAP-Ox40L đã được chuẩn độ. Để thử nghiệm tác dụng siêu liên kết ngang bằng cách gắn kết FAP trên bề mặt tế bào, 25µL/lỗ môi trường chứa tế bào khối u FAP+ NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39 được nuôi cấy đồng thời với tỷ lệ 3 với 1 (tế bào khối u FAP+ nhiều hơn gấp ba lần so với tế bào báo cáo trong mỗi lỗ). NFκB đã hoạt hóa được định lượng bằng cách đo lượng ánh sáng phát ra bằng cách sử dụng hệ thử nghiệm luciferaza 100 và dung dịch đệm phân giải chất báo cáo (both Promega, Cat.-No. E4550 và Cat-No: E3971.

Như được thể hiện trên Fig.50A, sự có mặt của tế bào khối u biểu hiện FAP đã làm tăng mạnh mức cảm ứng sự hoạt hóa luciferaza qua trung gian NFκB khi FAP-Ox40L được bổ sung vào. Diện tích dưới đường cong của các đường cong phụ thuộc liều lượng đã vẽ biểu đồ tương ứng được định lượng dưới dạng chỉ thị cho khả năng chủ vận của từng cấu trúc. Như được thể hiện trên Fig.50A, sự có mặt của FAP biểu hiện trên bề mặt tế bào đảm bảo khả năng liên kết ngang cao hơn và nhờ đó tạo ra tác dụng chủ vận của FAP -Ox40L tốt hơn sau khi bổ sung kháng thể thứ cấp đặc hiệu Fc.

15.5 Đồng kích thích qua trung gian OX40 cho PBMC nghỉ ở người kích thích TCR cận tối ưu và siêu liên kết ngang với FAP bề mặt tế bào

Ví dụ 15.4 cho thấy rằng việc bổ sung tế bào khối u FAP+ có thể làm tăng mạnh hoạt tính NFkB được cảm ứng bởi OX40L hướng đích FAP ở dòng tế bào báo cáo dương tính với Ox40 người bằng cách tạo ra mức oligome hóa mạnh cho thụ thể OX40. Tương tự, các tác giả sáng chế thử nghiệm các cấu trúc FAP-OX40L khi có mặt các tế bào

NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39 về khả năng của chúng trong việc hỗ trợ sự kích thích TCR cận tối ưu của tế bào PBMC nghỉ ở người.

Chế phẩm PBMC người chứa (1) tế bào T CD4+ và CD8+ âm tính với Ox40 nghỉ và (2) tế bào trình diện kháng nguyên có các phân tử thụ thể Fc-γ khác nhau trên bề mặt tế bào của chúng, ví dụ, các tế bào B và các bạch cầu đơn nhân. Kháng thể kháng CD3 người thuộc isotyp IgG1 người có thể gắn kết ở phần Fc của nó với phân tử thụ thể Fc-γ có mặt và điều tiết sự hoạt hóa TCR kéo dài trên tế bào T CD4+ và CD8+ âm tính với Ox40 đang nghỉ. Sau đó các tế bào này bắt đầu biểu hiện Ox40 trong một vài giờ. Các hợp chất chủ vận chức năng kháng Ox40 có thể truyền tín hiệu thông qua thụ thể Ox40 có mặt trên tế bào T CD8+ và CD4+ đã được hoạt hóa và hỗ trợ sự kích thích qua trung gian TCR.

PBMC người đang nghỉ đánh dấu bằng CFSE được kích thích trong năm ngày với nồng độ cận tối ưu của kháng thể kháng CD3 khi có mặt các tế bào đã được chiếu xạ NIH/3T3-huFAP FAP+ dòng vô tính 39 và FAP-Ox40L đã được chuẩn độ. Tác dụng đến khả năng sống sót và sự tăng sinh của tế bào T được phân tích bằng cách theo dõi tổng số lượng tế bào và phần CFSE pha loãng trong các tế bào sống bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy.

Tế bào nguyên bào sợi phôi chuột nhắt NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39 (xem Ví dụ 15.4) được thu gom bằng cách sử dụng dung dịch đệm phân ly tế bào (Invitrogen, Cat.-No. 13151-014) trong 10 phút ở nhiệt độ 37°C. Các tế bào này được rửa một lần bằng DPBS. Các tế bào NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39 được nuôi cấy ở mật độ bằng $0,2*10^5$ tế bào trong mỗi lỗ trong môi trường tế bào T trong đĩa nuôi cấy mô bám dính vô trùng đáy tròn có 96 lỗ (TPP, Cat. No. 92097) qua đêm ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5% trong tủ ủ (Hera Cell 150). Ngày tiếp theo, chúng được chiếu xạ trong thiết bị chiếu xạ tia X bằng cách sử dụng liều 4500 RAD để ngăn chặn sự sinh trưởng quá mức sau đó của PBMC người nhờ dòng tế bào khối u.

PBMC người được phân lập bằng cách ly tâm mật độ ficoll như được mô tả trong Ví dụ 15.3. Sau đó các tế bào này được đánh dấu bằng CFSE ở mật độ tế bào bằng $1x10^6$ tế bào/ mL với CFDA-SE (Sigma-Aldrich, Cat.-No. 2188) ở nồng độ cuối cùng là [50nM] trong 10 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, các tế bào này được rửa hai lần bằng DPBS dư chứa FBS (10% thể tích/thể tích). Các tế bào đã được đánh dấu được cho nghỉ trong môi

trường tế bào T ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Sau đó, CFDA-SE không chuyển hóa được loại bỏ bằng hai bước rửa nữa với DPBS. PBMC người nghỉ đã được đánh dấu bằng CFSE được bổ sung vào từng lỗ ở mật độ bằng $0,5*10^5$ tế bào trong mỗi lỗ. Kháng thể kháng CD3 người (dòng vô tính V9, IgG1 người, được mô tả trong tài liệu Rodrigues et al., Int J Cancer Suppl 7, 45-50 (1992) và Patent Mỹ số 6054297) ở nồng độ cuối cùng là [20nM] và FAP-OX40L được bổ sung vào ở các nồng độ đã định. Các tế bào này được hoạt hóa trong năm ngày ở nhiệt độ 37°C và CO_2 5% trong tủ ủ (Hera Cell 150). Sau đó, các tế bào này được nhuộm bề mặt bằng kháng thể liên hợp thuốc nhuộm huỳnh quang CD4 kháng người (dòng vô tính RPA-T4, BioLegend, Cat.-No. 300532) và CD8 (dòng vô tính RPa-T8, BioLegend, Cat.-No. 3010441) trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau bước rửa bằng dung dịch đệm FACS, các tế bào này được tạo lại huyền phù trong 85µL/lỗ dung dịch đệm FACS và đạt kết quả bằng cách sử dụng thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy 5-laser Fortessa (BD Bioscience với phần mềm DIVA).

Như được thể hiện trên Fig.51, siêu liên kết ngang của cấu trúc FAP -OX40L với các tế bào NIH/3T3-huFAP dòng vô tính 39 có mặt đã thúc đẩy mạnh mẽ sự tăng sinh (xem biểu đồ "Sự kiện" ở phía trên) và khả năng sống sót (xem biểu đồ "Tăng sinh" ở phía dưới) trong tế bào T CD4 và tế bào T CD8 người đã được kích thích TCR. Sự biểu hiện OX40 trên các tế bào T CD8+ ở người thấp đi, theo đó tác dụng chủ vận của FAP -OX40L trên các tế bào T CD8+ bớt mạnh hơn so với trên các tế bào T CD4+.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Ascierto, P. A., E. Simeone, M. Sznol, Y. X. Fu, and I. Melero (2010), Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. Semin Oncol 37:508-516.

Aggarwal B.B. (2003), Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat. Rev. Immunol. 3(9),745-56.

Banner D. et al (1993), Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. Cell 73, 431-445.

Bodmer J., Schneider P. and Tschopp, J. (2002), The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends in Biochemical Sciences 27(1), 19-26.

Broll, K., Richter, G., Pauly, S., Hofstaedter, F., and Schwarz, H. (2001). CD137 expression in tumor vessel walls. High correlation with malignant tumors. Am J Clin Pathol 115, 543-549.

Buechele, C., Baessler, T., Schmiedel, B.J., Schumacher, C.E., Grosse-Hovest, L., Rittig, K., and Salih, H.R. (2012). 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia. Eur J Immunol 42, 737-748.

Choi, B.K., Kim, Y.H., Kwon, P.M., Lee, S.C., Kang, S.W., Kim, M.S., Lee, M.J., and Kwon, B.S. (2009). 4-1BB functions as a survival factor in dendritic cells. J Immunol 182, 4107-4115.

Cuadros, C., Dominguez, A.L., Lollini, P.L., Croft, M., Mittler, R.S., Borgstrom, P., and Lustgarten, J. (2005). Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic tumors in combination with anti-OX40 and anti-4-1BB monoclonal antibodies induces T cell-mediated protective immunity in Her-2/neu transgenic mice. Int J Cancer 116, 934-943.

Curran, M.A., Kim, M., Montalvo, W., Al-Shamkhani, A., and Allison, J.P. (2011). Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production. PLoS One 6, e19499.

Diehl, L., van Mierlo, G.J., den Boer, A.T., van der Voort, E., Fransen, M., van Bostelen, L., Krimpenfort, P., Melief, C.J., Mittler, R., Toes, R.E., and Offringa, R. (2002). *In vivo* triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the present of an intact CD28 costimulatory pathway. J Immunol 168, 3755-3762.

Dubrot, J., Milheiro, F., Alfaro, C., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Perez-Gracia, J.L., Morales-Kastresana, A., Romero-Trevejo, J.L., Ochoa, M.C., Hervas-Stubbs, S., et al. (2010). Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of Liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. Cancer Immunol Immunother 59, 1223-1233.

Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. Int Immunol 14, 275-286.

Guo, Z., Cheng, D., Xia, Z., Luan, M., Wu, L., Wang, G., and Zhang, S. (2013). Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. J Transl Med 11, 215.

Heinisch, I.V., Daigle, I., Knopfli, B., and Simon, H.U. (2000). CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. Eur J Immunol 30, 3441-3446.

Hornig, N., Kermer, V., Frey, K., Diebolder, P., Kontermann, R.E., Mueller, D. (2012), Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion protein for targeted cancer immunotherapy. J. Immunother. 35, 418-429.

Ju, S.A., Cheon, S.H., Park, S.M., Tam, N.Q., Kim, Y.M., An, W.G., and Kim, B.S. (2008). Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-1BB monoclonal antibody in mice. Int J Cancer 122, 2784-2790.

Kienzle, G., and von Kempis, J. (2000). CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. Int Immunol 12, 73-82.

Kim, D.H., Chang, W.S., Lee, Y.S., Lee, K.A., Kim, Y.K., Kwon, B.S., and Kang, C.Y. (2008). 4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. J Immunol 180, 2062-2068.

Kim, Y.H., Choi, B.K., Oh, H.S., Kang, W.J., Mittler, R.S., and Kwon, B.S. (2009). Mechanisms involed in synergistic anticancer effects of anti-4-1BB and cyclophosphamide therapy. Mol Cancer Ther 8, 469-478.

Kwon, B.S., and Weissman, S.M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 1963-1967.

Lee, H., Park, H.J., Sohn, H.J., Kim, J.M., and Kim, S.J. (2011). Combinatorial therapy for liver metastatic colon cancer: dendritic cell vaccine and low-dose agonistic anti-4-1BB antibody co-stimulatory signal. J Surg Res 169, e43-50.

Levitsky, V., de Campos-Lima, P.O., Frisan, T., and Masucci, M.G. (1998). The clonal composition of peptide-specific oligoclonal CTL repertoire selected in response to persistent EBV infection is stable over time. J Immunol 161, 594-601.

Li, F., and Ravetch, J.V. (2011). Inhibitory Fcgamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. Science 333, 1030-1034.

Lin, W., Voskens, C.J., Zhang, X., Schindler, D.G., Wood, A., Burch, E., Wei, Y., Chen, L., Tian, G., Tamada, K., et al. (2008). Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. Blood 112, 699-707.

Melero, I., Johnston, J.V., Shufford, W.W., Mittler, R.S., and Chen, L. (1998). NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal. Cell Immunol 190, 167-172.

Melero, I., Shuford, W.W., Newby, S.A., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Hellstrom, K.E., Mittler, R.S., and Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. Nat Med 3, 682-685.

Merchant, A.M., Zhu, Z., Yuan, J.Q., Goddard, A., Adams, C.W., Presta, L.G., and Carter, P. (1998). An efficient route to human bispecific IgG. Nat Biotechnol 16, 677-681.

Morales-Kastresana, A., Sanmamed, M.F., Rodriguez, I., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Labiano, S., Hervas-Stubbs, S., Sangro, B., Ochoa, C., Rouzaut, A., et al. (2013). Combined immunostimulatory monoclonal antibodies extend survival in an aggressive transgenic hepatocellular carcinoma mouse model. Clin Cancer Res 19, 6151-6162.

Mueller, D., Frey, K., Kontermann, R.E. (2008), A novel antibody-4-1BBl fusion protein for targeted costimulation in cancer immunotherapy, J. Immunother. 31, 714-722.

Murillo, O., Dubrot, J., Palazon, A., Arina, A., Azpilikueta, A., Alfaro, C., Solano, S., Ochoa, M.C., Berasain, C., Gabari, I., et al. (2009). *In vivo* depletion of DC impairs the anti-tumor effect of agonistic anti-CD137 mAb. Eur J Immunol 39, 2424-2436.

Narazaki, H., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G., and Chen, L. (2010). CD137 agonist antibody prevents cancer recurrence: contribution of CD137 on both hematopoietic and nonhematopoietic cells. Blood 115, 1941-1948.

Nishimoto, H., Lee, S.W., Hong, H., Potter, K.G., Maeda-Yamamoto, M., Kinoshita, T., Kawakami, Y., Mittler, R.S., Kwon, B.S., Ware, C.F., et al. (2005). Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor. Blood 106, 4241-4248.

Olofsson, P.S., Soderstrom, L.A., Wagsater, D., Sheikine, Y., Ocaya, P., Lang, F., Rabu, C., Chen, L., Rudling, M., Aukrust, P., et al. (2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. Circulation 117, 1292-1301.

Palazon, A., Teijeira, A., Martinez-Forero, I., Hervas-Stubbs, S., Roncal, C., Penuelas, I., Dubrot, J., Morales-Kastresana, A., Perez-Gracia, J.L., Ochoa, M.C., et al. (2011). Agonist anti-CD137 mAb act on tumor endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes. Cancer Res 71, 801-811.

Schwarz, H., Valbracht, J., Tuckwell, J., von Kempis, J., and Lotz, M. (1995). ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. Blood 85, 1043-1052.

Shao, Z., and Schwarz, H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. J Leukoc Biol 89, 21-29.

Shi, W., and Siemann, D.W. (2006). Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. Anticancer Res 26, 3445-3453.

Simeone, E., and Ascierto, P.A. (2012). Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-PD1. J Immunotoxicol 9, 241-247.

Snell, L.M., Lin, G.H., McPherson, A.J., Moraes, T.J., and Watts, T.H. (2011). T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy. Immunol Rev 244, 197-217.

Stagg, J., Loi, S., Divisekera, U., Ngiow, S.F., Duret, H., Yagita, H., Teng, M.W., and Smyth, M.J. (2011). Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 7142-7147.

Teng, M.W., Sharkey, J., McLaughlin, N.M., Exley, M.A., and Smyth, M.J. (2009). CD1d-based combination therapy eradicates established tumors in mice. J Immunol 183, 1911-1920.

von Kempis, J., Schwarz, H., and Lotz, M. (1997). Differentiation-dependent and stimulus-specific expression of ILA, the human 4-1BB-homologue, in cells of mesenchymal origin. Osteoarthritis Cartilage 5, 394-406.

Wei, H., Zhao, L., Li, W., Fan, K., Qian, W., Hou, S., Wang, H., Dai, M., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., and Guo, Y. (2013). Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin. PLoS One 8, e84927.

Wilcox, R.A., Chapoval, A.I., Gorski, K.S., Otsuji, M., Shin, T., Flies, D.B., Tamada, K., Mittler, R.S., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., and Chen, L. (2002). Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. J Immunol 168, 4262-4267.

Wilcox, R.A., Tamada, K., Flies, D.B., Zhu, G., Chapoval, A.I., Blazar, B.R., Kast, W.M., and Chen, L. (2004). Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes *in vivo*. Blood 103, 177-184.

Zhang, N., Sadun, R.E., Arias, R.S., Flanagan, M.L., Sachsman, S.M., Nien, Y, Khawli, L.A., Hu, P., Epstein, A.L. (2007). Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumors. Clin. Cancer Res. 13, 2758-2767.

Zhang, X., Voskens, C.J., Sallin, M., Maniar, A., Montes, C.L., Zhang, Y., Lin, W., Li, G., Burch, E., Tan, M., et al. (2010). CD137 promotes proliferation and survival of human B cells. J Immunol 184, 787-795.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF bao gồm:

(a) ít nhất một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ, polypeptit thứ nhất chứa miền hằng định chuỗi nặng thứ nhất (CH1) hoặc miền hằng định chuỗi nhẹ (CL) và polypeptit thứ hai chứa miền CL hoặc miền CH1, một cách tương ứng, trong đó polypeptit thứ hai được liên kết với polypeptit thứ nhất bằng liên kết disulfua giữa miền CH1 và miền CL, và trong đó polypeptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF được chọn từ 4-1BBL chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO:374 và SEQ ID NO:375 hoặc OX40L chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54 mà được nối với nhau và với miền CH1 hoặc miền CL bằng tác nhân liên kết peptit và trong đó polypeptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF được chọn từ 4-1BBL chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO:374 và SEQ ID NO:375 hoặc OX40L chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54 được nối qua tác nhân liên kết peptit với miền CL hoặc miền CH1 của polypeptit đã nêu,

và còn bao gồm

(c) miền Fc gồm cấu trúc siêu phân tử thứ nhất và cấu trúc siêu phân tử thứ hai có thể liên kết ổn định.

2. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm 1, trong đó thành viên họ phối tử TNF đồng kích thích sự hoạt hóa tế bào T ở người.

3. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm 1 hoặc 2, trong đó thành viên họ phối tử TNF là 4-1BBL chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO:374 và SEQ ID NO:375.

4. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:96.

5. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:96.

6. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, bao gồm

(a) ít nhất một phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.

7. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng nguyên tế bào đích được chọn từ nhóm bao gồm protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP), chondroitin sulfat proteoglycan liên quan đến u hắc sắc tố (MCSP), thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu mô (EGFR), kháng nguyên caxinom phôi (CEA), CD19, CD20 và CD33.

8. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng nguyên tế bào đích là protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP).

9. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:100, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:101, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:102, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:103, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:11 hoặc

SEQ ID NO:104, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:105.

10. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc trong đó gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107.

11. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó miền Fc là IgG, cụ thể là miền Fc IgG1 hoặc miền Fc IgG4.

12. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó miền Fc là miền Fc IgG1 bao gồm cải biến thay thế axit amin ở các vị trí 234 và 235 (đánh số theo EU) và/hoặc 329 (đánh số theo EU).

13. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

peptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF được chọn từ 4-1BBL chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO:374 và SEQ ID NO:375 hoặc OX40L chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54 nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất được dung hợp ở đầu tận C của nó với chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ thứ hai bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai,

và peptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu được chọn từ 4-1BBL chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO:374 và SEQ ID NO:375 hoặc OX40L chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54 được dung hợp ở đầu tận C của nó với chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ thứ hai, một cách tương ứng, bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

14. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó peptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF được chọn từ 4-1BBL chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO:374 và SEQ ID NO:375 hoặc OX40L chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54 được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 mà là một phần của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai,

và peptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu được chọn từ 4-1BBL chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO:374 và SEQ ID NO:375 hoặc OX40L chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54 được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL mà là một phần của chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

15. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó peptit thứ nhất bao gồm hai miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF được chọn từ 4-1BBL chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO:374 và SEQ ID NO:375 hoặc OX40L chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54 được nối với nhau bằng tác nhân liên kết peptit thứ nhất dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CL mà là một phần của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit thứ hai,

và peptit thứ hai bao gồm một miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF đã nêu được chọn từ 4-1BBL chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO: 373, SEQ ID NO:374 và SEQ ID NO:375 hoặc OX40L chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54 được dung hợp ở đầu tận C của nó với miền CH1 mà là một phần của chuỗi nhẹ bằng tác nhân liên kết peptit thứ ba.

16. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm 14 hoặc 15, trong đó trong miền CL liền kề với thành viên họ phối tử TNF được chọn từ 4-1BBL và OX40L có axit amin ở vị trí 123 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng arginin (R)

và axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng lysin (K), và trong đó trong miền CH1 liền kề với thành viên họ phối tử TNF được chọn từ 4-1BBL và OX40L có axit amin ở vị trí 147 (đánh số theo EU) và ở vị trí 213 (đánh số theo EU) đã được thay thế bằng axit glutamic (E).

17. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm

(a) chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nhẹ thứ nhất, cả hai chuỗi này đều bao gồm phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích,

(b) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99, và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.

18. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:111 và SEQ ID NO:113, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112 và SEQ ID NO:114.

19. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 và 15, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm (i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119 và SEQ ID NO:173, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120 và SEQ ID NO:174.

20. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, 15 và 19, được chọn từ nhóm bao gồm:

a) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:164, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:115 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:116;

b) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:164, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:117 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:118;

c) phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:123 và chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:124;

d) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:164, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120;

e) phân tử bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:164, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:173 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:174; và

f) phân tử bao gồm hai chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:126 và chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:127.

21. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, 15, 19 và 20, bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin

của SEQ ID NO:164, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:125, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120.

22. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 và 11 đến 17, trong đó kháng nguyên tế bào đích là CEA.

23. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, 11 đến 17, và 22, trong đó phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:321, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:322, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:323, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:324, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:325, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:326.

24. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, 11 đến 17, 22 và 23, trong đó phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CEA bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:330.

25. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, 11 đến 17 và 22 đến 24, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:330,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:111 và SEQ ID NO:113, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112 và SEQ ID NO:114.

26. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, 11 đến 17 và 22 đến 24, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:329 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:330,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119 và SEQ ID NO:173, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120 và SEQ ID NO:174.

27. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, 11 đến 17, 22 đến 24 và 26, bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:333, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:334, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120.

28. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, 7 đến 16 và 22 đến 24, trong đó thành viên họ phối tử TNF là OX40L chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54.

29. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, 7 đến 16, 22 đến 24 và 28, trong đó miền ngoài của thành viên họ phối tử TNF chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53.

30. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, 7 đến 16, 22 đến 24 và 28, bao gồm

(a) ít nhất một gốc có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên tế bào đích và

(b) polypeptit thứ nhất và polypeptit thứ hai được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này khác biệt ở chỗ polypeptit thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:371 hoặc SEQ ID:372 và ở chỗ polypeptit thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 hoặc SEQ ID NO:54.

31. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, 7 đến 16, và 28 đến 30, trong đó kháng nguyên tế bào đích là protein hoạt hóa nguyên bào sợi (FAP) và phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với FAP bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:100, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:101, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:102, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:103, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:11 hoặc

SEQ ID NO:104, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO:105.

32. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, 7 đến 16 và 28 đến 31, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:106 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:107,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:355, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:356.

33. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng nguyên tế bào đích là CD19.

34. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 hoặc 33, trong đó phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm miền VH bao gồm (i) CDR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:195 hoặc SEQ ID NO:252, (ii) CDR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:196 hoặc SEQ ID NO:253, và (iii) CDR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:197 hoặc SEQ ID NO:254, và miền VL bao gồm (iv) CDR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:198 hoặc SEQ ID NO:249, (v) CDR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:199 hoặc SEQ ID NO:250, và (vi) CDR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:200 hoặc SEQ ID NO:251.

35. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 hoặc 33 hoặc 34, trong đó phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202 hoặc trong đó phân tử Fab có khả năng gắn kết đặc hiệu với CD19 bao gồm chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự

axit amin của SEQ ID NO:357 và chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358.

36. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 hoặc 33 đến 35, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:111 và SEQ ID NO:113, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:112 và SEQ ID NO:114.

37. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 hoặc 33 đến 35, trong đó phân tử gắn kết kháng nguyên này bao gồm

(i) chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:201 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:202 hoặc

chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:357 và chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VH chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:358,

(ii) chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:119 và SEQ ID NO:173, và

(iii) chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:120 và SEQ ID NO:174.

38. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 hoặc 33 đến 35, bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:205, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID

NO:206, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120.

39. Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 hoặc 33 đến 35, bao gồm chuỗi nặng thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:306, chuỗi nhẹ thứ nhất chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:279, chuỗi nặng thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:119 và chuỗi nhẹ thứ hai chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:120.

40. Polynucleotit đã phân lập mã hóa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 39.

41. Vectơ, cụ thể là vectơ biểu hiện, bao gồm polynucleotit đã phân lập theo điểm 40.

42. Tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit đã phân lập theo điểm 40 hoặc vectơ theo điểm 41.

43. Phương pháp sản xuất phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 39, bao gồm các bước:

(i) nuôi cấy tế bào vật chủ theo điểm 42 trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện phân tử gắn kết kháng nguyên, và

(ii) thu hồi phân tử gắn kết kháng nguyên này.

44. Dược phẩm chứa phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime phối tử họ TNF theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 39 và ít nhất một tá dược dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Phân tử gắn kết kháng nguyên chứa trime của phối tử họ TNF, polynucleotit được phân lập mã hóa phân tử này, dược phẩm chứa phân tử này và phương pháp sản xuất phân tử này

<130> P32429-WO

<150> EP14193260.8
<151> 2014-11-14

<150> EP15183736.6
<151> 2015-09-03

<150> EP15188142.2
<151> 2015-10-02

<160> 375

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 184
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
180

<210> 2
<211> 170
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
20 25 30

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
35 40 45

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
50 55 60

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
65 70 75 80

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
85 90 95

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
100 105 110

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
115 120 125

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
130 135 140

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
145 150 155 160

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165 170

<210> 3
<211> 175
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
50 55 60

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165 170 175

<210> 4
<211> 203
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190

Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
195 200

<210> 5
<211> 378
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) được nối bởi (G4S)2 với hu 4-1BBL (71-254)

<400> 5

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val

130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
370 375

<210> 6
<211> 194
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) cộng (G4S)2

<400> 6

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala

165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-H1

<400> 7

Ser His Ala Met Ser
1 5

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-H2

<400> 8

Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-H3

<400> 9

Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-L1

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-L2

<400> 11

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(28H1) CDR-L3

<400> 12

Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro Pro Thr
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit(G4S)2

<400> 13

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

<210> 14
<211> 718
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime cộng CH1 cộng chuỗi khóa Fc

<400> 14

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
385 390 395 400

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
405 410 415

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
420 425 430

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

435 440 445

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
450 455 460

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
465 470 475 480

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
485 490 495

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
500 505 510

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
515 520 525

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
530 535 540

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
545 550 555 560

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
565 570 575

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
580 585 590

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
595 600 605

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
610 615 620

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
625 630 635 640

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
645 650 655

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
660 665 670

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
675 680 685

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
690 695 700

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 15
<211> 301
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) -CL

<400> 15

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val

130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
195 200 205

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

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
225 230 235 240

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
245 250 255

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
260 265 270

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
275 280 285

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
290 295 300

<210> 16
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(28H1) VH

<400> 16

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(28H1) VL

<400> 17

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 Arg Ser
20 25 30

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

Ile Ile Gly Ala Ser Thr 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 Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 18
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ổ Fc của chuỗi nặng FAP(28H1)

<400> 18

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn 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 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 Gly Lys
435 440 445

<210> 19
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ FAP(28H1)

<400> 19

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 Arg Ser
20 25 30

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

Ile Ile Gly Ala Ser Thr 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 Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 20
<211> 760
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val
1 5 10 15

Leu Ala Leu Leu Val Met Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val His
20 25 30

Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
35 40 45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe Pro Asn Trp Ile Ser Gly
50 55 60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys
85 90 95

Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
100 105 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
115 120 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn
130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145 150 155 160

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
165 170 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile
180 185 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
195 200 205

Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala
210 215 220

Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225 230 235 240

Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
245 250 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro
260 265 270

Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met Ile Ala Ser
275 280 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr Asp Glu Arg Val
290 295 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305 310 315 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln

325 330 335

Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
340 345 350

Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
355 360 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
370 375 380

Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile
385 390 395 400

Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
405 410 415

Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr
420 425 430

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
435 440 445

Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
450 455 460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465 470 475 480

Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
485 490 495

Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys Leu Glu
500 505 510

Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
515 520 525

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
530 535 540

Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Ser Tyr
545 550 555 560

Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
565 570 575

Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu
580 585 590

Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
595 600 605

Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
610 615 620

Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
625 630 635 640

Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
645 650 655

Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
660 665 670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu
725 730 735

Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu
740 745 750

Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 21
<211> 748
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền ngoài hu FAP+đuôi poly-lys+đuôi his_6

<400> 21

Arg Pro Ser Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
35 40 45

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
50 55 60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
100 105 110

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
165 170 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
195 200 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile
225 230 235 240

Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
245 250 255

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260 265 270

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
290 295 300

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile
325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
435 440 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
450 455 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
465 470 475 480

Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
515 520 525

Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
530 535 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705 710 715 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 22
<211> 2244
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> miền ngoài hu FAP+đuôi poly-lys+ đuôi his_6

<400> 22
cgcccttcaa gagttcataa ctctgaagaa aatacaatga gagcactcac actgaaggat 60

attttaaatg gaacattttc ttataaaaca ttttttccaa actggatttc aggacaagaa 120

tatcttcatc aatctgcaga taacaatata gtactttata atattgaaac aggacaatca 180

tataccattt tgagtaatag aaccatgaaa agtgtgaatg cttcaaatta cggcttatca 240

cctgatcggc aatttgtata tctagaaagt gattattcaa agctttggag atactcttac 300

acagcaacat attacatcta tgaccttagc aatggagaat ttgtaagagg aaatgagctt 360

cctcgtccaa ttcagtattt atgctggtcg cctgttggga gtaaattagc atatgtctat 420

caaaacaata tctatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaaat aacatttaat 480

ggaagagaaa ataaaatatt taatggaatc ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt 540

gctacaaaat atgctctctg gtggtctcct aatggaaaat ttttggcata tgcggaattt 600

aatgatacgg atataccagt tattgcctat tcctattatg gcgatgaaca atatcctaga 660

acaataaata ttccataccc aaaggctgga gctaagaatc ccgttgttcg gatatttatt 720

atcgatacca cttaccctgc gtatgtaggt ccccaggaag tgcctgttcc agcaatgata 780

gcctcaagtg attattattt cagttggctc acgtgggtta ctgatgaacg agtatgtttg 840

cagtggctaa aaagagtcca gaatgtttcg gtcctgtcta tatgtgactt cagggaagac 900

tggcagacat gggattgtcc aaagacccag gagcatatag aagaaagcag aactggatgg 960

gctggtggat tctttgtttc aacaccagtt ttcagctatg atgccatttc gtactacaaa 1020

atatttagtg acaaggatgg ctacaaacat attcactata tcaaagacac tgtggaaaat 1080

gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccataaata tattcagagt aacacaggat 1140

tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa gaataccctg gaagaagaaa catctacaga 1200

attagcattg gaagctatcc tccaagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa 1260

aggtgccaat attacacagc aagtttcagc gactacgcca agtactatgc acttgtctgc 1320

tacggcccag gcatccccat ttccaccctt catgatggac gcactgatca agaaattaaa 1380

atcctggaag aaaacaagga attggaaaat gctttgaaaa atatccagct gcctaaagag 1440

gaaattaaga aacttgaagt agatgaaatt actttatggt acaagatgat tcttcctcct 1500

caatttgaca gatcaaagaa gtatcccttg ctaattcaag tgtatggtgg tccctgcagt 1560

cagagtgtaa ggtctgtatt tgctgttaat tggatatctt atcttgcaag taaggaaggg 1620

atggtcattg ccttggtgga tggtcgagga acagctttcc aaggtgacaa actcctctat 1680

gcagtgtatc gaaagctggg tgtttatgaa gttgaagacc agattacagc tgtcagaaaa 1740

ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaaaaa agaatagcca tatggggctg gtcctatgga 1800

ggatacgttt catcactggc ccttgcatct ggaactggtc ttttcaaatg tggtatagca 1860

gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcgtctgtct acacagagag attcatgggt 1920

ctcccaacaa aggatgataa tcttgagcac tataagaatt caactgtgat ggcaagagca 1980

gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040

tttcaaaact cagcacagat tgctaaagct ctggttaatg cacaagtgga tttccaggca 2100

atgtggtact ctgaccagaa ccacggctta tccggcctgt ccacgaacca cttatacacc 2160

cacatgaccc acttcctaaa gcagtgtttc tctttgtcag acggcaaaaa gaaaaagaaa 2220

aagggccacc accatcacca tcac 2244

<210> 23
<211> 761
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23

Met Lys Thr Trp Leu Lys Thr Val Phe Gly Val Thr Thr Leu Ala Ala
1 5 10 15

Leu Ala Leu Val Val Ile Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val Tyr
20 25 30

Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
35 40 45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Tyr Phe Pro Asn Trp Ile Ser Glu
50 55 60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp Asn Ile Val Phe Tyr Asn
65 70 75 80

Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu Ser Asn Ser Thr Met Lys
85 90 95

Ser Val Asn Ala Thr Asp Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
100 105 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
115 120 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Tyr
130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145 150 155 160

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
165 170 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Glu Asn Arg Ile
180 185 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
195 200 205

Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Val
210 215 220

Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225 230 235 240

Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
245 250 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile Val Asp Thr Thr Tyr Pro
260 265 270

His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val Pro Glu Met Ile Ala Ser
275 280 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Ser Ser Glu Arg Val
290 295 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305 310 315 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp Glu Cys Pro Lys Asn Gln
325 330 335

Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
340 345 350

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
355 360 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
370 375 380

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

Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
405 410 415

Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser
420 425 430

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
435 440 445

Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
450 455 460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465 470 475 480

Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
485 490 495

Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys Leu Lys
500 505 510

Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
515 520 525

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
530 535 540

Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Thr Tyr
545 550 555 560

Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
565 570 575

Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His Ala Val Tyr Arg Lys Leu
580 585 590

Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
595 600 605

Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
610 615 620

Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
625 630 635 640

Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
645 650 655

Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
660 665 670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Ile
725 730 735

Ser Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe
740 745 750

Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 24
<211> 749
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền ngoài FAP chuột+đuôi poly-lys+đuôi his_6

<400> 24

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

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Tyr Phe
20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Glu Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp
35 40 45

Asn Ile Val Phe Tyr Asn Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu
50 55 60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly
100 105 110

Glu Phe Val Arg Gly Tyr Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr
145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Arg Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
165 170 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly
180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Val Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile
195 200 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile
225 230 235 240

Val Asp Thr Thr Tyr Pro His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val
245 250 255

Pro Glu Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260 265 270

Val Ser Ser Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp
290 295 300

Glu Cys Pro Lys Asn Gln Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr
325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365

Trp Glu Ala Ile Tyr Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Asn Ser Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys
420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser
435 440 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu
450 455 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val
465 470 475 480

Glu Ile Lys Lys Leu Lys Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met
485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala
515 520 525

Val Asn Trp Ile Thr Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala
530 535 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His

545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr
565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile
580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Ile Leu Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr
705 710 715 720

Thr His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 25
<211> 2247
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền ngoài FAP chuột+đuôi poly-lys+đuôi his_6

<400> 25

cgtccctcaa gagtttacaa acctgaagga aacacaaaga gagctcttac cttgaaggat 60

attttaaatg gaacattctc atataaaaca tattttccca actggatttc agaacaagaa 120

tatcttcatc aatctgagga tgataacata gtattttata atattgaaac aagagaatca 180

tatatcattt tgagtaatag caccatgaaa agtgtgaatg ctacagatta tggtttgtca 240

cctgatcggc aatttgtgta tctagaaagt gattattcaa agctctggcg atattcatac 300

acagcgacat actacatcta cgaccttcag aatggggaat ttgtaagagg atacgagctc 360

cctcgtccaa ttcagtatct atgctggtcg cctgttggga gtaaattagc atatgtatat 420

caaaacaata tttatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaaat aacttatact 480

ggaagagaaa atagaatatt taatggaata ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt 540

gccacaaaat atgctctttg gtggtctcca gatggaaaat ttttggcata tgtagaattt 600

aatgattcag atataccaat tattgcctat tcttattatg gtgatggaca gtatcctaga 660

actataaata ttccatatcc aaaggctggg gctaagaatc cggttgttcg tgtttttatt 720

gttgacacca cctaccctca ccacgtgggc ccaatggaag tgccagttcc agaaatgata 780

gcctcaagtg actattattt cagctggctc acatgggtgt ccagtgaacg agtatgcttg 840

cagtggctaa aaagagtgca gaatgtctca gtcctgtcta tatgtgattt cagggaagac 900

tggcatgcat gggaatgtcc aaagaaccag gagcatgtag aagaaagcag aacaggatgg 960

gctggtggat tctttgtttc gacaccagct tttagccagg atgccacttc ttactacaaa 1020

atatttagcg acaaggatgg ttacaaacat attcactaca tcaaagacac tgtggaaaat 1080

gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccatatata tattccgcgt aacacaggat 1140

tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa ggttaccctg gaagaagaaa catctacaga 1200

attagcattg gaaactctcc tccgagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa 1260

aggtgccaat attacacagc aagtttcagc tacaaagcca agtactatgc actcgtctgc 1320

tatggccctg gcctccccat ttccaccctc catgatggcc gcacagacca agaaatacaa 1380

gtattagaag aaaacaaaga actggaaaat tctctgagaa atatccagct gcctaaagtg 1440

gagattaaga agctcaaaga cgggggactg actttctggt acaagatgat tctgcctcct 1500

cagtttgaca gatcaaagaa gtacccttttg ctaattcaag tgtatggtgg tccttgtagc 1560

cagagtgtta agtctgtgtt tgctgttaat tggataactt atctcgcaag taaggagggg 1620

atagtcattg ccctggtaga tggtcggggc actgctttcc aaggtgacaa attcctgcat 1680

gccgtgtatc gaaaactggg tgtatatgaa gttgaggacc agctcacagc tgtcagaaaa 1740

ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaagaa agaatagcca tatggggctg gtcctacgga 1800

ggttatgttt catccctggc ccttgcatct ggaactggtc ttttcaaatg tggcatagca 1860

gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcatctatct actcagagag attcatgggc 1920

ctcccaacaa aggacgacaa tctcgaacac tataaaaatt caactgtgat ggcaagagca 1980

gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040

tttcagaact cagcacagat tgctaaagct ttggttaatg cacaagtgga tttccaggcg 2100

atgtggtact ctgaccagaa ccatggtata ttatctgggc gctcccagaa tcatttatat 2160

acccacatga cgcacttcct caagcaatgc ttttctttat cagacggcaa aaagaaaaag 2220

aaaaagggcc accaccatca ccatcac 2247

<210> 26
<211> 748
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền ngoài FAP khỉ đuôi dài+đuôi poly-lys+đuôi his_6

<400> 26

Arg Pro Pro Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe
20 25 30

Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn
35 40 45

Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu
50 55 60

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

Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp
85 90 95

Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly
100 105 110

Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys
115 120 125

Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn
145 150 155 160

Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu
165 170 175

Glu Glu Met Leu Ala Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly
180 185 190

Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile
195 200 205

Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile
210 215 220

Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Phe Val Arg Ile Phe Ile
225 230 235 240

Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val
245 250 255

Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp
260 265 270

Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn
275 280 285

Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp
290 295 300

Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp
305 310 315 320

Ala Gly Gly Phe Phe Val Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile

325 330 335

Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His
340 345 350

Tyr Ile Lys Asp Thr Val Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys
355 360 365

Trp Glu Ala Ile Asn Ile Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr
370 375 380

Ser Ser Asn Glu Phe Glu Asp Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg
385 390 395 400

Ile Ser Ile Gly Ser Tyr Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His
405 410 415

Leu Arg Lys Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr
420 425 430

Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser
435 440 445

Thr Leu His Asp Gly Arg Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu
450 455 460

Asn Lys Glu Leu Glu Asn Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu
465 470 475 480

Glu Ile Lys Lys Leu Glu Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met
485 490 495

Ile Leu Pro Pro Gln Phe Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile
500 505 510

Gln Val Tyr Gly Gly Pro Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala
515 520 525

Val Asn Trp Ile Ser Tyr Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala
530 535 540

Leu Val Asp Gly Arg Gly Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr
545 550 555 560

Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr
565 570 575

Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile
580 585 590

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu
595 600 605

Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
610 615 620

Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly
625 630 635 640

Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val
645 650 655

Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His
660 665 670

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala
675 680 685

Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser
690 695 700

Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr
705 710 715 720

His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp Gly Lys
725 730 735

Lys Lys Lys Lys Lys Gly His His His His His His
740 745

<210> 27
<211> 2244
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền ngoài FAP khỉ đuôi dài+đuôi poly-lys+đuôi his_6

<400> 27
cgccctccaa gagttcataa ctctgaagaa aatacaatga gagcactcac actgaaggat 60

attttaaatg ggacattttc ttataaaaca ttttttccaa actggatttc aggacaagaa 120

tatcttcatc aatctgcaga taacaatata gtactttata atattgaaac aggacaatca 180

tataccattt tgagtaacag aaccatgaaa agtgtgaatg cttcaaatta tggcttatca 240

cctgatcggc aatttgtata tctagaaagt gattattcaa agctttggag atactcttac 300

acagcaacat attacatcta tgaccttagc aatggagaat ttgtaagagg aaatgagctt 360

cctcgtccaa ttcagtattt atgctggtcg cctgttggga gtaaattagc atatgtctat 420

caaaacaata tctatttgaa acaaagacca ggagatccac cttttcaaat aacatttaat 480

ggaagagaaa ataaaatatt taatggaatc ccagactggg tttatgaaga ggaaatgctt 540

gctacaaaat atgctctctg gtggtctcct aatggaaaat ttttggcata tgcggaattt 600

aatgatacag atataccagt tattgcctat tcctattatg gcgatgaaca atatcccaga 660

acaataaata ttccataccc aaaggccgga gctaagaatc cttttgttcg gatatttatt 720

atcgatacca cttaccctgc gtatgtaggt ccccaggaag tgcctgttcc agcaatgata 780

gcctcaagtg attattattt cagttggctc acgtgggtta ctgatgaacg agtatgtttg 840

cagtggctaa aaagagtcca gaatgtttcg gtcttgtcta tatgtgattt cagggaagac 900

tggcagacat gggattgtcc aaagacccag gagcatatag aagaaagcag aactggatgg 960

gctggtggat tctttgtttc aacaccagtt ttcagctatg atgccatttc atactacaaa 1020

atatttagtg acaaggatgg ctacaaacat attcactata tcaaagacac tgtggaaaat 1080

gctattcaaa ttacaagtgg caagtgggag gccataaata tattcagagt aacacaggat 1140

tcactgtttt attctagcaa tgaatttgaa gattaccctg gaagaagaaa catctacaga 1200

attagcattg gaagctatcc tccaagcaag aagtgtgtta cttgccatct aaggaaagaa 1260

aggtgccaat attacacagc aagtttcagc gactacgcca agtactatgc acttgtctgc 1320

tatggcccag gcatccccat ttccaccctt catgacggac gcactgatca agaaattaaa 1380

atcctggaag aaaacaagga attggaaaat gctttgaaaa atatccagct gcctaaagag 1440

gaaattaaga aacttgaagt agatgaaatt actttatggt acaagatgat tcttcctcct 1500

caatttgaca gatcaaagaa gtatcccttg ctaattcaag tgtatggtgg tccctgcagt 1560

cagagtgtaa ggtctgtatt tgctgttaat tggatatctt atcttgcaag taaggaaggg 1620

atggtcattg ccttggtgga tggtcgggga acagctttcc aaggtgacaa actcctgtat 1680

gcagtgtatc gaaagctggg tgtttatgaa gttgaagacc agattacagc tgtcagaaaa 1740

ttcatagaaa tgggtttcat tgatgaaaaa agaatagcca tatggggctg gtcctatgga 1800

ggatatgttt catcactggc ccttgcatct ggaactggtc ttttcaaatg tgggatagca 1860

gtggctccag tctccagctg ggaatattac gcgtctgtct acacagagag attcatgggt 1920

ctcccaacaa aggatgataa tcttgagcac tataagaatt caactgtgat ggcaagagca 1980

gaatatttca gaaatgtaga ctatcttctc atccacggaa cagcagatga taatgtgcac 2040

tttcaaaact cagcacagat tgctaaagct ctggttaatg cacaagtgga tttccaggca 2100

atgtggtact ctgaccagaa ccacggctta tccggcctgt ccacgaacca cttatacacc 2160

cacatgaccc acttcctaaa gcagtgtttc tctttgtcag acggcaaaaa gaaaaagaaa 2220

aagggccacc accatcacca tcac 2244

<210> 28
<211> 702
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln
1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30

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

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly
50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile
65 70 75 80

Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
85 90 95

Gly Arg Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile
100 105 110

Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp
115 120 125

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

Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys
145 150 155 160

Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr
165 170 175

Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
180 185 190

Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn
195 200 205

Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg
210 215 220

Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
225 230 235 240

Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn
245 250 255

Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
260 265 270

Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn
275 280 285

Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser
290 295 300

Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
305 310 315 320

Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu
325 330 335

Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr

340 345 350

Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
355 360 365

Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
370 375 380

Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Lys Leu Ser
385 390 395 400

Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
405 410 415

Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
435 440 445

Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile
450 455 460

Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
465 470 475 480

Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
485 490 495

Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro
500 505 510

Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln
515 520 525

Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
530 535 540

Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
545 550 555 560

Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser
565 570 575

Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly
580 585 590

Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly
595 600 605

Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln
610 615 620

Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu
625 630 635 640

Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
645 650 655

Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
660 665 670

Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
675 680 685

Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
690 695 700

<210> 29
<211> 2322
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Gln Ser Gly Pro Arg Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ala Leu Thr Leu Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe
20 25 30

Phe Gly Glu Asn His Leu Glu Val Pro Val Ala Thr Ala Leu Thr Asp
35 40 45

Ile Asp Leu Gln Leu Gln Phe Ser Thr Ser Gln Pro Glu Ala Leu Leu
50 55 60

Leu Leu Ala Ala Gly Pro Ala Asp His Leu Leu Leu Gln Leu Tyr Ser
65 70 75 80

Gly Arg Leu Gln Val Arg Leu Val Leu Gly Gln Glu Glu Leu Arg Leu
85 90 95

Gln Thr Pro Ala Glu Thr Leu Leu Ser Asp Ser Ile Pro His Thr Val
100 105 110

Val Leu Thr Val Val Glu Gly Trp Ala Thr Leu Ser Val Asp Gly Phe
115 120 125

Leu Asn Ala Ser Ser Ala Val Pro Gly Ala Pro Leu Glu Val Pro Tyr
130 135 140

Gly Leu Phe Val Gly Gly Thr Gly Thr Leu Gly Leu Pro Tyr Leu Arg
145 150 155 160

Gly Thr Ser Arg Pro Leu Arg Gly Cys Leu His Ala Ala Thr Leu Asn
165 170 175

Gly Arg Ser Leu Leu Arg Pro Leu Thr Pro Asp Val His Glu Gly Cys
180 185 190

Ala Glu Glu Phe Ser Ala Ser Asp Asp Val Ala Leu Gly Phe Ser Gly
195 200 205

Pro His Ser Leu Ala Ala Phe Pro Ala Trp Gly Thr Gln Asp Glu Gly
210 215 220

Thr Leu Glu Phe Thr Leu Thr Thr Gln Ser Arg Gln Ala Pro Leu Ala
225 230 235 240

Phe Gln Ala Gly Gly Arg Arg Gly Asp Phe Ile Tyr Val Asp Ile Phe
245 250 255

Glu Gly His Leu Arg Ala Val Val Glu Lys Gly Gln Gly Thr Val Leu
260 265 270

Leu His Asn Ser Val Pro Val Ala Asp Gly Gln Pro His Glu Val Ser
275 280 285

Val His Ile Asn Ala His Arg Leu Glu Ile Ser Val Asp Gln Tyr Pro

290 295 300

Thr His Thr Ser Asn Arg Gly Val Leu Ser Tyr Leu Glu Pro Arg Gly
305 310 315 320

Ser Leu Leu Leu Gly Gly Leu Asp Ala Glu Ala Ser Arg His Leu Gln
325 330 335

Glu His Arg Leu Gly Leu Thr Pro Glu Ala Thr Asn Ala Ser Leu Leu
340 345 350

Gly Cys Met Glu Asp Leu Ser Val Asn Gly Gln Arg Arg Gly Leu Arg
355 360 365

Glu Ala Leu Leu Thr Arg Asn Met Ala Ala Gly Cys Arg Leu Glu Glu
370 375 380

Glu Glu Tyr Glu Asp Asp Ala Tyr Gly His Tyr Glu Ala Phe Ser Thr
385 390 395 400

Leu Ala Pro Glu Ala Trp Pro Ala Met Glu Leu Pro Glu Pro Cys Val
405 410 415

Pro Glu Pro Gly Leu Pro Pro Val Phe Ala Asn Phe Thr Gln Leu Leu
420 425 430

Thr Ile Ser Pro Leu Val Val Ala Glu Gly Gly Thr Ala Trp Leu Glu
435 440 445

Trp Arg His Val Gln Pro Thr Leu Asp Leu Met Glu Ala Glu Leu Arg
450 455 460

Lys Ser Gln Val Leu Phe Ser Val Thr Arg Gly Ala Arg His Gly Glu
465 470 475 480

Leu Glu Leu Asp Ile Pro Gly Ala Gln Ala Arg Lys Met Phe Thr Leu
485 490 495

Leu Asp Val Val Asn Arg Lys Ala Arg Phe Ile His Asp Gly Ser Glu
500 505 510

Asp Thr Ser Asp Gln Leu Val Leu Glu Val Ser Val Thr Ala Arg Val
515 520 525

Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile
530 535 540

Gln Val Asn Pro Val Asn Asp Pro Pro His Ile Ile Phe Pro His Gly
545 550 555 560

Ser Leu Met Val Ile Leu Glu His Thr Gln Lys Pro Leu Gly Pro Glu
565 570 575

Val Phe Gln Ala Tyr Asp Pro Asp Ser Ala Cys Glu Gly Leu Thr Phe
580 585 590

Gln Val Leu Gly Thr Ser Ser Gly Leu Pro Val Glu Arg Arg Asp Gln
595 600 605

Pro Gly Glu Pro Ala Thr Glu Phe Ser Cys Arg Glu Leu Glu Ala Gly
610 615 620

Ser Leu Val Tyr Val His Arg Gly Gly Pro Ala Gln Asp Leu Thr Phe
625 630 635 640

Arg Val Ser Asp Gly Leu Gln Ala Ser Pro Pro Ala Thr Leu Lys Val
645 650 655

Val Ala Ile Arg Pro Ala Ile Gln Ile His Arg Ser Thr Gly Leu Arg
660 665 670

Leu Ala Gln Gly Ser Ala Met Pro Ile Leu Pro Ala Asn Leu Ser Val
675 680 685

Glu Thr Asn Ala Val Gly Gln Asp Val Ser Val Leu Phe Arg Val Thr
690 695 700

Gly Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Gln Lys Gln Gly Ala Gly Gly Val
705 710 715 720

Glu Gly Ala Glu Trp Trp Ala Thr Gln Ala Phe His Gln Arg Asp Val
725 730 735

Glu Gln Gly Arg Val Arg Tyr Leu Ser Thr Asp Pro Gln His His Ala
740 745 750

Tyr Asp Thr Val Glu Asn Leu Ala Leu Glu Val Gln Val Gly Gln Glu
755 760 765

Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val Thr Ile Gln Arg Ala Thr Val
770 775 780

Trp Met Leu Arg Leu Glu Pro Leu His Thr Gln Asn Thr Gln Gln Glu
785 790 795 800

Thr Leu Thr Thr Ala His Leu Glu Ala Thr Leu Glu Glu Ala Gly Pro
805 810 815

Ser Pro Pro Thr Phe His Tyr Glu Val Val Gln Ala Pro Arg Lys Gly
820 825 830

Asn Leu Gln Leu Gln Gly Thr Arg Leu Ser Asp Gly Gln Gly Phe Thr
835 840 845

Gln Asp Asp Ile Gln Ala Gly Arg Val Thr Tyr Gly Ala Thr Ala Arg
850 855 860

Ala Ser Glu Ala Val Glu Asp Thr Phe Arg Phe Arg Val Thr Ala Pro
865 870 875 880

Pro Tyr Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Pro Ile His Ile Gly Gly Asp
885 890 895

Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly
900 905 910

Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn
915 920 925

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg
930 935 940

Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe
945 950 955 960

Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp
965 970 975

Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly
980 985 990

Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp Glu Glu Val Arg Gly Val Phe Arg
995 1000 1005

Val Ala Ile Gln Pro Val Asn Asp His Ala Pro Val Gln Thr Ile
1010 1015 1020

Ser Arg Ile Phe His Val Ala Arg Gly Gly Arg Arg Leu Leu Thr
1025 1030 1035

Thr Asp Asp Val Ala Phe Ser Asp Ala Asp Ser Gly Phe Ala Asp
1040 1045 1050

Ala Gln Leu Val Leu Thr Arg Lys Asp Leu Leu Phe Gly Ser Ile
1055 1060 1065

Val Ala Val Asp Glu Pro Thr Arg Pro Ile Tyr Arg Phe Thr Gln
1070 1075 1080

Glu Asp Leu Arg Lys Arg Arg Val Leu Phe Val His Ser Gly Ala
1085 1090 1095

Asp Arg Gly Trp Ile Gln Leu Gln Val Ser Asp Gly Gln His Gln
1100 1105 1110

Ala Thr Ala Leu Leu Glu Val Gln Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Arg
1115 1120 1125

Val Ala Asn Gly Ser Ser Leu Val Val Pro Gln Gly Gly Gln Gly
1130 1135 1140

Thr Ile Asp Thr Ala Val Leu His Leu Asp Thr Asn Leu Asp Ile
1145 1150 1155

Arg Ser Gly Asp Glu Val His Tyr His Val Thr Ala Gly Pro Arg
1160 1165 1170

Trp Gly Gln Leu Val Arg Ala Gly Gln Pro Ala Thr Ala Phe Ser
1175 1180 1185

Gln Gln Asp Leu Leu Asp Gly Ala Val Leu Tyr Ser His Asn Gly

1190 1195 1200

Ser Leu Ser Pro Arg Asp Thr Met Ala Phe Ser Val Glu Ala Gly
1205 1210 1215

Pro Val His Thr Asp Ala Thr Leu Gln Val Thr Ile Ala Leu Glu
1220 1225 1230

Gly Pro Leu Ala Pro Leu Lys Leu Val Arg His Lys Lys Ile Tyr
1235 1240 1245

Val Phe Gln Gly Glu Ala Ala Glu Ile Arg Arg Asp Gln Leu Glu
1250 1255 1260

Ala Ala Gln Glu Ala Val Pro Pro Ala Asp Ile Val Phe Ser Val
1265 1270 1275

Lys Ser Pro Pro Ser Ala Gly Tyr Leu Val Met Val Ser Arg Gly
1280 1285 1290

Ala Leu Ala Asp Glu Pro Pro Ser Leu Asp Pro Val Gln Ser Phe
1295 1300 1305

Ser Gln Glu Ala Val Asp Thr Gly Arg Val Leu Tyr Leu His Ser
1310 1315 1320

Arg Pro Glu Ala Trp Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ala Ser
1325 1330 1335

Gly Leu Gly Ala Pro Leu Glu Gly Val Leu Val Glu Leu Glu Val
1340 1345 1350

Leu Pro Ala Ala Ile Pro Leu Glu Ala Gln Asn Phe Ser Val Pro
1355 1360 1365

Glu Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ala Pro Pro Leu Leu Arg Val Ser
1370 1375 1380

Gly Pro Tyr Phe Pro Thr Leu Leu Gly Leu Ser Leu Gln Val Leu
1385 1390 1395

Glu Pro Pro Gln His Gly Ala Leu Gln Lys Glu Asp Gly Pro Gln
1400 1405 1410

Ala Arg Thr Leu Ser Ala Phe Ser Trp Arg Met Val Glu Glu Gln
1415 1420 1425

Leu Ile Arg Tyr Val His Asp Gly Ser Glu Thr Leu Thr Asp Ser
1430 1435 1440

Phe Val Leu Met Ala Asn Ala Ser Glu Met Asp Arg Gln Ser His
1445 1450 1455

Pro Val Ala Phe Thr Val Thr Val Leu Pro Val Asn Asp Gln Pro
1460 1465 1470

Pro Ile Leu Thr Thr Asn Thr Gly Leu Gln Met Trp Glu Gly Ala
1475 1480 1485

Thr Ala Pro Ile Pro Ala Glu Ala Leu Arg Ser Thr Asp Gly Asp
1490 1495 1500

Ser Gly Ser Glu Asp Leu Val Tyr Thr Ile Glu Gln Pro Ser Asn
1505 1510 1515

Gly Arg Val Val Leu Arg Gly Ala Pro Gly Thr Glu Val Arg Ser
1520 1525 1530

Phe Thr Gln Ala Gln Leu Asp Gly Gly Leu Val Leu Phe Ser His
1535 1540 1545

Arg Gly Thr Leu Asp Gly Gly Phe Arg Phe Arg Leu Ser Asp Gly
1550 1555 1560

Glu His Thr Ser Pro Gly His Phe Phe Arg Val Thr Ala Gln Lys
1565 1570 1575

Gln Val Leu Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys
1580 1585 1590

Pro Gly Ser Val Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser
1595 1600 1605

Ser Ser Ala Gly Thr Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val
1610 1615 1620

Arg Gly Pro Gln Leu Gly Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser
1625 1630 1635

Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala
1640 1645 1650

Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp
1655 1660 1665

Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln Leu Ser Ser Pro Pro Ala
1670 1675 1680

Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala Val Ser Phe Glu Ala
1685 1690 1695

Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser His Leu Trp Lys Asn Lys Gly Leu
1700 1705 1710

Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val Ala Ala Leu
1715 1720 1725

Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln Arg Ser
1730 1735 1740

Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg Gly
1745 1750 1755

Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His
1760 1765 1770

Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His
1775 1780 1785

Gly Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His
1790 1795 1800

Leu Gln Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser
1805 1810 1815

Glu Ala Phe Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro
1820 1825 1830

Gln Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg Gly Ser Arg
1835 1840 1845

Ala Pro Ile Ser Arg Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser
1850 1855 1860

Ala Pro Gly Glu Ile Glu Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn
1865 1870 1875

Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu Gly Pro Val Thr Arg
1880 1885 1890

Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala
1895 1900 1905

Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe Gln Leu Ser Met Ser Asp
1910 1915 1920

Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu Ala Val Asp Ile Leu
1925 1930 1935

Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro Leu Glu Val Pro
1940 1945 1950

Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln Leu Arg Val
1955 1960 1965

Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln
1970 1975 1980

Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr Ser
1985 1990 1995

Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala
2000 2005 2010

Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala
2015 2020 2025

Leu Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val
2030 2035 2040

Arg Ala Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly

2045 2050 2055

Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu
2060 2065 2070

Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly
2075 2080 2085

Pro Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu
2090 2095 2100

Pro Gly Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu
2105 2110 2115

Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg
2120 2125 2130

Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala
2135 2140 2145

Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser Leu Asp Phe Ala Thr Glu
2150 2155 2160

Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val Ala Leu Leu Ser Val
2165 2170 2175

Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser Thr
2180 2185 2190

Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro Glu Pro Ala
2195 2200 2205

Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn Met Phe
2210 2215 2220

Ser Val Ile Ile Pro Met Cys Leu Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu
2225 2230 2235

Ile Leu Pro Leu Leu Phe Tyr Leu Arg Lys Arg Asn Lys Thr Gly
2240 2245 2250

Lys His Asp Val Gln Val Leu Thr Ala Lys Pro Arg Asn Gly Leu
2255 2260 2265

Ala Gly Asp Thr Glu Thr Phe Arg Lys Val Glu Pro Gly Gln Ala
2270 2275 2280

Ile Pro Leu Thr Ala Val Pro Gly Gln Gly Pro Pro Pro Gly Gly
2285 2290 2295

Gln Pro Asp Pro Glu Leu Leu Gln Phe Cys Arg Thr Pro Asn Pro
2300 2305 2310

Ala Leu Lys Asn Gly Gln Tyr Trp Val
2315 2320

<210> 30
<211> 1210
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50 55 60

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

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp

355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
530 535 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
610 615 620

Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
625 630 635 640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
645 650 655

Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
660 665 670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
675 680 685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
690 695 700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
705 710 715 720

Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
725 730 735

Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
740 745 750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
755 760 765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
770 775 780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
785 790 795 800

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
805 810 815

Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
820 825 830

Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
835 840 845

Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
850 855 860

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
865 870 875 880

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
885 890 895

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
900 905 910

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
915 920 925

Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
930 935 940

Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
945 950 955 960

Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
965 970 975

Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
980 985 990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
995 1000 1005

Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
1010 1015 1020

Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu
1025 1030 1035

Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn
1040 1045 1050

Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg
1055 1060 1065

Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
1070 1075 1080

Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro
1085 1090 1095

Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln
1100 1105 1110

Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro
1115 1120 1125

His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln
1130 1135 1140

Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala
1145 1150 1155

Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln
1160 1165 1170

Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys
1175 1180 1185

Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
1190 1195 1200

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<210> 31
<211> 556
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
35 40 45

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
50 55 60

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
65 70 75 80

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
85 90 95

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
100 105 110

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
115 120 125

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
130 135 140

Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
145 150 155 160

Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
165 170 175

Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
180 185 190

Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
195 200 205

Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
210 215 220

Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
225 230 235 240

Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
245 250 255

Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
260 265 270

Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
275 280 285

Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
290 295 300

Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
305 310 315 320

Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
325 330 335

Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
340 345 350

Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
355 360 365

Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
370 375 380

Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
405 410 415

Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu
420 425 430

Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly
435 440 445

Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu
450 455 460

Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser
465 470 475 480

Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly
485 490 495

Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln
500 505 510

Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala
515 520 525

Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp
530 535 540

Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
545 550 555

<210> 32
<211> 297
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile
65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile
85 90 95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu
100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
165 170 175

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly
180 185 190

Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile
195 200 205

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys
210 215 220

Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
225 230 235 240

Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro
245 250 255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu
260 265 270

Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser
275 280 285

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
290 295

<210> 33
<211> 364
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln
20 25 30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro
35 40 45

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

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

Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro
85 90 95

Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp
100 105 110

Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser
115 120 125

Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg
130 135 140

Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn
145 150 155 160

Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile
165 170 175

Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr
180 185 190

His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr
195 200 205

Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu
210 215 220

Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr

225 230 235 240

Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly
245 250 255

Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala
260 265 270

Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys
275 280 285

Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly
290 295 300

Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr
305 310 315 320

Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu
325 330 335

Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys
340 345 350

Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln
355 360

<210> 34
<211> 205
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Thr Pro Pro Glu Arg Leu Phe Leu Pro Arg Val Cys Gly Thr Thr
1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Val Leu Leu Pro Gly Ala
20 25 30

Gln Gly Leu Pro Gly Val Gly Leu Thr Pro Ser Ala Ala Gln Thr Ala
35 40 45

Arg Gln His Pro Lys Met His Leu Ala His Ser Thr Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Ala His Leu Ile Gly Asp Pro Ser Lys Gln Asn Ser Leu Leu Trp Arg
65 70 75 80

Ala Asn Thr Asp Arg Ala Phe Leu Gln Asp Gly Phe Ser Leu Ser Asn
85 90 95

Asn Ser Leu Leu Val Pro Thr Ser Gly Ile Tyr Phe Val Tyr Ser Gln
100 105 110

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

Leu Tyr Leu Ala His Glu Val Gln Leu Phe Ser Ser Gln Tyr Pro Phe
130 135 140

His Val Pro Leu Leu Ser Ser Gln Lys Met Val Tyr Pro Gly Leu Gln
145 150 155 160

Glu Pro Trp Leu His Ser Met Tyr His Gly Ala Ala Phe Gln Leu Thr
165 170 175

Gln Gly Asp Gln Leu Ser Thr His Thr Asp Gly Ile Pro His Leu Val
180 185 190

Leu Ser Pro Ser Thr Val Phe Phe Gly Ala Phe Ala Leu
195 200 205

<210> 35
<211> 233
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
35 40 45

Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro

50 55 60

Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
100 105 110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
115 120 125

Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
145 150 155 160

Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
225 230

<210> 36
<211> 244
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Gly Ala Leu Gly Leu Glu Gly Arg Gly Gly Arg Leu Gln Gly Arg
1 5 10 15

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

Leu Leu Ala Val Pro Ile Thr Val Leu Ala Val Leu Ala Leu Val Pro
35 40 45

Gln Asp Gln Gly Gly Leu Val Thr Glu Thr Ala Asp Pro Gly Ala Gln
50 55 60

Ala Gln Gln Gly Leu Gly Phe Gln Lys Leu Pro Glu Glu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Thr Asp Leu Ser Pro Gly Leu Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Ala Pro
85 90 95

Leu Lys Gly Gln Gly Leu Gly Trp Glu Thr Thr Lys Glu Gln Ala Phe
100 105 110

Leu Thr Ser Gly Thr Gln Phe Ser Asp Ala Glu Gly Leu Ala Leu Pro
115 120 125

Gln Asp Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Leu Val Gly Tyr Arg Gly Arg
130 135 140

Ala Pro Pro Gly Gly Gly Asp Pro Gln Gly Arg Ser Val Thr Leu Arg
145 150 155 160

Ser Ser Leu Tyr Arg Ala Gly Gly Ala Tyr Gly Pro Gly Thr Pro Glu
165 170 175

Leu Leu Leu Glu Gly Ala Glu Thr Val Thr Pro Val Leu Asp Pro Ala
180 185 190

Arg Arg Gln Gly Tyr Gly Pro Leu Trp Tyr Thr Ser Val Gly Phe Gly
195 200 205

Gly Leu Val Gln Leu Arg Arg Gly Glu Arg Val Tyr Val Asn Ile Ser
210 215 220

His Pro Asp Met Val Asp Phe Ala Arg Gly Lys Thr Phe Phe Gly Ala
225 230 235 240

Val Met Val Gly

<210> 37
<211> 183
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
130 135 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
180

<210> 38
<211> 261
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

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

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 39
<211> 281
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val Asp
1 5 10 15

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

Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro Pro Pro Pro
35 40 45

Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro
50 55 60

Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly Asn His Ser Thr Gly
65 70 75 80

Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val Leu Val Ala Leu Val Gly
85 90 95

Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala
100 105 110

Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu
115 120 125

Lys Gln Ile Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg
130 135 140

Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu
145 150 155 160

Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr
165 170 175

Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr
180 185 190

Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser
195 200 205

His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met
210 215 220

Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala
225 230 235 240

Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His
245 250 255

Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser
260 265 270

Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu
275 280

<210> 40
<211> 193
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
1 5 10 15

Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile
20 25 30

Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
35 40 45

Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
50 55 60

Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
65 70 75 80

Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
85 90 95

Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
100 105 110

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

Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
130 135 140

Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Ala Ser Gln Arg Leu Thr Pro
145 150 155 160

Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
165 170 175

Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
180 185 190

Pro

<210> 41
<211> 234
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Asp Pro Gly Leu Gln Gln Ala Leu Asn Gly Met Ala Pro Pro Gly
1 5 10 15

Asp Thr Ala Met His Val Pro Ala Gly Ser Val Ala Ser His Leu Gly
20 25 30

Thr Thr Ser Arg Ser Tyr Phe Tyr Leu Thr Thr Ala Thr Leu Ala Leu
35 40 45

Cys Leu Val Phe Thr Val Ala Thr Ile Met Val Leu Val Val Gln Arg
50 55 60

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

Asn Cys Ser Glu Asp Leu Leu Cys Ile Leu Lys Arg Ala Pro Phe Lys
85 90 95

Lys Ser Trp Ala Tyr Leu Gln Val Ala Lys His Leu Asn Lys Thr Lys
100 105 110

Leu Ser Trp Asn Lys Asp Gly Ile Leu His Gly Val Arg Tyr Gln Asp
115 120 125

Gly Asn Leu Val Ile Gln Phe Pro Gly Leu Tyr Phe Ile Ile Cys Gln
130 135 140

Leu Gln Phe Leu Val Gln Cys Pro Asn Asn Ser Val Asp Leu Lys Leu
145 150 155 160

Glu Leu Leu Ile Asn Lys His Ile Lys Lys Gln Ala Leu Val Thr Val
165 170 175

Cys Glu Ser Gly Met Gln Thr Lys His Val Tyr Gln Asn Leu Ser Gln
180 185 190

Phe Leu Leu Asp Tyr Leu Gln Val Asn Thr Thr Ile Ser Val Asn Val
195 200 205

Asp Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Thr Ser Thr Phe Pro Leu Glu Asn Val
210 215 220

Leu Ser Ile Phe Leu Tyr Ser Asn Ser Asp
225 230

<210> 42
<211> 254
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
100 105 110

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

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His

210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 43
<211> 281
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala
20 25 30

Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys
35 40 45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr
50 55 60

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
65 70 75 80

Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser
85 90 95

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
100 105 110

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
115 120 125

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
130 135 140

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
145 150 155 160

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
165 170 175

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
180 185 190

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
195 200 205

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
210 215 220

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
225 230 235 240

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
245 250 255

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
260 265 270

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
275 280

<210> 44
<211> 317
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu
1 5 10 15

Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His Ala
20 25 30

Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met
35 40 45

Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Val
50 55 60

Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser

65 70 75 80

Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn
85 90 95

Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile
100 105 110

Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln
115 120 125

Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys
130 135 140

Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu
145 150 155 160

Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro
165 170 175

Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
180 185 190

Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val
195 200 205

Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
210 215 220

His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val
225 230 235 240

Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met
245 250 255

Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
260 265 270

Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu
275 280 285

Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
290 295 300

Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp
305 310 315

<210> 45
<211> 249
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Ala Ala Arg Arg Ser Gln Arg Arg Arg Gly Arg Arg Gly Glu Pro
1 5 10 15

Gly Thr Ala Leu Leu Val Pro Leu Ala Leu Gly Leu Gly Leu Ala Leu
20 25 30

Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Ala Val Val Ser Leu Gly Ser Arg Ala
35 40 45

Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu Glu Leu Val Ala Glu Glu
50 55 60

Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp
65 70 75 80

Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu
100 105 110

Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly
115 120 125

Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu
130 135 140

Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly Leu
145 150 155 160

Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr
165 170 175

Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu
180 185 190

Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg
195 200 205

Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu
210 215 220

Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His
245

<210> 46
<211> 250
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
1 5 10 15

Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu
35 40 45

Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg
50 55 60

Leu Gln Gly Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp
65 70 75 80

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

Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys
100 105 110

Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys
115 120 125

Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg
130 135 140

Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala
145 150 155 160

Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe
165 170 175

Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr
180 185 190

Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr
195 200 205

Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile
210 215 220

Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro
225 230 235 240

His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
245 250

<210> 47
<211> 285
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
1 5 10 15

Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
20 25 30

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
35 40 45

Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
50 55 60

Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
65 70 75 80

Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
85 90 95

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
100 105 110

Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
115 120 125

Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
130 135 140

Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
145 150 155 160

Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
165 170 175

Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
180 185 190

Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
195 200 205

Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
210 215 220

Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
225 230 235 240

Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
245 250 255

Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu
260 265 270

Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
275 280 285

<210> 48

<211> 240
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Glu Glu Ser Val Val Arg Pro Ser Val Phe Val Val Asp Gly Gln
1 5 10 15

Thr Asp Ile Pro Phe Thr Arg Leu Gly Arg Ser His Arg Arg Gln Ser
20 25 30

Cys Ser Val Ala Arg Val Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Met Gly
35 40 45

Ala Gly Leu Ala Val Gln Gly Trp Phe Leu Leu Gln Leu His Trp Arg
50 55 60

Leu Gly Glu Met Val Thr Arg Leu Pro Asp Gly Pro Ala Gly Ser Trp
65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Gln Glu Arg Arg Ser His Glu Val Asn Pro Ala Ala
85 90 95

His Leu Thr Gly Ala Asn Ser Ser Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Leu
100 105 110

Leu Trp Glu Thr Gln Leu Gly Leu Ala Phe Leu Arg Gly Leu Ser Tyr
115 120 125

His Asp Gly Ala Leu Val Val Thr Lys Ala Gly Tyr Tyr Tyr Ile Tyr
130 135 140

Ser Lys Val Gln Leu Gly Gly Val Gly Cys Pro Leu Gly Leu Ala Ser
145 150 155 160

Thr Ile Thr His Gly Leu Tyr Lys Arg Thr Pro Arg Tyr Pro Glu Glu
165 170 175

Leu Glu Leu Leu Val Ser Gln Gln Ser Pro Cys Gly Arg Ala Thr Ser
180 185 190

Ser Ser Arg Val Trp Trp Asp Ser Ser Phe Leu Gly Gly Val Val His
195 200 205

Leu Glu Ala Gly Glu Lys Val Val Val Arg Val Leu Asp Glu Arg Leu
210 215 220

Val Arg Leu Arg Asp Gly Thr Arg Ser Tyr Phe Gly Ala Phe Met Val
225 230 235 240

<210> 49
<211> 251
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Ala Glu Asp Leu Gly Leu Ser Phe Gly Glu Thr Ala Ser Val Glu
1 5 10 15

Met Leu Pro Glu His Gly Ser Cys Arg Pro Lys Ala Arg Ser Ser Ser
20 25 30

Ala Arg Trp Ala Leu Thr Cys Cys Leu Val Leu Leu Pro Phe Leu Ala
35 40 45

Gly Leu Thr Thr Tyr Leu Leu Val Ser Gln Leu Arg Ala Gln Gly Glu
50 55 60

Ala Cys Val Gln Phe Gln Ala Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser
65 70 75 80

His Gln Gln Val Tyr Ala Pro Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg
85 90 95

Ala His Leu Thr Val Val Arg Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn
100 105 110

Gln Phe Pro Ala Leu His Trp Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr
115 120 125

Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser
130 135 140

Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser
145 150 155 160

Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser

165 170 175

Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr
180 185 190

Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp
195 200 205

Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp
210 215 220

Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys
225 230 235 240

Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe Leu Leu
245 250

<210> 50
<211> 199
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Thr Leu His Pro Ser Pro Ile Thr Cys Glu Phe Leu Phe Ser Thr
1 5 10 15

Ala Leu Ile Ser Pro Lys Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro
20 25 30

Leu Ser His Ser Arg Thr Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu
35 40 45

Trp Leu Phe Cys Ser Ile Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser
50 55 60

Trp Leu Ile Phe Ile Phe Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys
65 70 75 80

Met Ala Lys Phe Gly Pro Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser
85 90 95

Glu Pro Pro Cys Val Asn Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu
100 105 110

Gln Asn Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn
115 120 125

Tyr Asn Asp Val Ala Pro Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp
130 135 140

Met Ile Gln Thr Leu Thr Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly
145 150 155 160

Thr Tyr Glu Leu His Val Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser
165 170 175

Glu His Gln Val Leu Lys Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu
180 185 190

Ala Asn Pro Gln Phe Ile Ser
195

<210> 51
<211> 391
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Met Gly Tyr Pro Glu Val Glu Arg Arg Glu Leu Leu Pro Ala Ala Ala
1 5 10 15

Pro Arg Glu Arg Gly Ser Gln Gly Cys Gly Cys Gly Gly Ala Pro Ala
20 25 30

Arg Ala Gly Glu Gly Asn Ser Cys Leu Leu Phe Leu Gly Phe Phe Gly
35 40 45

Leu Ser Leu Ala Leu His Leu Leu Thr Leu Cys Cys Tyr Leu Glu Leu
50 55 60

Arg Ser Glu Leu Arg Arg Glu Arg Gly Ala Glu Ser Arg Leu Gly Gly
65 70 75 80

Ser Gly Thr Pro Gly Thr Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Gly Gly Leu
85 90 95

Asp Pro Asp Ser Pro Ile Thr Ser His Leu Gly Gln Pro Ser Pro Lys

100 105 110

Gln Gln Pro Leu Glu Pro Gly Glu Ala Ala Leu His Ser Asp Ser Gln
115 120 125

Asp Gly His Gln Met Ala Leu Leu Asn Phe Phe Phe Pro Asp Glu Lys
130 135 140

Pro Tyr Ser Glu Glu Glu Ser Arg Arg Val Arg Arg Asn Lys Arg Ser
145 150 155 160

Lys Ser Asn Glu Gly Ala Asp Gly Pro Val Lys Asn Lys Lys Lys Gly
165 170 175

Lys Lys Ala Gly Pro Pro Gly Pro Asn Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
180 185 190

Pro Pro Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ile
195 200 205

Pro Gly Thr Thr Val Met Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly
210 215 220

Pro Gln Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Pro Ser Gly Ala Ala Asp Lys
225 230 235 240

Ala Gly Thr Arg Glu Asn Gln Pro Ala Val Val His Leu Gln Gly Gln
245 250 255

Gly Ser Ala Ile Gln Val Lys Asn Asp Leu Ser Gly Gly Val Leu Asn
260 265 270

Asp Trp Ser Arg Ile Thr Met Asn Pro Lys Val Phe Lys Leu His Pro
275 280 285

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

Ser Gln Val Glu Val Tyr Tyr Ile Asn Phe Thr Asp Phe Ala Ser Tyr
305 310 315 320

Glu Val Val Val Asp Glu Lys Pro Phe Leu Gln Cys Thr Arg Ser Ile
325 330 335

Glu Thr Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Thr Cys Tyr Thr Ala Gly Val Cys
340 345 350

Leu Leu Lys Ala Arg Gln Lys Ile Ala Val Lys Met Val His Ala Asp
355 360 365

Ile Ser Ile Asn Met Ser Lys His Thr Thr Phe Phe Gly Ala Ile Arg
370 375 380

Leu Gly Glu Ala Pro Ala Ser
385 390

<210> 52
<211> 205
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala
35 40 45

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

Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp
65 70 75 80

Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe
85 90 95

Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val
100 105 110

Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala
115 120 125

Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg
130 135 140

Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly
145 150 155 160

Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala
165 170 175

Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr
180 185 190

Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
195 200 205

<210> 53
<211> 133
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
20 25 30

Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
50 55 60

Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
115 120 125

Glu Phe Cys Val Leu
130

<210> 54
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
1 5 10 15

Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp
20 25 30

Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly
35 40 45

Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile
50 55 60

Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys
65 70 75 80

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

Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe
100 105 110

His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu
115 120 125

Phe Cys Val Leu
130

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit (SG4)2

<400> 55

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

<210> 56
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 56

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

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 57

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

<210> 58
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 58

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 59
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 59

Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser
1 5

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 60

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 61

Gly Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 62
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 62

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 63

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 64

Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 65
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 65

Gly Gly Asn Gly Ser Gly
1 5

<210> 66
<211> 2154
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime -chuỗi khóa Fc CH1

<400> 66
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gtttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaagggggc 1140

ggaggaagcg gaggggggagg aagtgctagc accaagggcc ctagcgtgtt ccctctggcc 1200

cctagcagca agagcacaag tggaggaaca gccgccctgg gctgcctggt caaggactac 1260

ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaat tctggcgccc tgacaagcgg cgtgcacaca 1320

tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg tactctctga gcagcgtcgt gaccgtgccc 1380

tctagctctc tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc 1440

aaagtggaca agaaggtgga acccaagagc tgcgacaaga cccacacctg tccccttgc 1500

cctgcccctg aagctgctgg tggcccttcc gtgttcctgt tccccccaaa gcccaaggac 1560

accctgatga tcagccggac ccccgaagtg acctgcgtgg tggtcgatgt gtcccacgag 1620

gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg gacggcgtgg aagtgcacaa tgccaagacc 1680

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1740

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc 1800

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1860

accctgcccc catgccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 1920

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1980

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 2040

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 2100

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 2154

<210> 67
<211> 903
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL(71-254) monome -CL

<400> 67
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctcgtacggt ggctgcacca 600

tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg 660

tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc 720

ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 780

agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 840

tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag 900

tgt 903

<210> 68
<211> 1338
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng ổ Fc FAP(28H1)

<400> 68
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag 360

ggcccctccg tgttccccct ggccccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgct 420

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcgga 480

gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagttctgg cctgtatagc 540

ctgagcagcg tggtcaccgt gccttctagc agcctgggca cccagaccta catctgcaac 600

gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaagg tggagcccaa gagctgcgac 660

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc 720

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 780

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960

aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020

cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080

caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200

ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320

tccctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 69
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ FAP(28H1)

<400> 69
gagatcgtgc tgacccagtc ccccggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgtcctgca gagcctccca gtccgtgtcc cggtcctacc tcgcctggta tcagcagaag 120

cccggccagg cccctcggct gctgatcatc ggcgcctcta ccagagccac cggcatccct 180

gaccggttct ccggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggccagg tcatccctcc caccttggc 300

cagggcacca aggtggaaat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 70
<211> 309
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 70

Met Asp Gln His Thr Leu Asp Val Glu Asp Thr Ala Asp Ala Arg His
1 5 10 15

Pro Ala Gly Thr Ser Cys Pro Ser Asp Ala Ala Leu Leu Arg Asp Thr
20 25 30

Gly Leu Leu Ala Asp Ala Ala Leu Leu Ser Asp Thr Val Arg Pro Thr
35 40 45

Asn Ala Ala Leu Pro Thr Asp Ala Ala Tyr Pro Ala Val Asn Val Arg
50 55 60

Asp Arg Glu Ala Ala Trp Pro Pro Ala Leu Asn Phe Cys Ser Arg His
65 70 75 80

Pro Lys Leu Tyr Gly Leu Val Ala Leu Val Leu Leu Leu Leu Ile Ala
85 90 95

Ala Cys Val Pro Ile Phe Thr Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr
100 105 110

Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln
115 120 125

Val Thr Pro Val Ser His Ile Gly Cys Pro Asn Thr Thr Gln Gln Gly
130 135 140

Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Cys
145 150 155 160

Asn Thr Thr Leu Asn Trp His Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr
165 170 175

Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val
180 185 190

Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro
195 200 205

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

Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ala Leu Thr
225 230 235 240

Val Glu Leu Phe Pro Cys Ser Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg Ser
245 250 255

Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly
260 265 270

Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu
275 280 285

Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro
290 295 300

Asp Asn Pro Trp Glu
305

<210> 71
<211> 2298
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 4-1BBL(71-254) dime -CH1-Chuỗi khóa Fc

<400> 71
agaaccgagc ccagacccgc cctgaccatc accaccagcc ctaacctggg caccagagag 60

aacaacgccg accaagtgac ccccgtgtcc cacatcggca gccccaatac cacacagcag 120

ggcagccctg tgttcgccaa gctgctggcc aagaaccagg ccagcctgag caacaccacc 180

ctgaactggc acagccagga tggcgccgga agcagctatc tgagccaggg cctgagatac 240

gaagaggaca agaaagaact ggtggtggac agccctggcc tgtactacgt gttcctggaa 300

ctgaagctga gccccacctt caccaacacc ggccacaagg tgcagggctg ggtgtcactg 360

gtgctgcagg ccaaacccca ggtggacgac ttcgacaacc tggccctgac cgtggaactg 420

ttccccagca gcatggaaaa caagctggtg gatcggagct ggtcccagct tctgctgctg 480

aaggccggac acagactgag cgtgggcctg agggcttatc tgcacggcgc ccaggacgcc 540

tacagagact gggagctgag ctaccccaac acaaccagct tcggcctgtt cctcgtgaag 600

cccgacaacc cttgggaagg cggcggagga tctggcggag gcggatctag aacagagcct 660

cggcctgccc tgacaattac cacatccccc aatctgggca cccgggaaaa caatgcagat 720

caagtgacac ctgtgtctca tattggctcc ccaaacacta cccagcaggg ctcccccgtg 780

tttgctaaac tgctggctaa aaatcaggcc tccctgtcta acacaacact gaactggcac 840

tcccaggacg gcgctggcag ctcttacctg agtcagggac tgcgctatga ggaagataag 900

aaagaactgg tggtggattc ccccggactg tactatgtgt ttctggaact gaaactgtcc 960

cctaccttta caaataccgg gcacaaagtg cagggatggg tgtccctggt gctgcaggct 1020

aagcctcagg tggacgattt tgataatctg gctctgacag tggaactgtt tcctagcagc 1080

atggaaaaca agctggtgga cagaagctgg tcccagctcc tgctgctgaa ggccggacac 1140

agactgagcg tgggcctgag agcctatctg cacggcgccc aggacgccta cagagactgg 1200

gagctgagct accccaacac aaccagcttc ggcctgttcc tcgtgaagcc cgacaaccct 1260

tgggaaggcg gcggaggatc tggcggaggc ggatccagag ctgatgctgc ccctaccgtg 1320

tccatcttcc cacccagcag cgagcagctg acatctgggg gagctagcgt cgtgtgcttc 1380

ctgaacaact tctaccccaa ggacatcaac gtgaagtgga agatcgacgg cagcgagcgg 1440

cagaacggcg tgctgaatag ctggaccgac caggacagca aggactccac ctacagcatg 1500

agcagcaccc tgaccctgac caaggacgag tacgagcggc acaacagcta cacatgcgag 1560

gccacccaca agaccagcac cagccccatc gtgaagtcct tcaaccggaa cgagtgcgtg 1620

cccagagact gcggctgcaa gccttgcatc tgcaccgtgc ctgaggtgtc cagcgtgttc 1680

atcttcccac ccaagcccaa ggacgtgctg accatcaccc tgacacccaa agtgacctgc 1740

gtggtggtgg ccatcagcaa ggatgacccc gaggtgcagt tcagttggtt cgtggacgac 1800

gtggaagtgc acaccgctca gaccaagccc agagaggaac agatcaacag caccttcaga 1860

agcgtgtccg agctgcccat catgcaccag gactggctga acggcaaaga attcaagtgc 1920

agagtgaaca gcgccgcctt tggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa gaccaagggc 1980

agacccaagg ccccccaggt gtacacaatc cccccaccca aagaacagat ggccaaggac 2040

aaggtgtccc tgacctgcat gatcaccaat ttcttcccag aggatatcac cgtggaatgg 2100

cagtggaacg gccagcccgc cgagaactac gacaacaccc agcctatcat ggacaccgac 2160

ggctcctact tcgtgtacag cgacctgaac gtgcagaagt ccaactggga ggccggcaac 2220

accttcacct gtagcgtgct gcacgagggc ctgcacaacc accacaccga gaagtccctg 2280

tcccacagcc ctggcaag 2298

<210> 72
<211> 954
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> thể dung hợp mu 4-1BBL(71-254) monome -CL

<400> 72
agaaccgagc ccagacccgc cctgaccatc accaccagcc ctaacctggg caccagagag 60

aacaacgccg accaagtgac ccccgtgtcc cacatcggca gccccaatac cacacagcag 120

ggcagccctg tgttcgccaa gctgctggcc aagaaccagg ccagcctgag caacaccacc 180

ctgaactggc acagccagga tggcgccgga agcagctatc tgagccaggg cctgagatac 240

gaagaggaca agaaagaact ggtggtggac agccctggcc tgtactacgt gttcctggaa 300

ctgaagctga gccccacctt caccaacacc ggccacaagg tgcagggctg ggtgtcactg 360

gtgctgcagg ccaaacccca ggtggacgac ttcgacaacc tggccctgac cgtggaactg 420

ttccccagca gcatggaaaa caagctggtg gatcggagct ggtcccagct tctgctgctg 480

aaggccggac acagactgag cgtgggcctg agggcctatc tgcatggcgc ccaggacgcc 540

tacagagact gggagctgag ctaccccaac acaaccagct tcggcctgtt cctcgtgaag 600

cccgacaacc cttgggaagg cggcggaggc tccggaggag gcggaagcgc taagaccacc 660

ccccccagcg tgtaccctct ggcccctgga tctgccgccc agaccaacag catggtgacc 720

ctgggctgcc tggtgaaggg ctacttcccc gagcctgtga ccgtgacctg gaacagcggc 780

agcctgagca gcggcgtgca cacctttcca gccgtgctgc agagcgacct gtacaccctg 840

agcagctccg tgaccgtgcc tagcagcacc tggcccagcc agacagtgac ctgcaacgtg 900

gcccaccctg ccagcagcac caaggtggac aagaaaatcg tgccccggga ctgc 954

<210> 73
<211> 1320
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng FAP Fc KK

<400> 73
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc taagaccacc 360

ccccctagcg tgtaccctct ggcccctgga tctgccgccc agaccaacag catggtgacc 420

ctgggctgcc tggtgaaggg ctacttcccc gagcctgtga ccgtgacctg gaacagcggc 480

agcctgagca gcggcgtgca cacctttcca gccgtgctgc agagcgacct gtacaccctg 540

agcagctccg tgaccgtgcc tagcagcacc tggcccagcc agacagtgac ctgcaacgtg 600

gcccaccctg ccagcagcac caaggtggac aagaaaatcg tgccccggga ctgcggctgc 660

aagccctgca tctgcaccgt gcccgaggtg tccagcgtgt tcatcttccc acccaagccc 720

aaggacgtgc tgaccatcac cctgaccccc aaagtgacct gcgtggtggt ggccatcagc 780

aaggacgacc ccgaggtgca gttctcttgg tttgtggacg acgtggaggt gcacacagcc 840

cagacaaagc cccgggagga acagatcaac agcaccttca gaagcgtgtc cgagctgccc 900

atcatgcacc aggactggct gaacggcaaa gaattcaagt gcagagtgaa cagcgccgcc 960

ttcggcgccc ccatcgagaa aaccatcagc aagaccaagg gcagacccaa ggcccccccag 1020

gtgtacacca tccccccacc caaaaaacag atggccaagg acaaggtgtc cctgacctgc 1080

atgatcacca acttttttccc cgaggacatc accgtggagt ggcagtggaa tggccagccc 1140

gccgagaact acaagaacac ccagcccatc atgaagaccg acggcagcta cttcgtgtac 1200

agcaagctga acgtgcagaa gtccaactgg gaggccggca acaccttcac ctgtagcgtg 1260

ctgcacgagg gcctgcacaa ccaccacacc gagaagtccc tgagccactc ccccggcaag 1320

<210> 74
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ FAP

<400> 74
gagatcgtgc tgacccagtc ccccggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgtcctgca gagcctccca gtccgtgtcc cggtcctacc tcgcctggta tcagcagaag 120

cccggccagg cccctcggct gctgatcatc ggcgcctcta ccagagccac cggcatccct 180

gaccggttct ccggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggccagg tcatccctcc cacctttggc 300

cagggcacca aggtggaaat caagcgtgcc gatgctgcac caactgtatc gattttccca 360

ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc 420

taccccaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc 480

ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccctc 540

acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 600

acatcaactt cacccattgt caagagcttc aacaggaatg agtgt 645

<210> 75
<211> 766
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mu 4-1BBL(71-254) dime-CH1-chuỗi nặng Fc DD

<400> 75

Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu
1 5 10 15

Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile
20 25 30

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

35 40 45

Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His
50 55 60

Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr
65 70 75 80

Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr
85 90 95

Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His
100 105 110

Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val
115 120 125

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

Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg Ser Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu
145 150 155 160

Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly
165 170 175

Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr
180 185 190

Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly
195 200 205

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu
210 215 220

Thr Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp
225 230 235 240

Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile Gly Ser Pro Asn Thr Thr Gln Gln
245 250 255

Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu
260 265 270

Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser
275 280 285

Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val
290 295 300

Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser
305 310 315 320

Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu
325 330 335

Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ala Leu
340 345 350

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

Ser Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val
370 375 380

Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp
385 390 395 400

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

Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
420 425 430

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
435 440 445

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
450 455 460

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
465 470 475 480

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
485 490 495

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
500 505 510

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
515 520 525

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Val Pro Arg Asp Cys
530 535 540

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
545 550 555 560

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
565 570 575

Lys Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
580 585 590

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
595 600 605

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
610 615 620

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
625 630 635 640

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
645 650 655

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
660 665 670

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
675 680 685

Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
690 695 700

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
705 710 715 720

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
725 730 735

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
740 745 750

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
755 760 765

<210> 76
<211> 318
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> thể dung hợp mu 4-1BBL(71-254) monome -CL

<400> 76

Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu
1 5 10 15

Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile
20 25 30

Gly Ser Pro Asn Thr Thr Gln Gln Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu
35 40 45

Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His
50 55 60

Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr
65 70 75 80

Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr
85 90 95

Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His
100 105 110

Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val
115 120 125

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

Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg Ser Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu
145 150 155 160

Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly
165 170 175

Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr
180 185 190

Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly
195 200 205

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
210 215 220

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
225 230 235 240

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
245 250 255

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
260 265 270

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
275 280 285

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
290 295 300

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
305 310 315

<210> 77
<211> 440
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng kháng FAP Fc KK

<400> 77

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu
130 135 140

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

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

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

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

Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile
210 215 220

Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val
260 265 270

Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala
305 310 315 320

Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro
325 330 335

Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Lys Gln Met Ala
340 345 350

Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro Glu
355 360 365

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

Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr
385 390 395 400

Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe
405 410 415

Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys
420 425 430

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 78
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ kháng FAP

<400> 78

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 Arg Ser
20 25 30

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

Ile Ile Gly Ala Ser Thr 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 Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

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

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

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 79
<211> 1335
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng ổ Fc DP47

<400> 79
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360

ccatcggtct tcccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgtg caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 80
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ DP47

<400> 80
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300

caggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 81
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng ổ Fc DP47

<400> 81

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 82
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ DP47

<400> 82

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 83
<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 84
<211> 163
<212> PRT
<213> Khỉ đuôi dài

<400> 84

Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly Ala Glu Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 85
<211> 164
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 85

Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys
1 5 10 15

Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30

Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe

35 40 45

Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr His Asn Ala Glu Cys Glu Cys
50 55 60

Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys
65 70 75 80

Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys
85 90 95

Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr
115 120 125

Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro Pro Val Val Ser Phe Ser Pro
130 135 140

Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly Gly His Ser
145 150 155 160

Leu Gln Val Leu

<210> 86
<211> 681
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc

<400> 86
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 420

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 87
<211> 1266
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> thể dung hợp khóa Fc hu 4-1BB

<400> 87
ctgcaggacc cctgcagcaa ctgccctgcc ggcaccttct gcgacaacaa ccggaaccag 60

atctgcagcc cctgcccccc caacagcttc agctctgccg gcggacagcg gacctgcgac 120

atctgcagac agtgcaaggg cgtgttcaga acccggaaag agtgcagcag caccagcaac 180

gccgagtgcg actgcacccc cggcttccat tgtctgggag ccggctgcag catgtgcgag 240

caggactgca agcagggcca ggaactgacc aagaagggct gcaaggactg ctgcttcggc 300

accttcaacg accagaagcg gggcatctgc cggccctgga ccaactgtag cctggacggc 360

aagagcgtgc tggtcaacgg caccaaagaa cgggacgtcg tgtgcggccc cagccctgct 420

gatctgtctc ctggggccag cagcgtgacc cctcctgccc ctgccagaga gcctggccac 480

tctcctcagg tcgacgaaca gttatatttt cagggcggct cacccaaatc tgcagacaaa 540

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 600

ttcccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 660

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 720

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 780

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 840

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 900

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 960

gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1020

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1080

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1140

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1200

ctgtctccgg gtaaatccgg aggcctgaac gacatcttcg aggcccagaa gattgaatgg 1260

cacgag 1266

<210> 88
<211> 1266
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thể dung hợp khóa Fc 4-1BB Khỉ đuôi dài

<400> 88
ttgcaggatc tgtgtagtaa ctgcccagct ggtacattct gtgataataa caggagtcag 60

atttgcagtc cctgtcctcc aaatagtttc tccagcgcag gtggacaaag gacctgtgac 120

atatgcaggc agtgtaaagg tgttttcaag accaggaagg agtgttcctc caccagcaat 180

gcagagtgtg actgcatttc agggtatcac tgcctggggg cagagtgcag catgtgtgaa 240

caggattgta aacaaggtca agaattgaca aaaaaaggtt gtaaagactg ttgctttggg 300

acatttaatg accagaaacg tggcatctgt cgcccctgga caaactgttc tttggatgga 360

aagtctgtgc ttgtgaatgg gacgaaggag agggacgtgg tctgcggacc atctccagcc 420

gacctctctc caggagcatc ctctgcgacc ccgcctgccc ctgcgagaga gccaggacac 480

tctccgcagg tcgacgaaca gttatatttt cagggcggct cacccaaatc tgcagacaaa 540

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 600

ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 660

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 720

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 780

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 840

gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 900

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 960

gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1020

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1080

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1140

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1200

ctgtctccgg gtaaatccgg aggcctgaac gacatcttcg aggcccagaa gattgaatgg 1260

cacgag 1266

<210> 89
<211> 1269
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> thể dung hợp khóa Fc 4-1BB chuột

<400> 89
gtgcagaaca gctgcgacaa ctgccagccc ggcaccttct gccggaagta caaccccgtg 60

tgcaagagct gccccccag caccttcagc agcatcggcg gccagcccaa ctgcaacatc 120

tgcagagtgt gcgccggcta cttccggttc aagaagttct gcagcagcac ccacaacgcc 180

gagtgcgagt gcatcgaggg cttccactgc ctgggccccc agtgcaccag atgcgagaag 240

gactgcagac ccggccagga actgaccaag cagggctgta agacctgcag cctgggcacc 300

ttcaacgacc agaacgggac cggcgtgtgc cggccttgga ccaattgcag cctggacggg 360

agaagcgtgc tgaaaaccgg caccaccgag aaggacgtcg tgtgcggccc tcccgtggtg 420

tccttcagcc ctagcaccac catcagcgtg acccctgaag gcggccctgg cggacactct 480

ctgcaggtcc tggtcgacga acagttatat tttcagggcg gctcacccaa atctgcagac 540

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 600

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 660

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 720

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 780

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 840

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 900

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 960

caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1020

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1080

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1140

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1200

tccctgtctc cgggtaaatc cggaggcctg aacgacatct tcgaggccca gaagattgaa 1260

tggcacgag 1269

<210> 90
<211> 227
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc

<400> 90

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 91
<211> 422
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> thể dung hợp khóa Fc 4-1BB người

<400> 91

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys
165 170 175

Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
180 185 190

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
195 200 205

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
210 215 220

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
225 230 235 240

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
245 250 255

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
260 265 270

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
275 280 285

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
290 295 300

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
305 310 315 320

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
325 330 335

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
340 345 350

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
355 360 365

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
370 375 380

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
385 390 395 400

Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
405 410 415

Lys Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 92
<211> 422
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> thể dung hợp khóa Fc 4-1BB Khỉ đuôi dài

<400> 92

Leu Gln Asp Leu Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Ser Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Lys Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Ile Ser Gly Tyr His Cys Leu Gly Ala Glu Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Ala Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro Lys
165 170 175

Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
180 185 190

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
195 200 205

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
210 215 220

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
225 230 235 240

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
245 250 255

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
260 265 270

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
275 280 285

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
290 295 300

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
305 310 315 320

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
325 330 335

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
340 345 350

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
355 360 365

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
370 375 380

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
385 390 395 400

Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
405 410 415

Lys Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 93
<211> 423
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> thể dung hợp khóa Fc 4-1BB chuột

<400> 93

Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys
1 5 10 15

Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30

Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe
35 40 45

Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr His Asn Ala Glu Cys Glu Cys
50 55 60

Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys
65 70 75 80

Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys
85 90 95

Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr
115 120 125

Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro Pro Val Val Ser Phe Ser Pro
130 135 140

Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly Gly His Ser
145 150 155 160

Leu Gln Val Leu Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Pro
165 170 175

Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
180 185 190

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
195 200 205

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
210 215 220

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
225 230 235 240

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
245 250 255

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
260 265 270

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
275 280 285

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
290 295 300

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
305 310 315 320

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
325 330 335

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
340 345 350

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
355 360 365

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
370 375 380

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
385 390 395 400

Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala
405 410 415

Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
420

<210> 94
<211> 594
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 4-1BB người được gắn đuôi His

<400> 94
ctgcaggacc cctgcagcaa ctgccctgcc ggcaccttct gcgacaacaa ccggaaccag 60

atctgcagcc cctgcccccc caacagcttc agctctgccg gcggacagcg gacctgcgac 120

atctgcagac agtgcaaggg cgtgttcaga acccggaaag agtgcagcag caccagcaac 180

gccgagtgcg actgcacccc cggcttccat tgtctgggag ccggctgcag catgtgcgag 240

caggactgca agcagggcca ggaactgacc aagaagggct gcaaggactg ctgcttcggc 300

accttcaacg accagaagcg gggcatctgc cggccctgga ccaactgtag cctggacggc 360

aagagcgtgc tggtcaacgg caccaaagaa cgggacgtcg tgtgcggccc agccctgct 420

gatctgtctc ctggggccag cagcgtgacc cctcctgccc ctgccagaga gcctggccac 480

tctcctcagg tcgacgaaca gttatatttt cagggcggct caggcctgaa cgacatcttc 540

gaggcccaga agatcgagtg gcacgaggct cgagctcacc accatcacca tcac 594

<210> 95
<211> 198
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 4-1BB người được gắn đuôi His

<400> 95

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Gly Leu
165 170 175

Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Arg Ala
180 185 190

His His His His His His
195

<210> 96
<211> 178
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu

<210> 97
<211> 366
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL dime được nối bởi (G4S)2

<400> 97

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
180 185 190

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
195 200 205

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
210 215 220

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
225 230 235 240

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
245 250 255

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
260 265 270

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
275 280 285

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
290 295 300

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
305 310 315 320

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
325 330 335

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
340 345 350

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
355 360 365

<210> 98
<211> 360
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (80-254) dime được nối bởi tác nhân liên kết (G4S)2

<400> 98

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
50 55 60

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
180 185 190

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
195 200 205

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
210 215 220

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
225 230 235 240

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
245 250 255

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
260 265 270

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
275 280 285

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
290 295 300

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
305 310 315 320

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
325 330 335

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
340 345 350

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
355 360

<210> 99
<211> 416
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (52-254) dime được nối bởi tác nhân liên kết (G4S)2

<400> 99

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190

Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser
195 200 205

Gly Gly Gly Gly Ser Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro
210 215 220

Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
225 230 235 240

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
245 250 255

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

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
275 280 285

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
290 295 300

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
305 310 315 320

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
325 330 335

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
340 345 350

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
355 360 365

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
370 375 380

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
385 390 395 400

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
405 410 415

<210> 100
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(4B9) CDR-H1

<400> 100

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FAP(4B9) CDR-H2

<400> 101

Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 102
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(4B9) CDR-H3

<400> 102

Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr
1 5

<210> 103
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(4B9) CDR-L1

<400> 103

Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(4B9) CDR-L2

<400> 104

Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(4B9) CDR-L3

<400> 105

Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 106
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(4B9) VH

<400> 106

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 Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 107
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FAP(4B9) VL

<400> 107

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 Thr 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 Asn Val Gly Ser Arg 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 Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 108
<211> 718
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime - chuỗi khóa Fc CH1*

<400> 108

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

50 55 60

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
385 390 395 400

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
405 410 415

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
420 425 430

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
435 440 445

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
450 455 460

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
465 470 475 480

Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
485 490 495

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
500 505 510

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
515 520 525

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
530 535 540

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
545 550 555 560

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
565 570 575

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
580 585 590

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
595 600 605

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
610 615 620

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
625 630 635 640

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
645 650 655

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
660 665 670

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
675 680 685

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
690 695 700

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 109
<211> 301
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome-CL*

<400> 109

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
195 200 205

Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
210 215 220

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
225 230 235 240

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
245 250 255

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
260 265 270

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
275 280 285

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
290 295 300

<210> 110
<211> 296
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome-(G4S)1- CL*

<400> 110

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

```
Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
            100                 105                 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
        115                 120                 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
    130                 135                 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145                 150                 155                 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
                165                 170                 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val
            180                 185                 190

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
        195                 200                 205

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
    210                 215                 220

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
225                 230                 235                 240

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
                245                 250                 255

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
            260                 265                 270

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
        275                 280                 285

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    290                 295
```

<210> 111
<211> 756
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (52-254) dime - Chuỗi khóa Fc CH1*

<400> 111

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190

Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser
195 200 205

Gly Gly Gly Gly Ser Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro
210 215 220

Gly Ser Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
225 230 235 240

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
245 250 255

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

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
275 280 285

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
290 295 300

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
305 310 315 320

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
325 330 335

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
340 345 350

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
355 360 365

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
370 375 380

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
385 390 395 400

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
405 410 415

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
420 425 430

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
435 440 445

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
450 455 460

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
465 470 475 480

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
485 490 495

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
500 505 510

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser
515 520 525

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
530 535 540

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
545 550 555 560

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
565 570 575

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
580 585 590

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
595 600 605

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
610 615 620

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
625 630 635 640

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
645 650 655

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
660 665 670

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
675 680 685

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
690 695 700

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
705 710 715 720

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
725 730 735

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
740 745 750

Ser Pro Gly Lys
755

<210> 112
<211> 320
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (52-254) monome -CL*

<400> 112

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190

Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser
195 200 205

Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
210 215 220

Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
225 230 235 240

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
245 250 255

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
260 265 270

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
275 280 285

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
290 295 300

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
305 310 315 320

<210> 113
<211> 700
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (80-254) dime - Chuỗi khóa Fc CH1*

<400> 113

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
50 55 60

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
180 185 190

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
195 200 205

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
210 215 220

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
225 230 235 240

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
245 250 255

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
260 265 270

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
275 280 285

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
290 295 300

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
305 310 315 320

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
325 330 335

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
340 345 350

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
355 360 365

Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
370 375 380

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu
385 390 395 400

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
405 410 415

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
420 425 430

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
435 440 445

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
450 455 460

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
465 470 475 480

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
485 490 495

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
500 505 510

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
515 520 525

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
530 535 540

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
545 550 555 560

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
565 570 575

Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
580 585 590

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
595 600 605

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
610 615 620

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

625 630 635 640

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
645 650 655

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
660 665 670

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
675 680 685

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695 700

<210> 114
<211> 292
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (80-254) monome -CL*

<400> 114

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
50 55 60

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
180 185 190

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

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
210 215 220

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
225 230 235 240

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
245 250 255

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
260 265 270

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
275 280 285

Arg Gly Glu Cys
290

<210> 115
<211> 722
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime - Chuỗi khóa Fc CL*

<400> 115

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
385 390 395 400

Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
405 410 415

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
420 425 430

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
435 440 445

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys

450 455 460

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
465 470 475 480

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp
485 490 495

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
500 505 510

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
515 520 525

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
530 535 540

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
545 550 555 560

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
565 570 575

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
580 585 590

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
595 600 605

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
610 615 620

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
625 630 635 640

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
645 650 655

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
660 665 670

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
675 680 685

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
690 695 700

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
705 710 715 720

Gly Lys

<210> 116
<211> 297
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome-CH1*

<400> 116

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val

130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu
210 215 220

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
225 230 235 240

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
245 250 255

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
260 265 270

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
275 280 285

Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
290 295

<210> 117
<211> 722
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime - Chuỗi khóa Fc CL

<400> 117

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
385 390 395 400

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
405 410 415

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
420 425 430

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
435 440 445

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
450 455 460

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
465 470 475 480

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp
485 490 495

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
500 505 510

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
515 520 525

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
530 535 540

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
545 550 555 560

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
565 570 575

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
580 585 590

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
595 600 605

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
610 615 620

Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
625 630 635 640

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
645 650 655

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
660 665 670

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
675 680 685

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
690 695 700

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
705 710 715 720

Gly Lys

<210> 118
<211> 297
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome- CH1

<400> 118

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
210 215 220

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
225 230 235 240

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
245 250 255

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
260 265 270

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
275 280 285

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
290 295

<210> 119
<211> 710
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-248) dime - Chuỗi khóa Fc CL*

<400> 119

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val

35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
180 185 190

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
195 200 205

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
210 215 220

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
225 230 235 240

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
245 250 255

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
260 265 270

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
275 280 285

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
290 295 300

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
305 310 315 320

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
325 330 335

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
340 345 350

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
370 375 380

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
385 390 395 400

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
405 410 415

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
420 425 430

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
435 440 445

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
450 455 460

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
465 470 475 480

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
485 490 495

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
500 505 510

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
515 520 525

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
530 535 540

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
545 550 555 560

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
565 570 575

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
580 585 590

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
595 600 605

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
610 615 620

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
625 630 635 640

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
645 650 655

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
660 665 670

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
675 680 685

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
690 695 700

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710

<210> 120
<211> 291
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-248) monome - CH1*

<400> 120

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys
180 185 190

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

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
210 215 220

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
225 230 235 240

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
245 250 255

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
260 265 270

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro
275 280 285

Lys Ser Cys
290

<210> 121
<211> 833
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1) được dung hợp với hu 4-1BBL (71-254) dime

<400> 121

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn 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 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 Gly Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp
450 455 460

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
465 470 475 480

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
485 490 495

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
500 505 510

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
515 520 525

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
530 535 540

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
545 550 555 560

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
565 570 575

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
580 585 590

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
595 600 605

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
610 615 620

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly
625 630 635 640

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser
645 650 655

Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala
660 665 670

Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp
675 680 685

Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser
690 695 700

Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr
705 710 715 720

Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly
725 730 735

Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala
740 745 750

Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser
755 760 765

Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His
770 775 780

Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg
785 790 795 800

Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu
805 810 815

Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser
820 825 830

Glu

<210> 122
<211> 639
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi khóa Fc kháng FAP (28H1) được dung hợp với hu 4-1BBL (71-254) monome

<400> 122

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn 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 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 Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu 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 Tyr 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 Gly Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp
450 455 460

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
465 470 475 480

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
485 490 495

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
500 505 510

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val
515 520 525

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
530 535 540

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
545 550 555 560

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
565 570 575

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
580 585 590

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
595 600 605

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
610 615 620

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
625 630 635

<210> 123
<211> 834
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với hu 4-1BBL (71-254) dime

<400> 123

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 Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

```
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
450 455 460

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
465 470 475 480

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
485 490 495

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
500 505 510

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
515 520 525

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
530 535 540

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
545 550 555 560

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
565 570 575

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
580 585 590

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
595 600 605

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
610 615 620

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu
645 650 655

Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe
660 665 670

Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser
675 680 685

Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu
690 695 700

Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val
705 710 715 720

Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu
725 730 735

Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser
740 745 750

Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala
755 760 765

Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu

770 775 780

His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala
785 790 795 800

Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly
805 810 815

Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg
820 825 830

Ser Glu

<210> 124
<211> 640
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với hu 4-1BBL (71-254)monome

<400> 124

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

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

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

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
450 455 460

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
465 470 475 480

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
485 490 495

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
500 505 510

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
515 520 525

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
530 535 540

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
545 550 555 560

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

565 570 575

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
580 585 590

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
595 600 605

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
610 615 620

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
625 630 635 640

<210> 125
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)

<400> 125

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr 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 Asn Val Gly Ser Arg 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 Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 126
<211> 822
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với hu 4-1BBL (71-248) dime

<400> 126

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 Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
450 455 460

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
465 470 475 480

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
485 490 495

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
500 505 510

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
515 520 525

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
530 535 540

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
545 550 555 560

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
565 570 575

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
580 585 590

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
595 600 605

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
610 615 620

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
625 630 635 640

Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala
645 650 655

Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln
660 665 670

Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly
675 680 685

Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr
690 695 700

Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln
705 710 715 720

Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser
725 730 735

Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala
740 745 750

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

755 760 765

Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln
770 775 780

Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp
785 790 795 800

Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro
805 810 815

Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820

<210> 127
<211> 634
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với hu 4-1BBL (71-248)monome

<400> 127

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 Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
450 455 460

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
465 470 475 480

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
485 490 495

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
500 505 510

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
515 520 525

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
530 535 540

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
545 550 555 560

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

565 570 575

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
580 585 590

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
595 600 605

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
610 615 620

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
625 630

<210> 128
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tác nhân liên kết peptit G4S

<400> 128

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 129
<211> 2166
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime - Chuỗi khóa Fc CL*

<400> 129
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaaggggggc 1140

ggaggttccg gagggggagg atctcgtacg gtggctgcac catctgtctt tatcttccca 1200

cccagcgacc ggaagctgaa gtctggcaca gccagcgtcg tgtgcctgct gaataacttc 1260

taccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaatg ccctgcagag cggcaacagc 1320

caggaaagcg tgaccgagca ggacagcaag gactccacct acagcctgag cagcaccctg 1380

accctgagca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gacccaccag 1440

ggcctgtcta gccccgtgac caagagcttc aaccggggcg agtgcgacaa gacccacacc 1500

tgtcctccat gccctgcccc tgaagctgct ggcggcccta gcgtgttcct gttcccccca 1560

aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg acccctgaag tgacctgcgt ggtggtggat 1620

gtgtcccacg aggaccctga agtgaagttc aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac 1680

aatgccaaga ccaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1740

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1800

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1860

ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1920

tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1980

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 2040

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 2100

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 2160

ggtaaa 2166

<210> 130
<211> 891
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome-CH1*

<400> 130
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggct ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggccggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

agactgggag tgcatctgca cacagaggcc agagccaggc acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg cctgcctagc 540

cctagatctg aaggcggcgg aggttccgga ggcggaggat ctgctagcac aaagggcccc 600

agcgtgttcc ctctggcccc tagcagcaag agcacatctg gcggaacagc cgccctgggc 660

tgcctggtgg aagattactt ccccgagccc gtgaccgtgt cctggaattc tggcgccctg 720

acaagcggcg tgcacacctt tccagccgtg ctgcagagca gcggcctgta ctctctgagc 780

agcgtcgtga cagtgcccag cagctctctg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac 840

cacaagccca gcaacaccaa ggtggacgag aaggtggaac ccaagtcctg c 891

<210> 131
<211> 2154
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime - Chuỗi khóa Fc CH1*

<400> 131
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaagggggc 1140

ggaggaagcg gaggggggagg aagtgctagc accaagggcc cctccgtgtt ccccctggcc 1200

cccagcagca agagcaccag cggcggcaca gccgctctgg gctgcctggt cgaggactac 1260

ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc 1320

ttccccgccg tgctgcagag ttctggcctg tatagcctga gcagcgtggt caccgtgcct 1380

tctagcagcc tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc 1440

aaggtggacg agaaggtgga gcccaagagc tgcgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 1500

ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac 1560

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 1620

gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1680

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1740

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc 1800

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1860

accctgcccc catgccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 1920

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1980

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 2040

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 2100

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 2154

<210> 132
<211> 903
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome-CL*

<400> 132
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctcgtacggt ggctgcacca 600

tctgtcttca tcttcccgcc atctgatcgg aagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg 660

tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc 720

ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 780

agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 840

tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag 900

tgt 903

<210> 133
<211> 1350
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc kháng FAP (VHCL) (28H1)

<400> 133
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcgtggcc 360

gctcccagcg tgttcatctt cccacccagc gacgagcagc tgaagtccgg cacagccagc 420

gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac 480

aacgccctgc agagcggcaa cagccaggaa tccgtgaccg agcaggacag caaggactcc 540

acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg 600

tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg tccagccccg tgaccaagag cttcaaccgg 660

ggcgagtgcg acaagaccca cacctgtccc ccttgccctg cccctgaagc tgctggtggc 720

ccttccgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 780

gaagtgacct gcgtggtggt cgatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 840

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtgcaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctctcgtgc gcagtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctcgtg agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

<210> 134
<211> 639
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ kháng FAP (VLCH1) (28H1)

<400> 134
gagatcgtgc tgacccagtc tcccggcacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgagctgca gagccagcca gagcgtgagc cggagctacc tggcctggta tcagcagaag 120

cccggccagg cccccagact gctgatcatc ggcgccagca cccgggccac cggcatcccc 180

gatagattca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatcag ccggctggaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggccagg tgatcccccc caccttcggc 300

cagggcacca aggtggaaat caagagcagc gcttccacca aaggcccttc cgtgtttcct 360

ctggctccta gctccaagtc cacctctgga ggcaccgctg ctctcggatg cctcgtgaag 420

gattattttc ctgagcctgt gacagtgtcc tggaatagcg gagcactgac ctctggagtg 480

catactttcc ccgctgtgct gcagtcctct ggactgtaca gcctgagcag cgtggtgaca 540

gtgcccagca gcagcctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc 600

aacaccaagg tggacaagaa ggtggaaccc aagtcttgt 639

<210> 135
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc kháng FAP (VHCL) (28H1)

<400> 135

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 136
<211> 213
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ kháng FAP (VLCH1) (28H1)

<400> 136

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 Arg Ser
20 25 30

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

Ile Ile Gly Ala Ser Thr 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 Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 137
<211> 1572
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome- Chuỗi khóa Fc CH1*

<400> 137

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggct ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggccggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

agactgggag tgcatctgca cacagaggcc agagccaggc acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg cctgcctagc 540

cctagatctg aaggcggcgg aggttccgga ggcggaggat ctgctagcac caagggcccc 600

tccgtgttcc ccctggcccc cagcagcaag agcaccagcg gcggcacagc cgctctgggc 660

tgcctggtcg aggactactt ccccgagccc gtgaccgtgt cctggaacag cggagccctg 720

acctccggcg tgcacacctt ccccgccgtg ctgcagagtt ctggcctgta tagcctgagc 780

agcgtggtca ccgtgccttc tagcagcctg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac 840

cacaagccca gcaacaccaa ggtggacgag aaggtggagc ccaagagctg cgacaaaact 900

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gctgcagggg gaccgtcagt cttcctcttc 960

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 1020

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1080

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1140

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1200

tccaacaaag ccctcggcgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1260

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tgccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1320

agcctgtggt gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1380

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1440

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1500

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1560

tctccgggta aa 1572

<210> 138
<211> 1485

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime -CL*

<400> 138
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaaggggggc 1140

ggaggttccg gaggggggagg atctcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 1200

ccatctgatc ggaagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 1260

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 1320

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 1380

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 1440

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 1485

<210> 139
<211> 718
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome- Chuỗi khóa Fc CL*

<400> 139

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
385 390 395 400

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
405 410 415

Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
420 425 430

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
435 440 445

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
450 455 460

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
465 470 475 480

Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
485 490 495

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
500 505 510

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
515 520 525

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
530 535 540

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
545 550 555 560

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
565 570 575

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
580 585 590

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
595 600 605

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
610 615 620

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
625 630 635 640

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
645 650 655

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
660 665 670

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
675 680 685

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
690 695 700

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 140
<211> 495
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime -CL*

<400> 140

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
385 390 395 400

Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
405 410 415

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
420 425 430

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
435 440 445

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
450 455 460

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
465 470 475 480

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
485 490 495

<210> 141
<211> 2499
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc kháng FAP (28H1) được dung hợp với hu 4-1BBL (71-254) dime

<400> 141
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag 360

ggcccctccg tgttcccccc ggcccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgct 420

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcgga 480

gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagttctgg cctgtatagc 540

ctgagcagcg tggtcaccgt gccttctagc agcctgggca cccagaccta catctgcaac 600

gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaagg tggagcccaa gagctgcgac 660

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc 720

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 780

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960

aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020

cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080

caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200

ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320

tccctgtctc cgggtggagg cggcggaagc ggaggaggag gatccagaga gggccctgag 1380

ctgagccccg atgatcctgc tggactgctg gacctgcggc agggcatgtt tgctcagctg 1440

gtggcccaga acgtgctgct gatcgatggc cccctgtcct ggtacagcga tcctggactg 1500

gctggcgtgt cactgacagg cggcctgagc tacaaagagg acaccaaaga actggtggtg 1560

gccaaggccg gcgtgtacta cgtgttcttt cagctggaac tgcggagagt ggtggccggc 1620

gaaggatctg gctctgtgtc tctggccctg catctgcagc ctctgagaag cgctgctggc 1680

gctgcagctc tggcactgac agtggatctg cctcctgcca gctccgaggc ccggaatagc 1740

gcatttgggt ttcaaggcag gctgctgcac ctgtctgccg gccagaggct gggagtgcat 1800

ctgcacacag aggccagggc tagacacgcc tggcagctga cacagggcgc tacagtgctg 1860

ggcctgttca gagtgacccc cgagattcca gccggcctgc cttctccaag aagcgaaggc 1920

ggaggcggat ctggcggcgg aggatctaga gagggacccg aactgtcccc tgacgatcca 1980

gccgggctgc tggatctgag acagggaatg ttcgcccagc tggtggctca gaatgtgctg 2040

ctgattgacg gacctctgag ctggtactcc gacccagggc tggcaggggt gtccctgact 2100

gggggactgt cctacaaaga agatacaaaa gaactggtgg tggctaaagc tggggtgtac 2160

tatgtgtttt ttcagctgga actgaggcgg gtggtggctg gggagggctc aggatctgtg 2220

tccctggctc tgcatctgca gccactgcgc tctgctgctg gcgcagctgc actggctctg 2280

actgtggacc tgccaccagc ctctagcgag gccagaaaca gcgccttcgg gttccaagga 2340

cgcctgctgc atctgagcgc cggacagcgc ctgggagtgc atctgcatac tgaagccaga 2400

gcccggcatg cttggcagct gactcagggg gcaactgtgc tgggactgtt tcgcgtgaca 2460

cctgagatcc ctgccggact gccaagccct agatcagaa 2499

<210> 142
<211> 1917
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi khóa Fc kháng FAP (28H1) được dung hợp với hu 4-1BBL (71-254)monome

<400> 142
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag 360

ggcccatcgg tcttcccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 480

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 600

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc 720

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 780

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960

aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccctgca gagatgagct gaccaagaac 1080

caggtgtccc tgtggtgtct ggtcaagggc ttctacccca gcgatatcgc cgtggagtgg 1140

gagagcaacg gccagcctga gaacaactac aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac 1200

ggcagcttct tcctgtactc caaactgacc gtggacaaga gccggtggca gcagggcaac 1260

gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacaccca gaagtccctg 1320

agcctgagcc ccggcggagg cggcggaagc ggaggaggag gatccagaga gggccctgag 1380

ctgagccccg atgatcctgc tggactgctg gacctgcggc agggcatgtt tgctcagctg 1440

gtggcccaga acgtgctgct gatcgatggc cccctgtcct ggtacagcga tcctggactg 1500

gctggcgtgt cactgacagg cggcctgagc tacaaagagg acaccaaaga actggtggtg 1560

gccaaggccg gcgtgtacta cgtgttcttt cagctggaac tgcggagagt ggtggccggc 1620

gaaggatctg gctctgtgtc tctggccctg catctgcagc ctctgagaag cgctgctggc 1680

gctgcagctc tggcactgac agtggatctg cctcctgcca gctccgaggc ccggaatagc 1740

gcatttgggt ttcaaggcag gctgctgcac ctgtctgccg gccagaggct gggagtgcat 1800

ctgcacacag aggccagggc tagacacgcc tggcagctga cacagggcgc tacagtgctg 1860

ggcctgttca gagtgacccc cgagattcca gccggcctgc cttctccaag aagcgaa 1917

<210> 143
<211> 888
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome-(G4S)1- CL*

<400> 143
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctcgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 600

ccgccatctg atcggaagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 660

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 720

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 780

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 840

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt 888

<210> 144
<211> 2028
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc [kháng FAP (28H1)]2

<400> 144
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120

cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180

gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300

ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcacaaag 360

ggacctagcg tgttcccccc ggcccccagc agcaagtcta catctggcgg aacagccgcc 420

ctgggctgcc tcgtgaagga ctactttccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaactctggc 480

gctctgacaa gcggcgtgca cacctttcca gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct 540

ctgagcagcg tcgtgacagt gcccagcagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac 600

gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaagg tggaacccaa gagctgcgac 660

ggcggagggg gatctggcgg cggaggatcc gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc 720

ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc 780

tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc 840

atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc gactctgtga agggccggtt caccatctcc 900

cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc 960

gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg ggcaacttcg actactgggg acagggcacc 1020

ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag ggcccctccg tgttcccccc ggcccccagc 1080

agcaagagca ccagcggcgg cacagccgct ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc 1140

gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcgga gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc 1200

gccgtgctgc agagttctgg cctgtatagc ctgagcagcg tggtcaccgt gccttctagc 1260

agcctgggca cccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg 1320

gacaagaagg tggagcccaa gagctgcgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 1380

cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 1440

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 1500

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 1560

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 1620

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc 1680

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg 1740

cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaaggc 1800

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1860

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc 1920

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1980

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 2028

<210> 145
<211> 676
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc [kháng FAP (28H1)]2

<400> 145

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 His
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 Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn 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 Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
260 265 270

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr
275 280 285

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
290 295 300

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
305 310 315 320

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp
325 330 335

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
340 345 350

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
355 360 365

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

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
385 390 395 400

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
405 410 415

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
420 425 430

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
435 440 445

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
450 455 460

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
465 470 475 480

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
485 490 495

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
500 505 510

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
515 520 525

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
530 535 540

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro
545 550 555 560

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
565 570 575

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
580 585 590

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
595 600 605

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
610 615 620

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
625 630 635 640

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
645 650 655

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
660 665 670

Ser Pro Gly Lys
675

<210> 146
<211> 2514
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime - chuỗi khóa Fc FAP (VHCL*)

<400> 146
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaaggggc 1140

ggaggttccg gaggcggagg atctgaggtg cagctgctgg aatccggcgg aggcctggtg 1200

cagcctggcg gatctctgag actgtcctgc gccgcctccg gcttcacctt ctcctcccac 1260

gccatgtcct gggtccgaca ggctcctggc aaaggcctgg aatgggtgtc cgccatctgg 1320

gcctccggcg agcagtacta cgccgactct gtgaagggcc ggttcaccat ctcccgggac 1380

aactccaaga acaccctgta cctgcagatg aactccctgc gggccgagga caccgccgtg 1440

tactactgtg ccaagggctg gctgggcaac ttcgactact ggggccaggg caccctggtc 1500

accgtgtcca gcgctagcgt ggctgcacca tctgtcttta tcttcccacc agcgaccgg 1560

aagctgaagt ctggcacagc cagcgtcgtg tgcctgctga ataacttcta cccccgcgag 1620

gccaaggtgc agtggaaggt ggacaatgcc ctgcagagcg gcaacagcca ggaaagcgtg 1680

accgagcagg acagcaagga ctccacctac agcctgagca gcaccctgac cctgagcaag 1740

gccgactacg agaagcacaa ggtgtacgcc tgcgaagtga cccaccaggg cctgtctagc 1800

cccgtgacca agagcttcaa ccggggcgag tgcgacaaga cccacacctg tcctccatgc 1860

cctgcccctg aagctgctgg cggccctagc gtgttcctgt tccccccaaa gcccaaggac 1920

accctgatga tcagccggac ccctgaagtg acctgcgtgg tggtggatgt gtcccacgag 1980

gaccctgaag tgaagttcaa ttggtacgtg gacggcgtgg aagtgcacaa tgccaagacc 2040

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 2100

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcggc 2160

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 2220

accctgcccc catgccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 2280

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 2340

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 2400

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 2460

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 2514

<210> 147
<211> 1221
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome-FAP (VLCH1*)

<400> 147
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggct ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggccggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

agactgggag tgcatctgca cacagaggcc agagccaggc acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg cctgcctagc 540

cctagatctg aaggcggcgg aggttccgga ggcggaggat ctgagatcgt gctgacccag 600

tctcccggca ccctgagcct gagccctggc gagagagcca ccctgagctg cagagccagc 660

cagagcgtga gccggagcta cctggcctgg tatcagcaga agcccggcca ggcccccaga 720

ctgctgatca tcggcgccag cacccgggcc accggcatcc ccgatagatt cagcggcagc 780

ggctccggca ccgacttcac cctgaccatc agccggctgg aacccgagga cttcgccgtg 840

tactactgcc agcagggcca ggtgatcccc cccaccttcg gccagggcac caaggtggaa 900

atcaagtcct ctgctagcac aaagggcccc agcgtgttcc ctctggcccc tagcagcaag 960

agcacatctg gcggaacagc cgccctgggc tgcctggtgg aagattactt ccccgagccc 1020

gtgaccgtgt cctggaattc tggcgccctg acaagcggcg tgcacacctt tccagccgtg 1080

ctgcagagca gcggcctgta ctctctgagc agcgtcgtga cagtgcccag cagctctctg 1140

ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccca gcaacaccaa ggtggacgag 1200

aaggtggaac ccaagtcctg c 1221

<210> 148
<211> 838
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime - chuỗi khóa Fc FAP (VHCL*)

<400> 148

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu
195 200 205

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
210 215 220

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
225 230 235 240

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
245 250 255

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
275 280 285

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
290 295 300

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
305 310 315 320

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
325 330 335

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
340 345 350

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
355 360 365

Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly
370 375 380

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
385 390 395 400

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
405 410 415

Phe Ser Ser His Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
420 425 430

Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala
435 440 445

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
450 455 460

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
465 470 475 480

Tyr Tyr Cys Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
485 490 495

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
500 505 510

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
515 520 525

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
530 535 540

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
545 550 555 560

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
565 570 575

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
580 585 590

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
595 600 605

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
610 615 620

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
625 630 635 640

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
645 650 655

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
660 665 670

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
675 680 685

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
690 695 700

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
705 710 715 720

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
725 730 735

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
740 745 750

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

755 760 765

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
770 775 780

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
785 790 795 800

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
805 810 815

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
820 825 830

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
835

<210> 149
<211> 407
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome-FAP (VLCH1*)

<400> 149

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
195 200 205

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
210 215 220

Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
225 230 235 240

Leu Leu Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
245 250 255

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
260 265 270

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val
275 280 285

Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser
290 295 300

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
305 310 315 320

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr

325 330 335

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
340 345 350

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
355 360 365

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
370 375 380

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu
385 390 395 400

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
405

<210> 150
<211> 2268
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (52-254) dime - Chuỗi khóa Fc CH1*

<400> 150
ccttgggctg tgtctggcgc tagagcctct cctggatctg ccgccagccc cagactgaga 60

gagggacctg agctgagccc cgatgatcct gccggactgc tggatctgag acagggcatg 120

ttcgcccagc tggtggccca gaacgtgctg ctgatcgatg gccccctgtc ctggtacagc 180

gatcctggac tggctggcgt gtcactgaca ggcggcctga gctacaaaga ggacaccaaa 240

gaactggtgg tggccaaggc cggcgtgtac tacgtgttct tcagctgga actgcggaga 300

gtggtggccg gcgagggatc tggatctgtg tctctggccc tgcatctgca gcccctgaga 360

agcgctgctg gcgctgcagc tctggcactg acagtggatc tgcctcctgc cagctccgag 420

gcccggaata gcgcatttgg gtttcaaggc agactgctgc acctgtctgc cggccagagg 480

ctgggagtgc atctgcacac agaggccagg gctagacacg cctggcagct gacacagggc 540

gctacagtgc tgggcctgtt cagagtgacc cccgagattc agccggact gcccagccct 600

agatctgaag gcggcggagg aagcggaggc ggaggatccc cttgggctgt gtctggcgct 660

agagcctctc ctggatctgc cgccagcccc agactgagag agggacctga gctgagcccc 720

gatgatcctg ccggactgct ggacctgcgg cagggaatgt tcgctcagct ggtggctcag 780

aatgtgctgc tgattgacgg acctctgtcc tggtactccg accctggcct ggcaggggtg 840

tccctgactg ggggactgtc ctacaaagaa gatacaaaag aactggtggt ggctaaagct 900

ggggtgtact atgtgttttt tcagctggaa ctgaggcggg tggtggctgg ggagggctca 960

ggatctgtgt ccctggctct gcatctgcag cctctgcgct ctgctgctgg cgcagctgca 1020

ctggctctga ctgtggacct gccaccagcc tctagcgagg ccagaaacag cgccttcggg 1080

ttccaaggac ggctgctgca tctgagcgcc ggacagcgcc tgggagtgca tctgcatact 1140

gaagccagag cccggcatgc ttggcagctg acccaggggg caactgtgct gggactgttt 1200

cgcgtgacac ctgagatccc cgctggcctg cctagcccaa gaagtgaagg gggaggcgga 1260

tctggcggag ggggatctgc tagcaccaag ggcccctccg tgttccccct ggcccccagc 1320

agcaagagca ccagcggcgg cacagccgct ctgggctgcc tggtcgagga ctacttcccc 1380

gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcgga gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc 1440

gccgtgctgc agagttctgg cctgtatagc ctgagcagcg tggtcaccgt gccttctagc 1500

agcctgggca cccagaccta catctgcaac gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg 1560

gacgagaagg tggagcccaa gagctgcgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 1620

cctgaagctg caggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 1680

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 1740

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 1800

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 1860

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc 1920

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1980

cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc 2040

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 2100

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 2160

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 2220

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaa 2268

<210> 151
<211> 960
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (52-254) monome -CL*

<400> 151
ccttgggctg tgtctggcgc tagagcctct cctggatctg ccgccagccc cagactgaga 60

gagggacctg agctgagccc cgatgatcct gccggactgc tggatctgag acagggcatg 120

ttcgcccagc tggtggccca gaacgtgctg ctgatcgatg gccccctgtc ctggtacagc 180

gatcctggac tggctggcgt gtcactgaca ggcggcctga gctacaaaga ggacaccaaa 240

gaactggtgg tggccaaggc cggcgtgtac tacgtgttct ttcagctgga actgcggaga 300

gtggtggccg gcgagggatc tggatctgtg tctctggccc tgcatctgca gcccctgaga 360

agcgctgctg gcgctgcagc tctggcactg acagtggatc tgcctcctgc cagctccgag 420

gcccggaata gcgcatttgg gtttcaaggc aggctgctgc acctgtctgc cggccagagg 480

ctgggagtgc atctgcacac agaggccagg gctagacacg cctggcagct gacacagggc 540

gctacagtgc tgggcctgtt cagagtgacc cccgagattc cagccggcct gccttctcca 600

agaagcgaag gcggaggcgg atctggcggc ggaggatctc gtacggtggc tgcaccatct 660

gtcttcatct tcccgccatc tgatcggaag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 720

ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgccctc 780

caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 840

ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 900

gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 960

<210> 152
<211> 2100
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (80-254) dime - Chuỗi khóa Fc CH1*

<400> 152
gatcctgccg gcctgctgga tctgcggcag ggaatgtttg cccagctggt ggcccagaac 60

gtgctgctga tcgatggccc cctgagctgg tacagcgatc ctggactggc tggcgtgtca 120

ctgacaggcg gcctgagcta caaagaggac accaaagaac tggtggtggc caaggccggc 180

gtgtactacg tgttctttca gctggaactg cggagagtgg tggccggcga aggatctggc 240

tctgtgtctc tggccctgca tctgcagccc ctgagaagcg ctgctggcgc tgcagctctg 300

gcactgacag tggatctgcc tcctgccagc tccgaggccc ggaatagcgc atttgggttt 360

caaggcagac tgctgcacct gtctgccggc cagaggctgg gagtgcatct gcacacagag 420

gccagggcta gacacgcctg gcagctgaca cagggcgcta cagtgctggg cctgttcaga 480

gtgacccccg agattccagc cggactgccc agccctagat ctgaaggcgg cggaggaagc 540

ggaggcggag gatccgaccc agctggactg ctggacctgc ggcagggaat gttcgctcag 600

ctggtggctc agaatgtgct gctgattgac ggacctctgt cctggtactc cgaccctggc 660

ctggcagggg tgtccctgac tgggggactg tcctacaaag aagatacaaa agaactggtg 720

gtggctaaag ctggggtgta ctatgtgttt tttcagctgg aactgaggcg ggtggtggct 780

ggggagggct caggatctgt gtccctggct ctgcatctgc agcctctgcg ctctgctgct 840

ggcgcagctg cactggctct gactgtggac ctgccaccag cctctagcga ggccagaaac 900

agcgccttcg ggttccaagg acggctgctg catctgagcg ccggacagcg cctgggagtg 960

catctgcata ctgaagccag agcccggcat gcttggcagc tgacccaggg ggcaactgtg 1020

ctgggactgt ttcgcgtgac acctgagatc cccgctggcc tgcctagccc aagaagtgaa 1080

gggggaggcg gatctggcgg agggggatct gctagcacca agggcccctc cgtgttcccc 1140

ctggccccca gcagcaagag caccagcggc ggcacagccg ctctgggctg cctggtcgag 1200

gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg 1260

cacaccttcc ccgccgtgct gcagagttct ggcctgtata gcctgagcag cgtggtcacc 1320

gtgccttcta gcagcctggg cacccagacc tacatctgca acgtgaacca caagcccagc 1380

aacaccaagg tggacgagaa ggtggagccc aagagctgcg acaaaactca cacatgccca 1440

ccgtgcccag cacctgaagc tgcaggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 1500

aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 1560

cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1620

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1680

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1740

ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1800

gtgtacaccc tgccccccatg ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc 1860

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1920

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1980

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 2040

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2100

<210> 153
<211> 876
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (80-254) monome -CL*

<400> 153
gatcctgccg gcctgctgga tctgcggcag ggaatgtttg cccagctggt ggcccagaac 60

gtgctgctga tcgatggccc cctgagctgg tacagcgatc ctggactggc tggcgtgtca 120

ctgacaggcg gcctgagcta caaagaggac accaaagaac tggtggtggc caaggccggc 180

gtgtactacg tgttctttca gctggaactg cggagagtgg tggccggcga aggatctggc 240

tctgtgtctc tggccctgca tctgcagccc ctgagaagcg ctgctggcgc tgcagctctg 300

gcactgacag tggatctgcc tcctgccagc tccgaggccc ggaatagcgc atttgggttt 360

caaggcaggc tgctgcacct gtctgccggc cagaggctgg gagtgcatct gcacacagag 420

gccagggcta gacacgcctg gcagctgaca cagggcgcta cagtgctggg cctgttcaga 480

gtgacccccg agattccagc cggcctgcct tctccaagaa gcgaaggcgg aggcggatct 540

ggcggcggag gatctcgtac ggtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat 600

cggaagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga 660

gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt 720

gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc 780

aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 840

tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgt 876

<210> 154
<211> 1317
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi DP47 Fc KK

<400> 154
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaaag ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagcgctaa gaccaccccc 360

cctagcgtgt accctctggc ccctggatct gccgcccaga ccaacagcat ggtgaccctg 420

ggctgcctgg tgaagggcta cttccccgag cctgtgaccg tgacctggaa cagcggcagc 480

ctgagcagcg gcgtgcacac ctttccagcc gtgctgcaga gcgacctgta caccctgagc 540

agctccgtga ccgtgcctag cagcacctgg cccagccaga cagtgacctg caacgtggcc 600

caccctgcca gcagcaccaa ggtggacaag aaaatcgtgc cccgggactg cggctgcaag 660

ccctgcatct gcaccgtgcc cgaggtgtcc agcgtgttca tcttcccacc caagcccaag 720

gacgtgctga ccatcaccct gacccccaaa gtgacctgcg tggtggtggc catcagcaag 780

gacgaccccg aggtgcagtt ctcttggttt gtggacgacg tggaggtgca cacagcccag 840

acaaagcccc gggaggaaca gatcaacagc accttcagaa gcgtgtccga gctgcccatc 900

atgcaccagg actggctgaa cggcaaagaa ttcaagtgca gagtgaacag cgccgccttc 960

ggcgccccca tcgagaaaac catcagcaag accaagggca gacccaaggc cccccaggtg 1020

tacaccatcc ccccacccaa aaaacagatg gccaaggaca aggtgtccct gacctgcatg 1080

atcaccaact ttttccccga ggacatcacc gtggagtggc agtggaatgg ccagcccgcc 1140

gagaactaca agaacaccca gcccatcatg aagaccgacg gcagctactt cgtgtacagc 1200

aagctgaacg tgcagaagtc caactgggag gccggcaaca ccttcacctg tagcgtgctg 1260

cacgagggcc tgcacaacca ccacaccgag aagtccctga gccactcccc cggcaag 1317

<210> 155
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ DP47

<400> 155
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc 300

caggggacca aagtggaaat caaacgtgcc gatgctgcac caactgtatc gattttccca 360

ccatccagtg agcagttaac atctggaggt gcctcagtcg tgtgcttctt gaacaacttc 420

taccccaaag acatcaatgt caagtggaag attgatggca gtgaacgaca aaatggcgtc 480

ctgaacagtt ggactgatca ggacagcaaa gacagcacct acagcatgag cagcaccctc 540

acgttgacca aggacgagta tgaacgacat aacagctata cctgtgaggc cactcacaag 600

acatcaactt cacccattgt caagagcttc aacaggaatg agtgt 645

<210> 156
<211> 439
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi DP47 Fc KK

<400> 156

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
115 120 125

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

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

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

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

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

Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys
210 215 220

Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
245 250 255

Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
260 265 270

Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile
275 280 285

Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
305 310 315 320

Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
325 330 335

Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Lys Gln Met Ala Lys
340 345 350

Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp

355 360 365

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
370 375 380

Asn Thr Gln Pro Ile Met Lys Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
385 390 395 400

Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
405 410 415

Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
420 425 430

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435

<210> 157
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ DP47

<400> 157

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
130 135 140

Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
145 150 155 160

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 158
<211> 2298
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 4-1BBL (104-309, C160S)dime của chuột - ADN của chuỗi CL Fc DD
<400> 158
agaaccgagc ccagacccgc cctgaccatc accaccagcc ctaacctggg caccagagag 60

aacaacgccg accaagtgac ccccgtgtcc cacatcggct gccccaatac cacacagcag 120

ggcagccctg tgttcgccaa gctgctggcc aagaaccagg ccagcctgag caacaccacc 180

ctgaactggc acagccagga tggcgccgga agcagctatc tgagccaggg cctgagatac 240

gaagaggaca agaaagaact ggtggtggac agccctggcc tgtactacgt gttcctggaa 300

ctgaagctga gccccacctt caccaacacc ggccacaagg tgcagggctg ggtgtcactg 360

gtgctgcagg ccaaacccca ggtggacgac ttcgacaacc tggccctgac cgtggaactg 420

ttcccctgca gcatggaaaa caagctggtg gatcggagct ggtcccagct tctgctgctg 480

aagggcggac acagactgag cgtgggcctg agggcttatc tgcacggcgc ccaggacgcc 540

tacagagact gggagctgag ctaccccaac acaaccagct tcggcctgtt cctcgtgaag 600

cccgacaacc cttgggaagg cggcggaggc tccggaggag gcggatctag aacagagcct 660

cggcctgccc tgacaattac cacatccccc aatctgggca cccgggaaaa caatgcagat 720

caagtgacac ctgtgtctca tattgggtgc cccaacacta cccagcaggg gtccccagtg 780

tttgctaaac tgctggctaa aaatcaggcc tccctgtcta acacaacact gaattggcat 840

agtcaggacg gggctggcag cagctacctg tctcagggac tgcgctatga ggaagataag 900

aaagaactgg tggtggattc ccccggactg tactatgtgt ttctggaact gaaactgtcc 960

cctaccttta caaataccgg gcacaaagtg cagggatggg tgtccctggt gctgcaggct 1020

aagcctcagg tggacgattt tgataatctg gctctgacag tggaactgtt tccttgctct 1080

atggaaaaca aactggtgga ccgctcttgg agccagttgc tgctgctgaa agctggccac 1140

cggctgtctg tgggactgag agcatacctg catggggcac aggatgccta ccgggattgg 1200

gaactgtcct accctaacac tacttccttc ggactgttcc tcgtgaaacc tgataatccc 1260

tgggagggcg gaggcggaag tggcggaggg ggatccagag ctgatgctgc ccctaccgtg 1320

tccatcttcc cacccagcag cgagcagctg acatctgggg gagctagcgt cgtgtgcttc 1380

ctgaacaact tctaccccaa ggacatcaac gtgaagtgga agatcgacgg cagcgagcgg 1440

cagaacggcg tgctgaatag ctggaccgac caggacagca aggactccac ctacagcatg 1500

agcagcaccc tgaccctgac caaggacgag tacgagcggc acaacagcta cacatgcgag 1560

gccacccaca agaccagcac cagccccatc gtgaagtcct tcaaccggaa cgagtgcgtg 1620

cccagagact gcggctgcaa gccttgcatc tgcaccgtgc ctgaggtgtc cagcgtgttc 1680

atcttcccac ccaagcccaa ggacgtgctg accatcaccc tgacacccaa agtgacctgc 1740

gtggtggtgg ccatcagcaa ggatgacccc gaggtgcagt tcagttggtt cgtggacgac 1800

gtggaagtgc acaccgctca gaccaagccc agagaggaac agatcaacag caccttcaga 1860

agcgtgtccg agctgcccat catgcaccag gactggctga acggcaaaga attcaagtgc 1920

agagtgaaca gcgccgcctt tggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa gaccaagggc 1980

agacccaagg ccccccaggt gtacacaatc cccccaccca aagaacagat ggccaaggac 2040

aaggtgtccc tgacctgcat gatcaccaat ttcttcccag aggatatcac cgtggaatgg 2100

cagtggaacg gccagcccgc cgagaactac gacaacaccc agcctatcat ggacaccgac 2160

ggctcctact tcgtgtacag cgacctgaac gtgcagaagt ccaactggga ggccggcaac 2220

accttcacct gtagcgtgct gcacgagggc ctgcacaacc accacaccga gaagtccctg 2280

tcccacagcc ctggcaag 2298

<210> 159
<211> 954
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 4-1BBL (104-309, C160S) monome của chuột- CH1 ADN

<400> 159
agaaccgagc ccagacccgc cctgaccatc accaccagcc ctaacctggg caccagagag 60

aacaacgccg accaagtgac ccccgtgtcc cacatcggct gccccaatac cacacagcag 120

ggcagccctg tgttcgccaa gctgctggcc aagaaccagg ccagcctgag caacaccacc 180

ctgaactggc acagccagga tggcgccgga agcagctatc tgagccaggg cctgagatac 240

gaagaggaca agaaagaact ggtggtggac agccctggcc tgtactacgt gttcctggaa 300

ctgaagctga gccccacctt caccaacacc ggccacaagg tgcagggctg ggtgtcactg 360

gtgctgcagg ccaaacccca ggtggacgac ttcgacaacc tggccctgac cgtggaactg 420

ttcccctgca gcatggaaaa caagctggtg gatcggagct ggtcccagct tctgctgctg 480

aaggccggac acagactgag cgtgggcctg agggcttatc tgcacggcgc ccaggacgcc 540

tacagagact gggagctgag ctaccccaac acaaccagct tcggcctgtt cctcgtgaag 600

cccgacaacc cttgggaagg cggcggaggc tccggaggag gcggaagcgc taagaccacc 660

ccccccagcg tgtaccctct ggcccctgga tctgccgccc agaccaacag catggtgacc 720

ctgggctgcc tggtgaaggg ctacttcccc gagcctgtga ccgtgacctg gaacagcggc 780

agcctgagca gcggcgtgca cacctttcca gccgtgctgc agagcgacct gtacaccctg 840

agcagctccg tgaccgtgcc tagcagcacc tggcccagcc agacagtgac ctgcaacgtg 900

gcccaccctg ccagcagcac caaggtggac aagaaaatcg tgccccggga ctgc 954

<210> 160
<211> 766
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 4-1BBL (104-309, C160S) dime của chuột - chuỗi CL Fc DD

<400> 160

Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu
1 5 10 15

Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile
20 25 30

Gly Cys Pro Asn Thr Thr Gln Gln Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu
35 40 45

Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His
50 55 60

Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr
65 70 75 80

Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr
85 90 95

Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His
100 105 110

Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val
115 120 125

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

Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg Ser Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu
145 150 155 160

Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly
165 170 175

Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr
180 185 190

Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly
195 200 205

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu
210 215 220

Thr Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp

225 230 235 240

Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile Gly Cys Pro Asn Thr Thr Gln Gln
245 250 255

Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu
260 265 270

Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser
275 280 285

Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val
290 295 300

Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser
305 310 315 320

Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu
325 330 335

Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ala Leu
340 345 350

Thr Val Glu Leu Phe Pro Cys Ser Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg
355 360 365

Ser Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val
370 375 380

Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp
385 390 395 400

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

Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
420 425 430

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
435 440 445

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
450 455 460

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
465 470 475 480

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
485 490 495

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
500 505 510

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
515 520 525

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Val Pro Arg Asp Cys
530 535 540

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
545 550 555 560

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
565 570 575

Lys Val Thr Cys Val Val Val Ala Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val
580 585 590

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
595 600 605

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
610 615 620

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
625 630 635 640

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
645 650 655

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro
660 665 670

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
675 680 685

Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
690 695 700

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Asp Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
705 710 715 720

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Asp Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
725 730 735

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
740 745 750

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
755 760 765

<210> 161
<211> 318
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 4-1BBL (104-309, C160S) monome của chuột - CH1

<400> 161

Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu
1 5 10 15

Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln Val Thr Pro Val Ser His Ile
20 25 30

Gly Cys Pro Asn Thr Thr Gln Gln Gly Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu
35 40 45

Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Ser Asn Thr Thr Leu Asn Trp His
50 55 60

Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr
65 70 75 80

Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr
85 90 95

Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly His
100 105 110

Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val
115 120 125

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

Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg Ser Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu
145 150 155 160

Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly
165 170 175

Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr
180 185 190

Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro Asp Asn Pro Trp Glu Gly Gly
195 200 205

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
210 215 220

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
225 230 235 240

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
245 250 255

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
260 265 270

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
275 280 285

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
290 295 300

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
305 310 315

<210> 162
<211> 1341
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)
<400> 162
gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300

ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360

aagggcccct ccgtgttccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc 420

gctctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc 480

ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat 540

agcctgagca gcgtggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 163
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ kháng FAP (4B9)
<400> 163
gagatcgtgc tgacccagtc ccccggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgtcctgca gagcctccca gtccgtgacc tcctcctacc tcgcctggta tcagcagaag 120

cccggccagg cccctcggct gctgatcaac gtgggcagtc ggagagccac cggcatccct 180

gaccggttct ccggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggcatca tgctgccccc caccttggc 300

cagggcacca aggtggaaat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 164
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9)

<400> 164

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 Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

85 90 95

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 165
<211> 2166
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) dime - Chuỗi khóa Fc CL ADN

<400> 165
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 540

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 600

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 660

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 720

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 780

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 840

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 900

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 960

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 1020

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 1080

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaaggggggc 1140

ggaggttccg gagggggagg atctcgtacg gtggccgctc cctccgtgtt tatctttccc 1200

ccatccgatg aacagctgaa aagcggcacc gcctccgtcg tgtgtctgct gaacaatttt 1260

taccctaggg aagctaaagt gcagtggaaa gtggataacg cactgcagtc cggcaactcc 1320

caggaatctg tgacagaaca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccaccctg 1380

acactgtcta aggctgatta tgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 1440

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtgacaa gacccacacc 1500

tgtccccctt gtcctgcccc tgaagctgct ggcggccctt ctgtgttcct gttcccccca 1560

aagcccaagg acaccctgat gatcagccgg acccccgaag tgacctgcgt ggtggtggat 1620

gtgtcccacg aggaccctga agtgaagttc aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac 1680

aatgccaaga ccaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1740

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1800

aaagccctcg gcgcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa 1860

ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1920

tggtgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1980

cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 2040

ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 2100

tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 2160

ggtaaa 2166

<210> 166
<211> 891
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-254) monome- CH1 ADN

<400> 166
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggct ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggccggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

agactgggag tgcatctgca cacagaggcc agagccaggc acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg cctgcctagc 540

cctagatctg aaggcggcgg aggttccgga ggcggaggat ctgctagcac caaaggccct 600

tccgtgtttc ctctggctcc tagctccaag tccacctctg gaggcaccgc tgctctcgga 660

tgcctcgtga aggattattt tcctgagcct gtgacagtgt cctggaatag cggagcactg 720

acctctggag tgcatacttt ccccgctgtg ctgcagtcct ctggactgta cagcctgagc 780

agcgtggtga cagtgcccag cagcagcctg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac 840

cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaggtggaac ccaagtcttg t 891

<210> 167
<211> 2502
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với ADN của hu 4-1BBL (71-254) dime

<400> 167
gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300

ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360

aagggcccct ccgtgttccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc 420

gctctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc 480

ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat 540

agcctgagca gcgtggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctccgggtgg aggcggcgga agcggaggag gaggatccag agagggccct 1380

gagctgagcc ccgatgatcc tgctggactg ctggacctgc ggcagggcat gtttgctcag 1440

ctggtggccc agaacgtgct gctgatcgat ggcccctgt cctggtacag cgatcctgga 1500

ctggctggcg tgtcactgac aggcggcctg agctacaaag aggacaccaa agaactggtg 1560

gtggccaagg ccggcgtgta ctacgtgttc tttcagctgg aactgcggag agtggtggcc 1620

ggcgaaggat ctggctctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag aagcgctgct 1680

ggcgctgcag ctctggcact gacagtggat ctgcctcctg ccagctccga ggcccggaat 1740

agcgcatttg ggtttcaagg caggctgctg cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg 1800

catctgcaca cagaggccag ggctagacac gcctggcagc tgacacaggg cgctacagtg 1860

ctgggcctgt tcagagtgac ccccgagatt ccagccggcc tgccttctcc aagaagcgaa 1920

ggcggaggcg gatctggcgg cggaggatct agagagggac ccgaactgtc ccctgacgat 1980

ccagccgggc tgctggatct gagacaggga atgttcgccc agctggtggc tcagaatgtg 2040

ctgctgattg acggacctct gagctggtac tccgacccag ggctggcagg ggtgtccctg 2100

actgggggac tgtcctacaa agaagataca aaagaactgg tggtggctaa agctggggtg 2160

tactatgtgt tttttcagct ggaactgagg cgggtggtgg ctggggaggg ctcaggatct 2220

gtgtccctgg ctctgcatct gcagccactg cgctctgctg ctggcgcagc tgcactggct 2280

ctgactgtgg acctgccacc agcctctagc gaggccagaa acagcgcctt cgggttccaa 2340

ggacgcctgc tgcatctgag cgccggacag cgcctgggag tgcatctgca tactgaagcc 2400

agagcccggc atgcttggca gctgactcag ggggcaactg tgctgggact gtttcgcgtg 2460

acacctgaga tccctgccgg actgccaagc cctagatcag aa 2502

<210> 168
<211> 1920
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với ADN hu 4-1BBL (71-254) monome

<400> 168
gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300

ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360

aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccct gcagagatga gctgaccaag 1080

aaccaggtgt ccctgtggtg tctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggag 1140

tgggagagca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 1200

gacggcagct tcttcctgta ctccaaactg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 1260

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1320

ctgagcctga gccccggcgg aggcggcgga agcggaggag gaggatccag agagggccct 1380

gagctgagcc ccgatgatcc tgctggactg ctggacctgc ggcagggcat gtttgctcag 1440

ctggtggccc agaacgtgct gctgatcgat ggcccctgt cctggtacag cgatcctgga 1500

ctggctggcg tgtcactgac aggcggcctg agctacaaag aggacaccaa agaactggtg 1560

gtggccaagg ccggcgtgta ctacgtgttc tttcagctgg aactgcggag agtggtggcc 1620

ggcgaaggat ctggctctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag aagcgctgct 1680

ggcgctgcag ctctggcact gacagtggat ctgcctcctg ccagctccga ggcccggaat 1740

agcgcatttg ggtttcaagg caggctgctg cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg 1800

catctgcaca cagaggccag ggctagacac gcctggcagc tgacacaggg cgctacagtg 1860

ctgggcctgt tcagagtgac ccccgagatt ccagccggcc tgccttctcc aagaagcgaa 1920

<210> 169
<211> 2130
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-248) dime - Chuỗi khóa Fc CL* ADN

<400> 169
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg actgggaggc 540

ggcggatctg gcggcggagg atctagagaa ggacccgagc tgtcccctga cgatccagcc 600

gggctgctgg atctgagaca gggaatgttc gcccagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 660

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 720

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 780

gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 840

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gcagcagggg ctgcagcact ggccctgact 900

gtggacctgc ccccagcttc ttccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 960

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 1020

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 1080

gagatccccg ctggactggg cggaggcggt tccggagggg gaggatctcg tacggtggct 1140

gcaccatctg tctttatctt cccacccagc gaccggaagc tgaagtctgg cacagccagc 1200

gtcgtgtgcc tgctgaataa cttctacccc cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac 1260

aatgccctgc agagcggcaa cagccaggaa agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc 1320

acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg 1380

tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg tctagccccg tgaccaagag cttcaaccgg 1440

ggcgagtgcg acaagaccca cacctgtcct ccatgccctg cccctgaagc tgctggcggc 1500

cctagcgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggacccct 1560

gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 1620

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac 1680

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1740

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1800

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag 1860

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1920

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1980

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 2040

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 2100

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2130

<210> 170
<211> 873
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-248) monome - CH1* ADN

<400> 170
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg actgggaggc 540

ggaggttccg gaggcggagg atctgctagc acaaagggcc ccagcgtgtt ccctctggcc 600

cctagcagca agagcacatc tggcggaaca gccgccctgg gctgcctggt ggaagattac 660

ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaat tctggcgccc tgacaagcgg cgtgcacacc 720

tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg tactctctga gcagcgtcgt gacagtgccc 780

agcagctctc tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc 840

aaggtggacg agaaggtgga acccaagtcc tgc 873

<210> 171
<211> 2130
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu 4-1BBL (71-248) dime - Chuỗi khóa Fc CL ADN

<400> 171

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg actgggaggc 540

ggcggatctg gcggcggagg atctagagaa ggacccgagc tgtcccctga cgatccagcc 600

gggctgctgg atctgagaca gggaatgttc gcccagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 660

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 720

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 780

gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 840

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gcagcagggg ctgcagcact ggccctgact 900

gtggacctgc ccccagcttc ttccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 960

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 1020

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 1080

gagatccccg ctggactggg cggaggcggt tccggagggg gaggatctcg tacggtggcc 1140

gctccctccg tgtttatctt tcccccatcc gatgaacagc tgaaaagcgg caccgcctcc 1200

gtcgtgtgtc tgctgaacaa tttttaccct agggaagcta aagtgcagtg gaaagtggat 1260

aacgcactgc agtccggcaa ctcccaggaa tctgtgacag aacaggactc caaggacagc 1320

acctactccc tgtcctccac cctgacactg tctaaggctg attatgagaa acacaaagtc 1380

tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg 1440

ggagagtgtg acaagaccca cacctgtccc ccttgtcctg cccctgaagc tgctggcggc 1500

ccttctgtgt tcctgttccc cccaaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggaccccc 1560

gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg 1620

tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac 1680

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1740

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1800

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatg ccgggatgag 1860

ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1920

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1980

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 2040

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 2100

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2130

<210> 172
<211> 873
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-248) monome - CH1 ADN

<400> 172
agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 60

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccct gtcctggtac 120

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 180

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 240

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 300

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 360

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 420

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 480

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg actgggaggc 540

ggaggttccg gaggcggagg atctgctagc accaaaggcc cttccgtgtt tcctctggct 600

cctagctcca agtccacctc tggaggcacc gctgctctcg gatgcctcgt gaaggattat 660

tttcctgagc ctgtgacagt gtcctggaat agcggagcac tgacctctgg agtgcatact 720

ttccccgctg tgctgcagtc ctctggactg tacagcctga gcagcgtggt gacagtgccc 780

agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc 840

aaggtggaca agaaggtgga acccaagtct tgt 873

<210> 173
<211> 710
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-248) dime - Chuỗi khóa Fc CL

<400> 173

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro

180 185 190

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
195 200 205

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
210 215 220

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
225 230 235 240

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
245 250 255

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
260 265 270

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
275 280 285

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
290 295 300

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
305 310 315 320

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
325 330 335

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
340 345 350

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
370 375 380

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
385 390 395 400

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
405 410 415

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
420 425 430

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
435 440 445

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
450 455 460

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
465 470 475 480

Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
485 490 495

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
500 505 510

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
515 520 525

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
530 535 540

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
545 550 555 560

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
565 570 575

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
580 585 590

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
595 600 605

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
610 615 620

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
625 630 635 640

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
645 650 655

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
660 665 670

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
675 680 685

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
690 695 700

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710

<210> 174
<211> 291
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu 4-1BBL (71-248) monome - CH1

<400> 174

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Thr Lys
180 185 190

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

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
210 215 220

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
225 230 235 240

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
245 250 255

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
260 265 270

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
275 280 285

Lys Ser Cys
290

<210> 175
<211> 2466
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi ổ Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với hu 4-1BBL (71-248) dime

ADN

<400> 175

gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300

ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360

aagggcccct ccgtgttccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagcgg cggcacagcc 420

gctctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc 480

ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat 540

agcctgagca gcgtggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctccgggtgg aggcggcgga agcggaggag gaggatccag agagggccct 1380

gagctgagcc ccgatgatcc tgctggactg ctggacctgc ggcagggcat gtttgctcag 1440

ctggtggccc agaacgtgct gctgatcgat ggccccctgt cctggtacag cgatcctgga 1500

ctggctggcg tgtcactgac aggcggcctg agctacaaag aggacaccaa agaactggtg 1560

gtggccaagg ccggcgtgta ctacgtgttc tttcagctgg aactgcggag agtggtggcc 1620

ggcgaaggat ctggctctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag aagcgctgct 1680

ggcgctgcag ctctggcact gacagtggat ctgcctcctg ccagctccga ggcccggaat 1740

agcgcatttg ggtttcaagg caggctgctg cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg 1800

catctgcaca cagaggccag ggctagacac gcctggcagc tgacacaggg cgctacagtg 1860

ctgggcctgt tcagagtgac ccccgagatt ccagccggcc tgggcggagg cggatctggc 1920

ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg tcccctgacg atccagccgg gctgctggat 1980

ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct 2040

ctgagctggt actccgaccc agggctggca ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac 2100

aaagaagata caaaagaact ggtggtggct aaagctgggg tgtactatgt gtttttcag 2160

ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat 2220

ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca 2280

ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg 2340

agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg 2400

cagctgactc agggggcaac tgtgctggga ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc 2460

ggactg 2466

<210> 176
<211> 1902
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi khóa Fc kháng FAP (4B9) được dung hợp với ADN của hu 4-1BBL (71-248) monome

<400> 176
gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

tcttgcgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120

cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300

ttcggcggct tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360

aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccct gcagagatga gctgaccaag 1080

aaccaggtgt ccctgtggtg tctggtcaag ggcttctacc ccagcgatat cgccgtggag 1140

tgggagagca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggacagc 1200

gacggcagct tcttcctgta ctccaaactg accgtggaca agagccggtg gcagcagggc 1260

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1320

ctgagcctga gccccggcgg aggcggcgga agcggaggag gaggatccag agagggccct 1380

gagctgagcc ccgatgatcc tgctggactg ctggacctgc ggcagggcat gtttgctcag 1440

ctggtggccc agaacgtgct gctgatcgat ggcccctgt cctggtacag cgatcctgga 1500

ctggctggcg tgtcactgac aggcggcctg agctacaaag aggacaccaa agaactggtg 1560

gtggccaagg ccggcgtgta ctacgtgttc tttcagctgg aactgcggag agtggtggcc 1620

ggcgaaggat ctggctctgt gtctctggcc ctgcatctgc agcctctgag aagcgctgct 1680

ggcgctgcag ctctggcact gacagtggat ctgcctcctg ccagctccga ggcccggaat 1740

agcgcatttg ggtttcaagg caggctgctg cacctgtctg ccggccagag gctgggagtg 1800

catctgcaca cagaggccag ggctagacac gcctggcagc tgacacaggg cgctacagtg 1860

ctgggcctgt tcagagtgac ccccgagatt ccagccggcc tg 1902

<210> 177
<211> 2496
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi ổ Fc DP47 được dung hợp với hu ADN của 4-1BBL (71-254) dime

<400> 177

gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360

ccctccgtgt tccccctggc ccccagcagc aagagcacca gcggcggcac agccgctctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc 480

ctgacctccg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg 540

agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgcgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgtg caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tcgtgagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtggaggcgg cggaagcgga ggaggaggat ccagagaggg ccctgagctg 1380

agccccgatg atcctgctgg actgctggac ctgcggcagg gcatgtttgc tcagctggtg 1440

gcccagaacg tgctgctgat cgatggcccc ctgtcctggt acagcgatcc tggactggct 1500

ggcgtgtcac tgacaggcgg cctgagctac aaagaggaca ccaaagaact ggtggtggcc 1560

aaggccggcg tgtactacgt gttctttcag ctggaactgc ggagagtggt ggccggcgaa 1620

ggatctggct ctgtgtctct ggccctgcat ctgcagcctc tgagaagcgc tgctggcgct 1680

gcagctctgg cactgacagt ggatctgcct cctgccagct ccgaggcccg gaatagcgca 1740

tttgggtttc aaggcaggct gctgcacctg tctgccggcc agaggctggg agtgcatctg 1800

cacacagagg ccagggctag acacgcctgg cagctgacac agggcgctac agtgctgggc 1860

ctgttcagag tgacccccga gattccagcc ggcctgcctt ctccaagaag cgaaggcgga 1920

ggcggatctg gcggcggagg atctagagag ggacccgaac tgtcccctga cgatccagcc 1980

gggctgctgg atctgagaca gggaatgttc gcccagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 2040

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 2100

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 2160

gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 2220

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gctgctggcg cagctgcact ggctctgact 2280

gtggacctgc caccagcctc tagcgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 2340

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 2400

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 2460

gagatccctg ccggactgcc aagccctaga tcagaa 2496

<210> 178
<211> 1914
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi khóa Fc DP47 được dung hợp với ADN của hu 4-1BBL (71-254) monome

<400> 178
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360

ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccctgcagag atgagctgac caagaaccag 1080

gtgtccctgt ggtgtctggt caagggcttc taccccagcg atatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaacggcc agcctgagaa caactacaag accacccccc ctgtgctgga cagcgacggc 1200

agcttcttcc tgtactccaa actgaccgtg gacaagagcc ggtggcagca gggcaacgtg 1260

ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacccagaa gtccctgagc 1320

ctgagccccg gcggaggcgg cggaagcgga ggaggaggat ccagagaggg ccctgagctg 1380

agccccgatg atcctgctgg actgctggac ctgcggcagg gcatgtttgc tcagctggtg 1440

gcccagaacg tgctgctgat cgatggcccc ctgtcctggt acagcgatcc tggactggct 1500

ggcgtgtcac tgacaggcgg cctgagctac aaagaggaca ccaaagaact ggtggtggcc 1560

aaggccggcg tgtactacgt gttctttcag ctggaactgc ggagagtggt ggccggcgaa 1620

ggatctggct ctgtgtctct ggccctgcat ctgcagcctc tgagaagcgc tgctggcgct 1680

gcagctctgg cactgacagt ggatctgcct cctgccagct ccgaggcccg gaatagcgca 1740

tttgggtttc aaggcaggct gctgcacctg tctgccggcc agaggctggg agtgcatctg 1800

cacacagagg ccagggctag acacgcctgg cagctgacac agggcgctac agtgctgggc 1860

ctgttcagag tgacccccga gattccagcc ggcctgcctt ctccaagaag cgaa 1914

<210> 179
<211> 834
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc DP47 được dung hợp với hu 4-1BBL (71-254) dime

<400> 179

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 Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
450 455 460

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
465 470 475 480

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
485 490 495

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
500 505 510

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
515 520 525

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
530 535 540

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
545 550 555 560

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
565 570 575

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
580 585 590

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
595 600 605

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
610 615 620

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu
645 650 655

Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe
660 665 670

Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser

675 680 685

Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu
690 695 700

Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val
705 710 715 720

Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu
725 730 735

Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser
740 745 750

Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala
755 760 765

Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu
770 775 780

His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala
785 790 795 800

Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly
805 810 815

Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg
820 825 830

Ser Glu

<210> 180
<211> 640
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi khóa Fc DP47 được dung hợp với hu 4-1BBL (71-254) monome

<400> 180

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 Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
450 455 460

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
465 470 475 480

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
485 490 495

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
500 505 510

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
515 520 525

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
530 535 540

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
545 550 555 560

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
565 570 575

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
580 585 590

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
595 600 605

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
610 615 620

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
625 630 635 640

<210> 181
<211> 1335
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng DP47(hu IgG1 PGLALA) ADN

<400> 181
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300

ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgctag caccaagggc 360

ccatcggtct tcccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 960

gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta cacctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1080

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320

ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 182
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng DP47 (hu IgG1 PGLALA)

<400> 182

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 183
<211> 189
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-254) monome cộng tác nhân liên kết (G4S)1

<400> 183

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser
180 185

<210> 184
<211> 188
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (71-248) monome cộng tác nhân liên kết (G4S)2

<400> 184

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
180 185

<210> 185
<211> 183
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hu 4-1BBL (71-248) monome cộng tác nhân liên kết (G4S)1

<400> 185

Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
20 25 30

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
35 40 45

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

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
65 70 75 80

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
85 90 95

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
100 105 110

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
130 135 140

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
145 150 155 160

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
165 170 175

Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser
180

<210> 186
<211> 1602
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN đuôi avi của chuỗi khóa Fc của kháng nguyên CD19 người

<400> 186
cccgaggaac ccctggtcgt gaaggtggaa gagggcgaca atgccgtgct gcagtgcctg 60

aagggcacct ccgatggccc tacccagcag ctgacctggt ccagagagag ccccctgaag 120

cccttcctga agctgtctct gggcctgcct ggcctgggca tccatatgag gcctctggcc 180

atctggctgt tcatcttcaa cgtgtcccag cagatgggcg gcttctacct gtgtcagcct 240

ggcccccat ctgagaaggc ttggcagcct ggctggaccg tgaacgtgga aggatccggc 300

gagctgttcc ggtggaacgt gtccgatctg ggcggcctgg gatgcggcct gaagaacaga 360

tctagcgagg gccccagcag ccccagcggc aaactgatga gccccaagct gtacgtgtgg 420

gccaaggaca gacccgagat ctgggagggc gagcctcctt gcctgccccc tagagacagc 480

ctgaaccaga gcctgagcca ggacctgaca atggcccctg gcagcacact gtggctgagc 540

tgtggcgtgc cacccgactc tgtgtctaga ggccctctga gctggaccca cgtgcaccct 600

aagggcccta agagcctgct gagcctggaa ctgaaggacg acaggcccgc cagagatatg 660

tgggtcatgg aaaccggcct gctgctgcct agagccacag cccaggatgc cggcaagtac 720

tactgccaca gaggcaacct gaccatgagc ttccacctgg aaatcaccgc cagacccgtg 780

ctgtggcact ggctgctgag aacaggcggc tggaaggtcg acgctagcgg tggtagtccg 840

acacctccga cacccggggg tggttctgca gacaaaactc acacatgccc accgtgccca 900

gcacctgaag ccgcaggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 960

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 1020

cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 1080

ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 1140

caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggagcc 1200

cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1260

ctgccccat gccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gcctgtggtg cctggtcaaa 1320

ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1380

tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 1440

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1500

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atccggaggc 1560

ctgaacgaca tcttcgaggc ccagaagatt gaatggcacg ag 1602

<210> 187
<211> 534
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đuôi avi của chuỗi khóa Fc của kháng nguyên CD19 người

<400> 187

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
1 5 10 15

Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
20 25 30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
35 40 45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
50 55 60

Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
65 70 75 80

Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
115 120 125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
130 135 140

Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
165 170 175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro

180 185 190

Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser
195 200 205

Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu
210 215 220

Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr
245 250 255

Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
260 265 270

Val Asp Ala Ser Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly Gly
275 280 285

Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
290 295 300

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
305 310 315 320

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
325 330 335

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
340 345 350

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
355 360 365

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
370 375 380

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala
385 390 395 400

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
405 410 415

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
420 425 430

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
435 440 445

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
450 455 460

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
465 470 475 480

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
485 490 495

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
500 505 510

Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
515 520 525

Lys Ile Glu Trp His Glu
530

<210> 188
<211> 1605
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN đuôi avi của chuỗi khóa Fc của kháng nguyên CD19 khỉ đuôi dài

<400> 188
ccccaggaac ccctggtcgt gaaggtggaa gagggcgaca atgccgtgct ccagtgcctg 60

gaaggcacct ccgatggccc tacacagcag ctcgtgtggt gcagagacag ccccttcgag 120

cccttcctga acctgtctct gggcctgcct ggcatgggca tcagaatggg ccctctgggc 180

atctggctgc tgatcttcaa cgtgtccaac cagaccggcg gcttctacct gtgtcagcct 240

ggcctgccaa gcgagaaggc ttggcagcct ggatggaccg tgtccgtgga aggatctggc 300

gagctgttcc ggtggaacgt gtccgatctg ggcggcctgg gatgcggcct gaagaacaga 360

agcagcgagg gccctagcag ccccagcggc aagctgaata gcagccagct gtacgtgtgg 420

gccaaggaca gacccgagat gtgggagggc gagcctgtgt gtggcccccc tagagatagc 480

ctgaaccaga gcctgagcca ggacctgaca atggcccctg gcagcacact gtggctgagc 540

tgtggcgtgc cacccgactc tgtgtccaga ggccctctga gctggacaca cgtgcggcca 600

aagggcccta agagcagcct gctgagcctg gaactgaagg acgaccggcc cgaccgggat 660

atgtgggtgg tggatacagg cctgctgctg accagagcca cagcccagga tgccggcaag 720

tactactgcc acagaggcaa ctggaccaag agcttttacc tggaaatcac cgccagaccc 780

gccctgtggc actggctgct gagaatcgga ggctggaagg tcgacgctag cggtggtagt 840

ccgacacctc cgacacccgg gggtggttct gcagacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 900

ccagcacctg aagccgcagg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac 960

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa 1020

gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 1080

aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 1140

caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcgga 1200

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1260

accctgcccc catgccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc 1320

aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1380

aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1440

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1500

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatccgga 1560

ggcctgaacg acatcttcga ggcccagaag attgaatggc acgag 1605

<210> 189
<211> 535
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đuôi avi của chuỗi khóa Fc của kháng nguyên CD19 khỉ đuôi dài

<400> 189

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

Leu Gln Cys Leu Glu Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Val
20 25 30

Trp Cys Arg Asp Ser Pro Phe Glu Pro Phe Leu Asn Leu Ser Leu Gly
35 40 45

Leu Pro Gly Met Gly Ile Arg Met Gly Pro Leu Gly Ile Trp Leu Leu
50 55 60

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

Gly Leu Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Ser Val
85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
115 120 125

Ser Gly Lys Leu Asn Ser Ser Gln Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
130 135 140

Pro Glu Met Trp Glu Gly Glu Pro Val Cys Gly Pro Pro Arg Asp Ser
145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
165 170 175

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

Leu Ser Trp Thr His Val Arg Pro Lys Gly Pro Lys Ser Ser Leu Leu
195 200 205

Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Asp Arg Asp Met Trp Val Val
210 215 220

Asp Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Trp Thr Lys Ser Phe Tyr Leu Glu Ile
245 250 255

```
Thr Ala Arg Pro Ala Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Ile Gly Gly Trp
            260                 265                 270

Lys Val Asp Ala Ser Gly Gly Ser Pro Thr Pro Pro Thr Pro Gly Gly
        275                 280                 285

Gly Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
    290                 295                 300

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
305                 310                 315                 320

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
                325                 330                 335

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
            340                 345                 350

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
        355                 360                 365

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
    370                 375                 380

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
385                 390                 395                 400

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                405                 410                 415

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
            420                 425                 430

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
        435                 440                 445

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
    450                 455                 460

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
465                 470                 475                 480
```

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
485 490 495

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
500 505 510

Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala
515 520 525

Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
530 535

<210> 190
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8) HVR-L1 được biến đổi giống như của người

<400> 190

Asn Ser Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 191
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8) HVR-H2 được biến đổi giống như của người

<400> 191

Lys Phe Asn Gly
1

<210> 192
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8) biến thể 1 được biến đổi giống như của người thành 9 HVR-H2

<400> 192

Thr Glu Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met
1 5 10

<210> 193
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8) được biến đổi giống như của người biến thể 5 HVR-L1

<400> 193

Leu Glu Asn Pro Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 194
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8) được biến đổi giống như của người biến thể 9 HVR-L1

<400> 194

Leu Glu Asn Pro Ser Gly Asn Thr
1 5

<210> 195
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-018) CDR-H1

<400> 195

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 196
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-018) CDR-H2

<400> 196

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 197
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-018) CDR-H3

<400> 197

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 198
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-018) CDR-L1

<400> 198

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

<210> 199
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-018) CDR-L2

<400> 199

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 200
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-018) CDR-L3

<400> 200

Leu Gln Leu Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 201
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-018) VH

<400> 201

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 202
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-018) VL

<400> 202

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
85 90 95

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

<210> 203
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)

<400> 203
caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 204
<211> 657
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)

<400> 204
gacatcgtca tgacccagac acccctgtcc ctctctgtga cccctggcca gccagcctca 60

attagctgca agtcctctca aagtctggag aaccccaatg ggaacactta ccttaattgg 120

tatctgcaga aacccggaca atcccctcaa ctcctgatct acagggtctc taagagattc 180

tcaggcgtgc cagatcgctt tagcggttcc gggtctggca cagacttcac cttgaagatt 240

agtcgggttg aagctgagga tgtgggagtc tattactgtc tgcagctcac tcatgtgccc 300

tacacctttg gtcagggcac aaaactggag atcaagcgga ccgtggccgc tccctccgtg 360

ttcatcttcc caccctccga cgagcagctg aagtccggca ccgccagcgt ggtgtgcctg 420

ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480

tccggcaact cccaggaatc cgtgaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg 540

tcctccaccc tgaccctgtc caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgcgaa 600

gtgacccacc agggcctgtc agccccgtg accaagtcct tcaaccgggg cgagtgc 657

<210> 205
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi ổ Fc kháng CD19(8B8-018)

<400> 205

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 206
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ kháng CD19(8B8-018)

<400> 206

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 207
<211> 2514
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi phối tử dime của ổ Fc kháng CD19(8B8-018)

<400> 207
caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 1980

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 2040

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 2100

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 2160

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 2220

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 2280

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 2340

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 2400

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 2460

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaa 2514

<210> 208
<211> 1932
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của phối tử monome khóa Fc kháng CD19(8B8-018)

<400> 208
caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccccc 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aa 1932

<210> 209
<211> 838
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi phối tử dime ổ Fc kháng CD19(8B8-018)

<400> 209

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu
645 650 655

Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg
660 665 670

Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp
675 680 685

Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu
690 695 700

Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
705 710 715 720

Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
725 730 735

Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln
740 745 750

Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp
755 760 765

Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
770 775 780

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu

785 790 795 800

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
805 810 815

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825 830

Pro Ser Pro Arg Ser Glu
835

<210> 210
<211> 644
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phối tử monome khóa Fc kháng CD19(8B8-018)

<400> 210

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu

<210> 211
<211> 2478
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi (71-248) phối tử dime ổ Fc kháng CD19(8B8-018)

<400> 211
caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagcagg cctgggaggc 1920

ggcggatctg gcggcggagg atctagagaa ggacccgagc tgtcccccga cgatcccgct 1980

gggctgctgg atctgagaca gggcatgttc gctcagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 2040

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 2100

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 2160

gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 2220

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gcagcagggg ctgcagcact ggccctgact 2280

gtggacctgc ccccagcttc ttccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 2340

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 2400

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 2460

gagatcccag ccgggctc 2478

<210> 212
<211> 1914

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của phối tử (71-248) khóa Fc kháng CD19(8B8-018)

<400> 212
caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg gctc 1914

<210> 213
<211> 826
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi (71-248) phối tử dime ổ Fc kháng CD19(8B8-018)

<400> 213

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly
625 630 635 640

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
645 650 655

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
660 665 670

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
675 680 685

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
690 695 700

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
705 710 715 720

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
725 730 735

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
740 745 750

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
755 760 765

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
770 775 780

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
785 790 795 800

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
805 810 815

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825

<210> 214
<211> 638
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phối tử (71-248) monome khóa Fc kháng CD19(8B8-018)

<400> 214

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
625 630 635

<210> 215
<211> 363
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của dòng vô tính gốc của CD19 (8B8) VH trình tự nucleotit

<400> 215
gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

gcctgcaagg cttctggata cacattcact gactatatta tgcactgggt gaagcagaag 120

actgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ttctaagtac 180

actgagaagt tcaacggcaa ggccacactg acttcagaca aatcttccat cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagggacc 300

tattattatg gtagcgccct ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

tcg 363

<210> 216
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của dòng vô tính gốc CD19 (8B8) VL trình tự nucleotit

<400> 216
gatgctgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca ggtctagtca gagccttgaa aacagtaatg gaaacaccta tttgaactgg 120

tacctccaga aaccaggcca gtctccacaa ctcctgatct acagggtttc caaacgattt 180

tctggggtcc tagacaggtt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tatttctgcc tacaacttac acatgtcccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 217
<211> 94
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 43-45: 40% Y, 6% A/S/T/G/P/D/N/E/Q/V, 49-51: 40% N, 6%

A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 55-57: 25% S/T/Q/E, 61-63: 25% S/T/Q/E

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (43)..(45)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (49)..(51)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (55)..(57)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (61)..(63)
<223> n là a, c, g hoặc t

<400> 217
cagctgcggg ctctgacccg gtttctggag ataccagttc agnnncgtnn ngccnnngga 60

nnnttccaga gattggctgg atttgcaaga aatg 94

<210> 218
<211> 99
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 40-42: 30% R, 20% E, 5% A/S/T/Y/G/P/D/N/Q/V. 49-51: 30% K, 20% S, 5% A/N/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 55-57: 40% F, 5% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V/I/L, 58-60: 40% S, 6.6% A/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 67-69: 50% P, 50% L

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (40)..(42)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (49)..(51)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (55)..(57)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng

<222> (58)..(60)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (67)..(69)
<223> n là a, c, g hoặc t

<400> 218
ctccagaaac cgggtcagag cccgcagctg ctgatctacn nngtatctnn ncgcnnnnnn 60

ggcgttnnng atcgtttcag cggttctgga tccggcacc 99

<210> 219
<211> 99
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 40-42: 52% H, 4% G/A/S/P/T/N/Y/D/E/Q/V/I, 46-48: 30% I, 15% Y, 5% G/A/S/T/P/N/H/D/E/Q/V, 49-51: 52% Y, 4% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 52-54: 30% D, 15% G, 5% A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 55-57: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 61-63: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (40)..(42)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (46)..(48)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (49)..(51)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (52)..(54)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (55)..(57)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (61)..(63)
<223> n là a, c, g hoặc t

<400> 219

catccactcc agaccctggc ccggggcctg acgaacccan nncatnnnnn nnnnnnngaa 60

nnngtaacca gatgctttgc agctcacttt aacggaagc 99

<210> 220
<211> 99
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 34-36: 45% Y, 5% khác, 40-42: 52% N, 4% khác, 46-48: 40% Y, 5% khác, 49-51: 30% N, 15% S, 5% khác, 52-54: 30% D, 15% G, 5% khác, 55-57: 52% G, 4% khác, 61-63: 30% K, 15% N, 4% khác, 70-72: 30% E, 15% Q, 5% khác

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (34)..(36)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (40)..(42)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (46)..(48)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (49)..(51)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (52)..(54)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (55)..(57)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (61)..(63)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (70)..(72)
<223> n là a, c, g hoặc t

<400> 220
caggccccgg gccagggtct ggagtggatg ggcnnnattn nnccannnnn nnnnnnntcc 60

nnntataccn nnaaattcca gggccgcgtc acgatgacc 99

<210> 221
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 H3 ngịch cố định

<400> 221
cgtcaccggt tcggggaagt agtccttgac cag 33

<210> 222
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LMB3

<400> 222
caggaaacag ctatgaccat gattac 26

<210> 223
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 L1 thuận cố định

<400> 223
tggtatctcc agaaaccggg tcagagcccg cag 33

<210> 224
<211> 84
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 34-36: 52% Y, 4% khác, 37-39: 52% P, 4% khác, 40-42: 42% V, 10% L, 4% khác, 43-45: 52% H, 4% khác, 46-48: 42% T, 10% I, 4% khác, 49-51: 45% L, 11% G, 4% khác

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (34)..(36)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (37)..(39)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (40)..(42)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (43)..(45)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (46)..(48)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (49)..(51)
<223> n là a, c, g hoặc t

<400> 224
tttaatttcc agtttagttc cttgaccgaa ggtnnnnnnn nnnnnnnnnn nctgcagaca 60

atagtagacg ccaacgtctt cagc 84

<210> 225
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 L3 thuận cố định

<400> 225
accttcggtc aaggaactaa actggaaatt aaacg 35

<210> 226
<211> 107
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> pos. 59-61: 50% L, 3.8% khác, 62-64: 50% A, 4.2% khác, 65-67: 50% S, 4.2% khác, 68-70: 50% G, 4.2% khác, 71-73: 50% Y, 4.2% khác, 74-76: 50% Y, 4.2% khác, 77-79: 50% Y, 4.2% khác, 80-82: 50% T, 4.2% khác, 83-85: 50% G, 4.2% khác.

<220>

<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (54)..(58)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (59)..(61)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (62)..(64)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (65)..(67)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (68)..(70)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (71)..(73)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (74)..(76)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (77)..(79)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (80)..(82)
<223> n là a, c, g hoặc t

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (83)..(85)
<223> n là a, c, g hoặc t

<400> 226
ttggtgctag cagagcttac ggtcaccgtg gtaccttggc cccagtaatc aaannnnnnn 60

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gcgtgcacaa tagtaaacag cggtgtc 107

<210> 227
<211> 1615

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 ECD người đuôi SNAP- PDGFR ADN

<400> 227
ggccgccgct agcggcatcg actacaagga cgacgatgac aaggccggca tcgatgccat 60

catggacaaa gactgcgaaa tgaagcgcac caccctggat agccctctgg gcaagctgga 120

actgtctggg tgcgaacagg gcctgcacga gatcaagctg ctgggcaaag gaacatctgc 180

cgccgacgcc gtggaagtgc ctgccccagc cgccgtgctg ggcggaccag agccactgat 240

gcaggccacc gcctggctca acgcctactt tcaccagcct gaggccatcg aggagttccc 300

tgtgccagcc ctgcaccacc cagtgttcca gcaggagagc tttacccgcc aggtgctgtg 360

gaaactgctg aaagtggtga agttcggaga ggtcatcagc taccagcagc tggccgccct 420

ggccggcaat cccgccgcca ccgccgccgt gaaaaccgcc ctgagcggaa atcccgtgcc 480

cattctgatc ccctgccacc gggtggtgtc tagctctggc gccgtggggg gctacgaggg 540

cgggctcgcc gtgaaagagt ggctgctggc ccacgagggc cacagactgg gcaagcctgg 600

gctgggtgat atccccgagg aacccctggt cgtgaaggtg gaagagggcg acaatgccgt 660

gctgcagtgc ctgaagggca cctccgatgg ccctacccag cagctgacct ggtccagaga 720

gagccccctg aagcccttcc tgaagctgtc tctgggcctg cctggcctgg gcatccatat 780

gaggcctctg gccatctggc tgttcatctt caacgtgtcc cagcagatgg gcggcttcta 840

cctgtgtcag cctggccccc catctgagaa ggcttggcag cctggctgga ccgtgaacgt 900

ggaaggatcc ggcgagctgt tccggtggaa cgtgtccgat ctgggcggcc tgggatgcgg 960

cctgaagaac agatctagcg agggccccag cagccccagc ggcaaactga tgagccccaa 1020

gctgtacgtg tgggccaagg acagacccga gatctgggag ggcgagcctc cttgcctgcc 1080

ccctagagac agcctgaacc agagcctgag ccaggacctg acaatggccc ctggcagcac 1140

actgtggctg agctgtggcg tgccacccga ctctgtgtct agaggccctc tgagctggac 1200

ccacgtgcac cctaagggcc ctaagagcct gctgagcctg gaactgaagg acgacaggcc 1260

cgccagagat atgtgggtca tggaaaccgg cctgctgctg cctagagcca cagcccagga 1320

tgccggcaag tactactgcc acagaggcaa cctgaccatg agcttccacc tggaaatcac 1380

cgccagaccc gtgctgtggc actggctgct gagaacaggc ggctggaagg tcgacgaaca 1440

aaaactcatc tcagaagagg atctgaatgc tgtgggccag gacacgcagg aggtcatcgt 1500

ggtgccacac tccttgccct ttaaggtggt ggtgatctca gccatcctgg ccctggtggt 1560

gctcaccatc atctccctta tcatcctcat catgctttgg cagaagaagc cacgt 1615

<210> 228
<211> 1620
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 ECD khỉ đuôi dài đuôi SNAP - PDGFR ADN

<400> 228
ccggccgccg ctagcggcat cgactacaag gacgacgatg acaaggccgg catcgatgcc 60

atcatggaca aagactgcga aatgaagcgc accaccctgg atagccctct gggcaagctg 120

gaactgtctg ggtgcgaaca gggcctgcac gagatcaagc tgctgggcaa aggaacatct 180

gccgccgacg ccgtggaagt gcctgcccca gccgccgtgc tgggcggacc agagccactg 240

atgcaggcca ccgcctggct caacgcctac tttcaccagc ctgaggccat cgaggagttc 300

cctgtgccag ccctgcacca cccagtgttc cagcaggaga gctttacccg ccaggtgctg 360

tggaaactgc tgaaagtggt gaagttcgga gaggtcatca gctaccagca gctggccgcc 420

ctggccggca atcccgccgc caccgccgcc gtgaaaaccg ccctgagcgg aaatcccgtg 480

cccattctga tcccctgcca ccgggtggtg tctagctctg gcgccgtggg gggctacgag 540

ggcgggctcg ccgtgaaaga gtggctgctg gcccacgagg gccacagact gggcaagcct 600

gggctgggtg atatccccca ggaacccctg gtcgtgaagg tggaagaggg cgacaatgcc 660

gtgctccagt gtctcgaggg cacctccgat ggccctacac agcagctcgt gtggtgcaga 720

gacagcccct tcgagccctt cctgaacctg tctctgggcc tgcctggcat gggcatcaga 780

atgggccctc tgggcatctg gctgctgatc ttcaacgtgt ccaaccagac cggcggcttc 840

tacctgtgtc agcctggcct gccaagcgag aaggcttggc agcctggatg gaccgtgtcc 900

gtggaaggat ctggcgagct gttccggtgg aacgtgtccg atctgggcgg cctgggatgc 960

ggcctgaaga acagaagcag cgagggccct agcagcccca gcggcaagct gaatagcagc 1020

cagctgtacg tgtgggccaa ggacagaccc gagatgtggg agggcgagcc tgtgtgtggc 1080

ccccctagag atagcctgaa ccagagcctg agccaggacc tgacaatggc ccctggcagc 1140

acactgtggc tgagctgtgg cgtgccaccc gactctgtgt ccagaggccc tctgagctgg 1200

acacacgtgc ggcctaaggg ccctaagagc agcctgctga gcctggaact gaaggacgac 1260

cggcccgacc gggatatgtg ggtggtggat acaggcctgc tgctgaccag agccacagcc 1320

caggatgccg gcaagtacta ctgccacaga ggcaactgga ccaagagctt ttacctggaa 1380

atcaccgcca gacccgccct gtggcactgg ctgctgagaa tcggaggctg gaaggtcgac 1440

gagcagaagc tgatctccga agaggacctg aacgccgtgg gccaggatac ccaggaagtg 1500

atcgtggtgc cccacagcct gcccttcaag gtggtcgtga tcagcgccat tctggccctg 1560

gtggtgctga ccatcatcag cctgatcatc ctgattatgc tgtggcagaa aaagccccgc 1620

<210> 229
<211> 539
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 ECD người đuôi SNAP- PDGFR

<400> 229

Pro Ala Ala Ala Ser Gly Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala
1 5 10 15

Gly Ile Asp Ala Ile Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr
20 25 30

Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly
35 40 45

Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala
50 55 60

Val Glu Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu
65 70 75 80

Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala
85 90 95

Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln
100 105 110

Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys
115 120 125

Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn
130 135 140

Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val
145 150 155 160

Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val
165 170 175

Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His
180 185 190

Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Asp Ile Pro Glu Glu
195 200 205

Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val Leu Gln Cys
210 215 220

Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr Trp Ser Arg
225 230 235 240

Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly Leu Pro Gly
245 250 255

Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe Ile Phe Asn
260 265 270

Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly Pro Pro
275 280 285

Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val Glu Gly Ser
290 295 300

Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu Gly Cys
305 310 315 320

Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser Gly Lys
325 330 335

Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro Glu Ile
340 345 350

Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser Leu Asn Gln
355 360 365

Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp Leu
370 375 380

Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro Leu Ser Trp
385 390 395 400

Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser Leu Glu Leu
405 410 415

Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu Thr Gly Leu
420 425 430

Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr Tyr Cys His
435 440 445

Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr Ala Arg Pro
450 455 460

Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys Val Asp Glu
465 470 475 480

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ala Val Gly Gln Asp Thr
485 490 495

Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu Pro Phe Lys Val Val Val
500 505 510

Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu Ile
515 520 525

Ile Leu Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro Arg
530 535

<210> 230
<211> 540
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 ECD khỉ đuôi dài đuôi SNAP - PDGFR

<400> 230

Pro Ala Ala Ala Ser Gly Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala
1 5 10 15

Gly Ile Asp Ala Ile Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr
20 25 30

Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly
35 40 45

Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala
50 55 60

Val Glu Val Pro Ala Pro Ala Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu
65 70 75 80

Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala
85 90 95

Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln
100 105 110

Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys
115 120 125

Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn
130 135 140

Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val
145 150 155 160

Pro Ile Leu Ile Pro Cys His Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val
165 170 175

Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His
180 185 190

Glu Gly His Arg Leu Gly Lys Pro Gly Leu Gly Asp Ile Pro Gln Glu
195 200 205

Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val Leu Gln Cys
210 215 220

Leu Glu Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Val Trp Cys Arg
225 230 235 240

Asp Ser Pro Phe Glu Pro Phe Leu Asn Leu Ser Leu Gly Leu Pro Gly
245 250 255

Met Gly Ile Arg Met Gly Pro Leu Gly Ile Trp Leu Leu Ile Phe Asn
260 265 270

Val Ser Asn Gln Thr Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly Leu Pro
275 280 285

Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Ser Val Glu Gly Ser
290 295 300

Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu Gly Cys
305 310 315 320

Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser Gly Lys
325 330 335

Leu Asn Ser Ser Gln Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro Glu Met
340 345 350

Trp Glu Gly Glu Pro Val Cys Gly Pro Pro Arg Asp Ser Leu Asn Gln
355 360 365

Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Leu Trp Leu
370 375 380

Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro Leu Ser Trp
385 390 395 400

Thr His Val Arg Pro Lys Gly Pro Lys Ser Ser Leu Leu Ser Leu Glu
405 410 415

Leu Lys Asp Asp Arg Pro Asp Arg Asp Met Trp Val Val Asp Thr Gly
420 425 430

Leu Leu Leu Thr Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr Tyr Cys
435 440 445

His Arg Gly Asn Trp Thr Lys Ser Phe Tyr Leu Glu Ile Thr Ala Arg
450 455 460

Pro Ala Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Ile Gly Gly Trp Lys Val Asp

465 470 475 480

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ala Val Gly Gln Asp
485 490 495

Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu Pro Phe Lys Val Val
500 505 510

Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu Thr Ile Ile Ser Leu
515 520 525

Ile Ile Leu Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro Arg
530 535 540

<210> 231
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5H09) CDR-L1

<400> 231

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Ser Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 232
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19(8B8-5H09) CDR-L2

<400> 232

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 233
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19(8B8-5H09) CDR-L3

<400> 233

Leu Gln Leu Ile Asp Tyr Pro Val Thr
1 5

<210> 234
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19(8B8-5H09) CDR-H1

<400> 234

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 235
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19(8B8-5H09) CDR-H2

<400> 235

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 236
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR(8B8-5H09) CDR-H3

<400> 236

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 237
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19(8B8-7H07) CDR-L1

<400> 237

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 238
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-7H07) CDR-L2

<400> 238

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 239
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-7H07) CDR-L3

<400> 239

Leu Gln Ala Thr His Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 240
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-7H07) CDR-H1

<400> 240

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 241
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-7H07) CDR-H2

<400> 241

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 242
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-7H07) CDR-H3

<400> 242

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 243
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B03) CDR-L1

<400> 243

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 244
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B03) CDR-L2

<400> 244

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 245
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B03) CDR-L3

<400> 245

Leu Gln Leu Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 246
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B03) CDR-H1

<400> 246

Asp Tyr Ile Thr His
1 5

<210> 247
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B03) CDR-H2

<400> 247

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 248
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B03) CDR-H3

<400> 248

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Asp Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 249
<211> 16

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B11) CDR-L1

<400> 249

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Thr Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 250
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B11) CDR-L2

<400> 250

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 251
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B11) CDR-L3

<400> 251

Leu Gln Leu Leu Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 252
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B11) CDR-H1

<400> 252

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 253
<211> 17
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B11) CDR-H2

<400> 253

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 254
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B11) CDR-H3

<400> 254

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 255
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5A07) CDR-L1

<400> 255

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 256
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5A07) CDR-L2

<400> 256

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 257
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5A07) CDR-L3

<400> 257

Leu Gln Pro Gly His Tyr Pro Gly Thr
1 5

<210> 258
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5A07) CDR-H1

<400> 258

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 259
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5A07) CDR-H2

<400> 259

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 260
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5A07) CDR-H3

<400> 260

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

1 5 10

<210> 261
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-L1

<400> 261

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 262
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-L2

<400> 262

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 263
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-L3

<400> 263

Leu Gln Leu Asp Ser Tyr Pro Asn Thr
1 5

<210> 264
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-H1

<400> 264

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 265
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-H2

<400> 265

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 266
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5B08) CDR-H3

<400> 266

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 267
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5D08) CDR-L1

<400> 267

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 268
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5D08) CDR-L2

<400> 268

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 269
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5D08) CDR-L3

<400> 269

Leu Gln Leu Thr His Glu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 270
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5D08) CDR-H1

<400> 270

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 271
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5D08) CDR-H2

<400> 271

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 272
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5D08) CDR-H3

<400> 272

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 273
<211> 657
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ gốc CD19 (8B8)

<400> 273
gatgctgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca ggtctagtca gagccttgaa aacagtaatg gaaacaccta tttgaactgg 120

tacctccaga aaccaggcca gtctccacaa ctcctgatct acagggtttc caaacgattt 180

tctggggtcc tagacaggtt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tatttctgcc tacaacttac acatgtcccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 274
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nặng gốc CD19 (8B8)

<400> 274
gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

gcctgcaagg cttctggata cacattcact gactatatta tgcactgggt gaagcagaag 120

actgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ttctaagtac 180

actgagaagt tcaacggcaa ggccacactg acttcagaca aatcttccat cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagggacc 300

tattattatg gtagcgccct ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

tcggctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 275
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ gốc CD19 (8B8)

<400> 275

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Leu
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 Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Leu
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu 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> 276
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng gốc CD19 (8B8)

<400> 276

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

Ser Val Lys Met Ala Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Ile Met His Trp Val Lys Gln Lys Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys

450

<210> 277
<211> 657
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ CD19 (8B8-2B11)

<400> 277
gatattgtca tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaccacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagctgct ggaagatcca 300

tacaccttcg gtcaaggaac gaaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 278
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nặng CD19 (8B8-2B11)

<400> 278
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

ggggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 279
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ CD19 (8B8-2B11)

<400> 279

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
85 90 95

Leu Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 280
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-2B11)

<400> 280

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 281
<211> 657

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ CD19 (8B8-7H07)

<400> 281
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcaggcaac ccatatccca 300

tacaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 282
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nặng CD19 (8B8-7H07)

<400> 282
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gttctgaact gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 283
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-7H07)

<400> 283

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala
85 90 95

Thr His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 284
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-7H07)

<400> 284

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

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

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

35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 285
<211> 657
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ CD19 (8B8-2B03)

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (320)..(321)
<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 285
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagttgac ccacgttccg 300

tacaccttcg gtcaaggaan naaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 286
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nặng CD19 (8B8-2B03)

<400> 286
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca cgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccagatct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 287
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-2B03)

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (107)..(107)
<223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ

<400> 287

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Xaa Lys Leu 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> 288
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-2B03)

<400> 288

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Asp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 289
<211> 657
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5A07)

<400> 289
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagccagg tcattaccca 300

ggtaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 290
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nặng CD19 (8B8-5A07)

<400> 290
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtact 300

tactactacg gttccgccct ctttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 291
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5A07)

<400> 291

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

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

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

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

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

Gly His Tyr Pro Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 292
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-5A07)

<400> 292

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 293
<211> 657
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5D08)

<400> 293
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagctgac ccatgaacca 300

tacaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 294
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nặng CD19 (8B8-5D08)

<400> 294
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gttctgaact gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 295
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5D08)

<400> 295

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu

85 90 95

Thr His Glu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 296
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-5D08)

<400> 296

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 297
<211> 657
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5B08)

<400> 297
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa acctccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagctgga ttcttaccca 300

aacaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 298
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nặng CD19 (8B8-5B08)

<400> 298
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 299
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5B08)

<400> 299

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
85 90 95

Asp Ser Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 300
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-5B08)

<400> 300

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 301
<211> 657
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5H09)

<400> 301
gatattgtta tgactcaaac tccactgtct ctgtccgtga ccccgggtca gccagcgagc 60

atttcttgca aatccagcca atctctggaa tcttccaccg gcaacacgta cctgaactgg 120

tatctccaga aaccgggtca gagcccgcag ctgctgatct accgtgtatc taagcgcttc 180

tccggcgttc ctgatcgttt cagcggttct ggatccggca ccgactttac tctgaaaatc 240

agccgtgtgg aagctgaaga cgttggcgtc tactattgtc tgcagctgat cgattaccca 300

gttaccttcg gtcaaggaac taaactggaa attaaacgta cggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 302
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nặng CD19 (8B8-5H09)

<400> 302
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gttctgcact gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 303
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CD19 (8B8-5H09)

<400> 303

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
85 90 95

Ile Asp Tyr Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 304
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng CD19 (8B8-5H09)

<400> 304

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 305
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi ổ Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 305
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 306
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 306

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

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

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

```
Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 307
<211> 2514
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi phối tử dime ổ Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 307

caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 1980

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 2040

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 2100

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 2160

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 2220

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 2280

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 2340

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 2400

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 2460

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaa 2514

<210> 308
<211> 1932
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của phối tử monome khóa Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 308
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aa 1932

<210> 309
<211> 838
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi phối tử dime ổ Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 309

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu
645 650 655

Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg
660 665 670

Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp
675 680 685

Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu
690 695 700

Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
705 710 715 720

Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
725 730 735

Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln
740 745 750

Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp
755 760 765

Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
770 775 780

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
785 790 795 800

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
805 810 815

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825 830

Pro Ser Pro Arg Ser Glu
835

<210> 310
<211> 644
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phối tử monome khóa Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 310

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu

<210> 311
<211> 2478
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi phối tử (71-248) dime ổ Fc CD19(8B8-2B11) <400> 311
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagcagg cctgggaggc 1920

ggcggatctg gcggcggagg atctagagaa ggacccgagc tgtcccccga cgatcccgct 1980

gggctgctgg atctgagaca gggcatgttc gctcagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 2040

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 2100

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 2160

gtgtttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 2220

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gcagcagggg ctgcagcact ggccctgact 2280

gtggacctgc ccccagcttc ttccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 2340

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 2400

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 2460

gagatcccag ccgggctc 2478

<210> 312
<211> 1914
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của phối tử (71-248)monome khóa Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 312
caggtgcaat tggttcaatc tggtgctgaa gtaaaaaaac cgggcgcttc cgttaaagtg 60

agctgcaaag catctggtta caccttcact gactatatca tgcactgggt tcgtcaggcc 120

ccgggccagg gtctggagtg gatgggctac attaacccat acaacgacgg ttccaaatat 180

accgagaaat tccagggccg cgtcacgatg accagcgaca cttctatctc caccgcgtac 240

atggaactgt ctagactgcg ttctgacgac accgctgttt actattgtgc acgcggtacc 300

tactactacg gtccacagct gtttgattac tggggccaag gtaccacggt gaccgtaagc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccct gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg gctc 1914

<210> 313
<211> 826
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi phối tử (71-248) dime ổ Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 313

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly
625 630 635 640

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
645 650 655

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
660 665 670

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
675 680 685

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
690 695 700

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
705 710 715 720

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
725 730 735

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
740 745 750

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
755 760 765

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
770 775 780

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
785 790 795 800

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
805 810 815

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825

<210> 314
<211> 638
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> phối tử (71-248) monome khóa Fc CD19(8B8-2B11)

<400> 314

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
625 630 635

<210> 315
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223 > ADN(huIgG1 PGLALA)của chuỗi nặng CD19(8B8-018)

<400> 315
caggtccagc tggtgcagtc cggcgccgag gtcaagaaac ccggggcttc tgtgaaggtt 60

tcatgcaagg caagcggata caccttcacc gactatatca tgcattgggt caggcaggcc 120

cctggccaag gtctcgaatg gatgggctac attaacccat ataatgatgg ctccaaatac 180

accgagaagt ttcagggaag agtcactatg acatctgaca ccagtatcag cactgcttac 240

atggagctgt cccgccttcg gtctgatgac accgcagtgt attactgtgc caggggcaca 300

tattactacg gctcagctct gttcgactat tgggggcagg gaaccacagt aaccgtgagc 360

tccgcaagta ctaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agcagctggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggag cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtccccgggc aaa 1353

<210> 316
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> (huIgG1 PGLALA)của chuỗi nặng CD19(8B8-018)

<400> 316

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 317
<211> 140
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> kháng mu CEA T84.66 VH

<400> 317

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Glu
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val
65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 318
<211> 131
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> kháng mu CEA T84.66 VL

<400> 318

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser
35 40 45

Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Ile Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys
130

<210> 319
<211> 392
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự thụ thể khung của chuỗi nặng

<400> 319
taaggggctt cctagtccta aggctgagga agggatcctg gtttagttaa agaggatttt 60

attcacccct gtgtcctctc cacaggtgtc cagtcccagg tccagctggt gcaatctggg 120

gctgaggtga agaagcctgg gtcctcggtg aaggtctcct gcaaggcttc tggaggcacc 180

ttcagcagct atactatcag ctgggtgcga caggcccctg gacaagggct tgagtggatg 240

ggaaggatca tccctatcct tggtacagca aactacgcac agaagttcca gggcagagtc 300

acgattaccg cggacaaatc cacgagcaca gcctacatgg agctgagcag cctgagatct 360

gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgcgaga ga 392

<210> 320
<211> 797
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự thụ thể khung của chuỗi nhẹ

<400> 320
ctgcagctgg aagctcagct cccacccagc tgctttgcat gtccctccca gctgccctac 60

cttccagagc ccatatcaat gcctgtgtca gagccctggg gaggaactgc tcagttagga 120

cccagaggga accatggaag ccccagctca gcttctcttc ctcctgctac tctggctccc 180

aggtgagggg aacatgaggt ggttttgcac attagtgaaa actcttgcca cctctgctca 240

gcaagaaata taattaaaat tcaaagtata tcaacaattt tggctctact caaagacagt 300

tggtttgatc ttgattacat gagtgcattt ctgttttatt tccaatttca gataccaccg 360

gagaaattgt gttgacacag tctccagcca ccctgtcttt gtctccaggg gaaagagcca 420

ccctctcctg cagggccagt cagagtgtta gcagctactt agcctggtac caacagaaac 480

ctggccaggc tcccaggctc ctcatctatg atgcatccaa cagggccact ggcatcccag 540

ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc agcctagagc 600

ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc agcgtagcaa ctggcctccc acagtgattc 660

cacatgaaac aaaaacccca acaagaccat cagtgtttac tagattatta taccagctgc 720

ttcctttaca gacagctagt ggggtggcca ctcagtgtta gcatctcagc tctatttggc 780

cattttggag ttcaagt 797

<210> 321
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA (T84.66-LCHA) CDR-H1

<400> 321

Asp Thr Tyr Met His
1 5

<210> 322
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA(T84.66-LCHA) CDR-H2

<400> 322

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 323
<211> 12
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA(T84.66-LCHA) CDR-H3

<400> 323

Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr
1 5 10

<210> 324
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA(T84.66-LCHA) CDR-L1

<400> 324

Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His
1 5 10 15

<210> 325
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA(T84.66-LCHA) CDR-L2

<400> 325

Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 326
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA(T84.66-LCHA) CDR-L3

<400> 326

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 327
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH của tác nhân liên kết CEA gốc

<400> 327

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 328
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL của tác nhân liên kết CEA gốc

<400> 328

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Val
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ile Asp
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 329
<211> 242
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA(T84.66-LCHA) VH

<400> 329

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser
115 120 125

Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
130 135 140

Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Arg Gln
145 150 155 160

Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn
165 170 175

Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr
180 185 190

Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
195 200 205

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val
210 215 220

Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
225 230 235 240

Ser Ser

<210> 330
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CEA(T84.66-LCHA) VL

<400> 330

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 331
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi ổ Fc CEA(T84.66-LCHA)

<400> 331
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatgggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacactcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 332
<211> 654
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ CEA(T84.66-LCHA)

<400> 332
gagatcgtgc tgacccagag ccctgccacc ctgtcactgt ctccaggcga gagagccacc 60

ctgagctgta gagccggcga gagcgtggac atcttcggcg tgggatttct gcactggtat 120

cagcagaagc ccggccaggc ccccagactg ctgatctaca gagccagcaa ccgggccaca 180

ggcatccccg ccagattttc tggctctggc agcggcaccg acttcaccct gacaatcagc 240

agcctggaac ccgaggactt cgccgtgtac tactgccagc agaccaacga ggacccctac 300

acctttggcc agggcaccaa gctggaaatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360

atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 333
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc CEA (T84.66-LCHA)

<400> 333

```
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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
            20                  25                  30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220
```

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 334
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CEA (T84.66-LCHA)

<400> 334

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 335
<211> 2514
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi 4-1BBL(71-254) dime ổ Fc CEA(T84.66-LCHA)

<400> 335
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatgggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacactcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 1980

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 2040

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 2100

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 2160

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 2220

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 2280

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 2340

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 2400

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 2460

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaa 2514

<210> 336
<211> 1932
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của 41-BBL (71-254)monome của khóa Fc CEA(T84.66-LCHA)

<400> 336
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatgggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacactcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aa 1932

<210> 337
<211> 838
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi 41-BBL (71-254) dime ổ Fc CEA(T84.66-LCHA)

<400> 337

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu
645 650 655

Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg
660 665 670

Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp
675 680 685

Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu
690 695 700

Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
705 710 715 720

Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
725 730 735

Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln
740 745 750

Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp
755 760 765

Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
770 775 780

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
785 790 795 800

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
805 810 815

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825 830

Pro Ser Pro Arg Ser Glu
835

<210> 338
<211> 644
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi 4-1BBL (71-254)monome khóa Fc CEA(T84.66-LCHA)

<400> 338

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu

<210> 339
<211> 2478
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi 4-1BBL (71-248) dime ổ Fc CEA (T84.66-LCHA)

<400> 339
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatgggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacactcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagcagg cctgggaggc 1920

ggcggatctg gcggcggagg atctagagaa ggacccgagc tgtcccccga cgatcccgct 1980

gggctgctgg atctgagaca gggcatgttc gctcagctgg tggctcagaa tgtgctgctg 2040

attgacggac ctctgagctg gtactccgac ccagggctgg caggggtgtc cctgactggg 2100

ggactgtcct acaaagaaga tacaaaagaa ctggtggtgg ctaaagctgg ggtgtactat 2160

gtgttttttc agctggaact gaggcgggtg gtggctgggg agggctcagg atctgtgtcc 2220

ctggctctgc atctgcagcc actgcgctct gcagcagggg ctgcagcact ggccctgact 2280

gtggacctgc ccccagcttc ttccgaggcc agaaacagcg ccttcgggtt ccaaggacgc 2340

ctgctgcatc tgagcgccgg acagcgcctg ggagtgcatc tgcatactga agccagagcc 2400

cggcatgctt ggcagctgac tcaggggca actgtgctgg gactgtttcg cgtgacacct 2460

gagatcccag ccgggctc 2478

<210> 340
<211> 1914
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi(71-248) 4-1BBL Monome khóa Fc CEA (T84.66-LCHA)

<400> 340
caggtgcagc tggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cctggacagg gactggaatg gatgggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcag agtgaccatc accgccgaca ccagcacctc caccgcctac 240

atggaactga gcagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgtgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacactcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccccc 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccctgatgat cctgccggac tgctggacct gcggcaggga 1440

atgtttgccc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agatctgctg ctggcgccgc tgctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagcagc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttcctgccgg gctc 1914

<210> 341
<211> 826
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi 4-1BBL (71-248) CEA dime ổ Fc (T84.66-LCHA)
<400> 341

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

```
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400
```

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Gly Gly

625 630 635 640

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro
645 650 655

Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln
660 665 670

Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr
675 680 685

Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr
690 695 700

Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr
705 710 715 720

Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser
725 730 735

Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala
740 745 750

Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser
755 760 765

Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu
770 775 780

Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala
785 790 795 800

Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe
805 810 815

Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825

<210> 342
<211> 638
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi (71-248) 4-1BBL monome khóa Fc CEA (T84.66-LCHA) Fc hole dimeric

<400> 342

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr 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 Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
625 630 635

<210> 343
<211> 1353
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ADN của chuỗi ổ Fc CEA(T84.66)

<400> 343
gaggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgaa ctggtggaac ctggcgcctc tgtgaagctg 60

agctgtaccg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt caagcagcgg 120

cctgagcagg gcctggaatg gatcggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcaa ggccaccatc accgccgaca ccagcagcaa cacagcctac 240

ctgcagctga ccagcctgac ctccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacaagcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 344
<211> 654
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi nhẹ kháng CEA(T84.66)

<400> 344
gacatcgtgc tgacccagag ccctgcctct ctggccgtgt ctctgggaca gagggccacc 60

atgtcttgca gagccggcga gagcgtggac atcttcggcg tgggatttct gcactggtat 120

cagcagaagc ccggccagcc ccccaagctg ctgatctaca gagccagcaa cctggaaagc 180

ggcatccccg tgcggtttag cggcaccggc agcagaaccg acttcaccct gatcatcgac 240

cccgtggaag ccgacgacgt ggccacctac tactgccagc agaccaacga ggacccctac 300

acctttggcg gaggcaccaa gctggaaatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360

atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 345
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi ổ Fc CEA (T84.66)

<400> 345

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 346
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ CEA (T84.66)

<400> 346

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Met Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Val
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Thr Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Ile Ile Asp
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 347
<211> 2514
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi 4-1BBL (71-254) dime ổ Fc CEA(T84.66)

<400> 347
gaggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgaa ctggtggaac ctggcgcctc tgtgaagctg 60

agctgtaccg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt caagcagcgg 120

cctgagcagg gcctggaatg gatcggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcaa ggccaccatc accgccgaca ccagcagcaa cacagcctac 240

ctgcagctga ccagcctgac ctccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacaagcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480

tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagt 540

tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

cccaagagct gcgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aaggcggagg cggatctggc ggcggaggat ctagagaggg acccgaactg 1980

tcccctgacg atccagccgg gctgctggat ctgagacagg gaatgttcgc ccagctggtg 2040

gctcagaatg tgctgctgat tgacggacct ctgagctggt actccgaccc agggctggca 2100

ggggtgtccc tgactggggg actgtcctac aaagaagata caaaagaact ggtggtggct 2160

aaagctgggg tgtactatgt gtttttttcag ctggaactga ggcgggtggt ggctggggag 2220

ggctcaggat ctgtgtccct ggctctgcat ctgcagccac tgcgctctgc tgctggcgca 2280

gctgcactgg ctctgactgt ggacctgcca ccagcctcta gcgaggccag aaacagcgcc 2340

ttcgggttcc aaggacgcct gctgcatctg agcgccggac agcgcctggg agtgcatctg 2400

catactgaag ccagagcccg gcatgcttgg cagctgactc agggggcaac tgtgctggga 2460

ctgtttcgcg tgacacctga gatccctgcc ggactgccaa gccctagatc agaa 2514

<210> 348
<211> 1932
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN của chuỗi 4-1BBL (72-254)Monome khóa Fc CEA(T84.66)

<400> 348
gaggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgaa ctggtggaac ctggcgcctc tgtgaagctg 60

agctgtaccg ccagcggctt caacatcaag gacacctaca tgcactgggt caagcagcgg 120

cctgagcagg gcctggaatg gatcggcaga atcgaccccg ccaacggcaa cagcaaatac 180

gtgcccaagt tccagggcaa ggccaccatc accgccgaca ccagcagcaa cacagcctac 240

ctgcagctga ccagcctgac ctccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccccttcggc 300

tactacgtgt ccgactacgc catggcctat tggggccagg gcacaagcgt gaccgtgtcc 360

tctgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc ctgcagagat 1080

gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctggtca agggcttcta ccccagcgat 1140

atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cacccccct 1200

gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260

tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320

acccagaagt ccctgagcct gagccccggc ggaggcggcg gaagcggagg aggaggatcc 1380

agagagggcc ctgagctgag ccccgatgat cctgctggac tgctggacct gcggcagggc 1440

atgtttgctc agctggtggc ccagaacgtg ctgctgatcg atggcccccc gtcctggtac 1500

agcgatcctg gactggctgg cgtgtcactg acaggcggcc tgagctacaa agaggacacc 1560

aaagaactgg tggtggccaa ggccggcgtg tactacgtgt tctttcagct ggaactgcgg 1620

agagtggtgg ccggcgaagg atctggctct gtgtctctgg ccctgcatct gcagcctctg 1680

agaagcgctg ctggcgctgc agctctggca ctgacagtgg atctgcctcc tgccagctcc 1740

gaggcccgga atagcgcatt tgggtttcaa ggcaggctgc tgcacctgtc tgccggccag 1800

aggctgggag tgcatctgca cacagaggcc agggctagac acgcctggca gctgacacag 1860

ggcgctacag tgctgggcct gttcagagtg acccccgaga ttccagccgg cctgccttct 1920

ccaagaagcg aa 1932

<210> 349
<211> 838
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi 4-1BBL(71-254) dime ổ Fc CEA(T84.66)

<400> 349

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu
645 650 655

Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg
660 665 670

Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp
675 680 685

Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu

690 695 700

Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala
705 710 715 720

Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val
725 730 735

Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln
740 745 750

Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp
755 760 765

Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln
770 775 780

Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu
785 790 795 800

His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala
805 810 815

Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
820 825 830

Pro Ser Pro Arg Ser Glu
835

<210> 350
<211> 644
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi 4-1BBL (71-254) Monome khóa Fc CEA(T84.66)
<400> 350

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Glu Gly Pro
450 455 460

Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly
465 470 475 480

Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro
485 490 495

Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly
500 505 510

Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala
515 520 525

Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala
530 535 540

Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu
545 550 555 560

Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro
565 570 575

Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg
580 585 590

Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr
595 600 605

Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val
610 615 620

Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser
625 630 635 640

Pro Arg Ser Glu

<210> 351
<211> 1287
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ADN hu NA3B3A2-avi His

<400> 351
cagctgacca ccgagtccat gcccttcaac gtggccgagg gcaaagaggt gctgctgctg 60

gtccacaacc tgccccagca gctgttcggc tacagctggt acaagggcga gcgggtggac 120

ggcaaccggc agatcgtggg ctacgccatc ggcacccagc aggccacacc cggccctgcc 180

aatagcggca gagagacaat ctaccccaac gccagcctgc tgatccagaa cgtgacccag 240

aacgacaccg gcttctacac actccaagtc atcaagagcg acctggtcaa cgaggaagcc 300

accggccagt tccacgtgta ccccgagctg cccaagccca gcatcagcag caacaacagc 360

aagcccgtgg aagataagga cgccgtggcc tttacctgcg agcccgaggc ccagaacacc 420

acctacctgt ggtgggtcaa cggccagagc ctgcccgtgt cccccagact ccagctgagc 480

aacggcaaca gaaccctgac cctgttcaac gtgacccgga atgacgccag agcctacgtg 540

tgcggcatcc agaacagcgt gtccgccaac cgcagcgacc ccgtgaccct ggatgtgctg 600

tacggccccg acaccccat catcagcccc cctgacagca gctacctgag cggcgccaac 660

ctgaacctga gctgccacag cgccagcaac cccagccctc agtacagctg gcggatcaac 720

ggcatccccc agcagcacac ccaggtgctg tttatcgcca agatcacccc caacaacaac 780

ggcacctacg cctgcttcgt gtccaacctg gccaccggcc ggaacaacag catcgtgaag 840

tccatcaccg tgtccgcctc cctgagcccc gtggtggcca agcctcagat caaggccagc 900

aagaccaccg tgaccggcga caaggacagc gtgaacctga cctgctccac caacgatacc 960

ggcatcagca tccggtggtt cttcaagaat cagtccctgc ccagcagcga gcggatgaag 1020

ctgagccagg gcaacatcac cctgtccatc aaccccgtga aaagagagga cgccggcacc 1080

tattggtgcg aggtgttcaa ccccatcagc aagaaccaga gcgaccccat catgctgaac 1140

gtgaactaca acgccctgcc ccaagaaaac ctgatcaatg ttgatctgga agtgctgttc 1200

cagggcccag gcagcggcct gaacgacatc ttcgaagccc agaaaatcga gtggcacgag 1260

gccagagccc accaccacca tcaccac 1287

<210> 352
<211> 429
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu NA3B3A2-avi-His

<400> 352

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr

35 40 45

Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
50 55 60

Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85 90 95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110

Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115 120 125

Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Ala
165 170 175

Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser Ala Asn Arg Ser
180 185 190

Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp Thr Pro Ile Ile
195 200 205

Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser
210 215 220

Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn
225 230 235 240

Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile Ala Lys Ile Thr
245 250 255

Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr
260 265 270

Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val Ser Ala Ser Leu
275 280 285

Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr Val
290 295 300

Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp Thr
305 310 315 320

Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ser
325 330 335

Glu Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Ile Thr Leu Ser Ile Asn Pro
340 345 350

Val Lys Arg Glu Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn Pro
355 360 365

Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr Asn
370 375 380

Ala Leu Pro Gln Glu Asn Leu Ile Asn Val Asp Leu Glu Val Leu Phe
385 390 395 400

Gln Gly Pro Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile
405 410 415

Glu Trp His Glu Ala Arg Ala His His His His His His
420 425

<210> 353
<211> 1860
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu OX40L (51-183)dime - Chuỗi khóa Fc CL* ADN

<400> 353
caggtgtccc acagataccc cagaatccag agcatcaagg tgcagttcac cgagtacaag 60

aaagagaagg gcttcatcct gaccagccag aaagaggacg agatcatgaa ggtgcaggac 120

aacagcgtga tcatcaactg cgacggcttc tacctgatca gcctgaaggg ctacttcagc 180

caggaagtgg acatcagcct gcactaccag aaggacgagg aacccctgtt ccagctgaag 240

aaagtgcgga gcgtgaacag cctgatggtg gccagcctga cctacaagga caaggtgtac 300

ctgaacgtga ccaccgacaa caccagcctg gacgacttcc acgtgaacgg cggcgagctg 360

atcctgattc accagaaccc cggcgagttc tgcgtgctgg gaggcggagg atctggcgga 420

ggcggatctc aggtgtcaca ccgctacccc cggattcagt ccattaaggt gcagtttaca 480

gagtataaga aagaaaaagg ctttattctg acttcccaga aagaagatga gattatgaag 540

gtgcaggata attctgtgat catcaattgt gacggcttct acctgatcag cctgaagggc 600

tacttcagcc aggaagtgga catcagcctg cactaccaga aggacgagga acccctgttc 660

cagctgaaga aagtgcggag cgtgaacagc ctgatggtgg ccagcctgac ctacaaggac 720

aaggtgtacc tgaacgtgac caccgacaac accagcctgg acgacttcca cgtgaacggc 780

ggcgagctga tcctgatcca ccagaaccct ggcgagttct gcgtgctggg aggcggaggc 840

tccggagggg gaggatctcg tacggtggct gcaccatctg tctttatctt cccacccagc 900

gaccggaagc tgaagtctgg cacagccagc gtcgtgtgcc tgctgaataa cttctacccc 960

cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aatgccctgc agagcggcaa cagccaggaa 1020

agcgtgaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 1080

agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg 1140

tctagccccg tgaccaagag cttcaaccgg ggcgagtgcg acaagaccca cacctgtcct 1200

ccatgccctg cccctgaagc tgctggcggc cctagcgtgt tcctgttccc cccaaagccc 1260

aaggacaccc tgatgatcag ccggacccct gaagtgacct gcgtggtggt ggatgtgtcc 1320

cacgaggacc ctgaagtgaa gttcaattgg tacgtggacg gcgtggaagt gcacaatgcc 1380

aagaccaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1440

gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1500

ctcggcgccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1560

gtgtacaccc tgcccccatg ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgtggtgc 1620

ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1680

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1740

agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1800

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1860

<210> 354
<211> 738
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu OX40L (51-183) monome - CH1* ADN

<400> 354
caggtgtccc acagataccc cagaatccag agcatcaagg tgcagttcac cgagtacaag 60

aaagagaagg gcttcatcct gaccagccag aaagaggacg agatcatgaa ggtgcaggac 120

aacagcgtga tcatcaactg cgacggcttc tacctgatca gcctgaaggg ctacttcagc 180

caggaagtgg acatcagcct gcactaccag aaggacgagg aacccctgtt ccagctgaag 240

aaagtgcgga gcgtgaacag cctgatggtg gccagcctga cctacaagga caaggtgtac 300

ctgaacgtga ccaccgacaa caccagcctg gacgacttcc acgtgaacgg cggcgagctg 360

atcctgattc accagaaccc cggcgagttc tgcgtgctgg gaggcggagg ttccggaggc 420

ggaggatctg ctagcacaaa gggccccagc gtgttccctc tggcccctag cagcaagagc 480

acatctggcg gaacagccgc cctgggctgc ctggtggaag attacttccc cgagcccgtg 540

accgtgtcct ggaattctgg cgccctgaca agcggcgtgc acacctttcc agccgtgctg 600

cagagcagcg gcctgtactc tctgagcagc gtcgtgacag tgcccagcag ctctctgggc 660

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacgagaag 720

gtggaaccca agtcctgc 738

<210> 355
<211> 620
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu OX40L (51-183) dime - Chuỗi khóa Fc CL*

<400> 355

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
20 25 30

Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asp Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asp
50 55 60

Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
115 120 125

Glu Phe Cys Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
145 150 155 160

Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp
165 170 175

Glu Ile Met Lys Val Gln Asp Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly
180 185 190

Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asp Ile
195 200 205

Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys
210 215 220

Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp
225 230 235 240

Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe
245 250 255

His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu
260 265 270

Phe Cys Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Thr
275 280 285

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu
290 295 300

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
305 310 315 320

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
325 330 335

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
340 345 350

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
355 360 365

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
370 375 380

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
385 390 395 400

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
405 410 415

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
420 425 430

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
435 440 445

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
450 455 460

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
465 470 475 480

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
485 490 495

Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

500 505 510

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
515 520 525

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
530 535 540

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
545 550 555 560

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
565 570 575

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
580 585 590

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
595 600 605

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
610 615 620

<210> 356
<211> 246
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu OX40L (51-183) monome - CH1*

<400> 356

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
20 25 30

Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asp Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asp
50 55 60

Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
115 120 125

Glu Phe Cys Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
145 150 155 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe
165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
210 215 220

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys
225 230 235 240

Val Glu Pro Lys Ser Cys
245

<210> 357
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B11) VH

<400> 357

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 358
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B11) VL

<400> 358

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Thr Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
85 90 95

Leu Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 359
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-7H07) VH

<400> 359

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 360

<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-7H07) VL

<400> 360

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala
85 90 95

Thr His Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 361
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B03) VH

<400> 361

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Thr His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Asp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 362
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-2B03) VL

<220>
<221> dấu hiệu đa dạng
<222> (107)..(107)
<223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ

<400> 362

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Xaa Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 363
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5A07) VH

<400> 363

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 364
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CD19 (8B8-5A07) VL

<400> 364

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Pro
85 90 95

Gly His Tyr Pro Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 365
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5D08) VH

<400> 365

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 366
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5D08) VL

<400> 366

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
85 90 95

Thr His Glu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 367
<211> 121

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5B08) VH

<400> 367

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Pro Gln Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 368
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5B08) VL

<400> 368

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Thr Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
85 90 95

Asp Ser Tyr Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 369
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5H09) VH

<400> 369

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 370
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD19 (8B8-5H09) VL

<400> 370

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Ser Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Leu
85 90 95

Ile Asp Tyr Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 371
<211> 276
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> huOX40L (51-183) dime được nối bởi tác nhân liên kết (G4S)2

<400> 371

Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe
1 5 10 15

Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu
20 25 30

Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp
35 40 45

Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn
50 55 60

Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys
65 70 75 80

Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys
85 90 95

Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp
100 105 110

Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly
115 120 125

Glu Phe Cys Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
130 135 140

Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
145 150 155 160

Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp
165 170 175

Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly
180 185 190

Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile
195 200 205

Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys
210 215 220

Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp
225 230 235 240

Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe
245 250 255

His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu
260 265 270

Phe Cys Val Leu
275

<210> 372
<211> 274
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> huOX40L (52-183) dime được nối bởi tác nhân liên kết (G4S)2

<400> 372

Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr
1 5 10 15

Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp
20 25 30

Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly
35 40 45

Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile
50 55 60

Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys
65 70 75 80

Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp
85 90 95

Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe
100 105 110

His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu
115 120 125

Phe Cys Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Ser
130 135 140

His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr
145 150 155 160

Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile
165 170 175

Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr
180 185 190

Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu
195 200 205

His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg
210 215 220

Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val
225 230 235 240

Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val
245 250 255

Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys
260 265 270

Val Leu

<210> 373
<211> 164
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (85-248)

<400> 373

Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val
1 5 10 15

Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala
20 25 30

Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu
35 40 45

Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu
50 55 60

Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala
65 70 75 80

Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala
85 90 95

Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala
100 105 110

Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu
115 120 125

Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu
130 135 140

Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile
145 150 155 160

Pro Ala Gly Leu

<210> 374
<211> 169
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (80-248)

<400> 374

Asp Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu
1 5 10 15

Val Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser
20 25 30

Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val

50 55 60

Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly
65 70 75 80

Ser Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser
115 120 125

Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg
130 135 140

His Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg
145 150 155 160

Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu
165

<210> 375
<211> 197
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hu 4-1BBL (52-248)

<400> 375

Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp Pro Ala Gly
20 25 30

Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn
35 40 45

Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu
50 55 60

Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys
65 70 75 80

Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu
85 90 95

Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu
100 105 110

Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu
115 120 125

Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser
130 135 140

Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg
145 150 155 160

Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln
165 170 175

Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu
180 185 190

Ile Pro Ala Gly Leu
195

Fig. 1

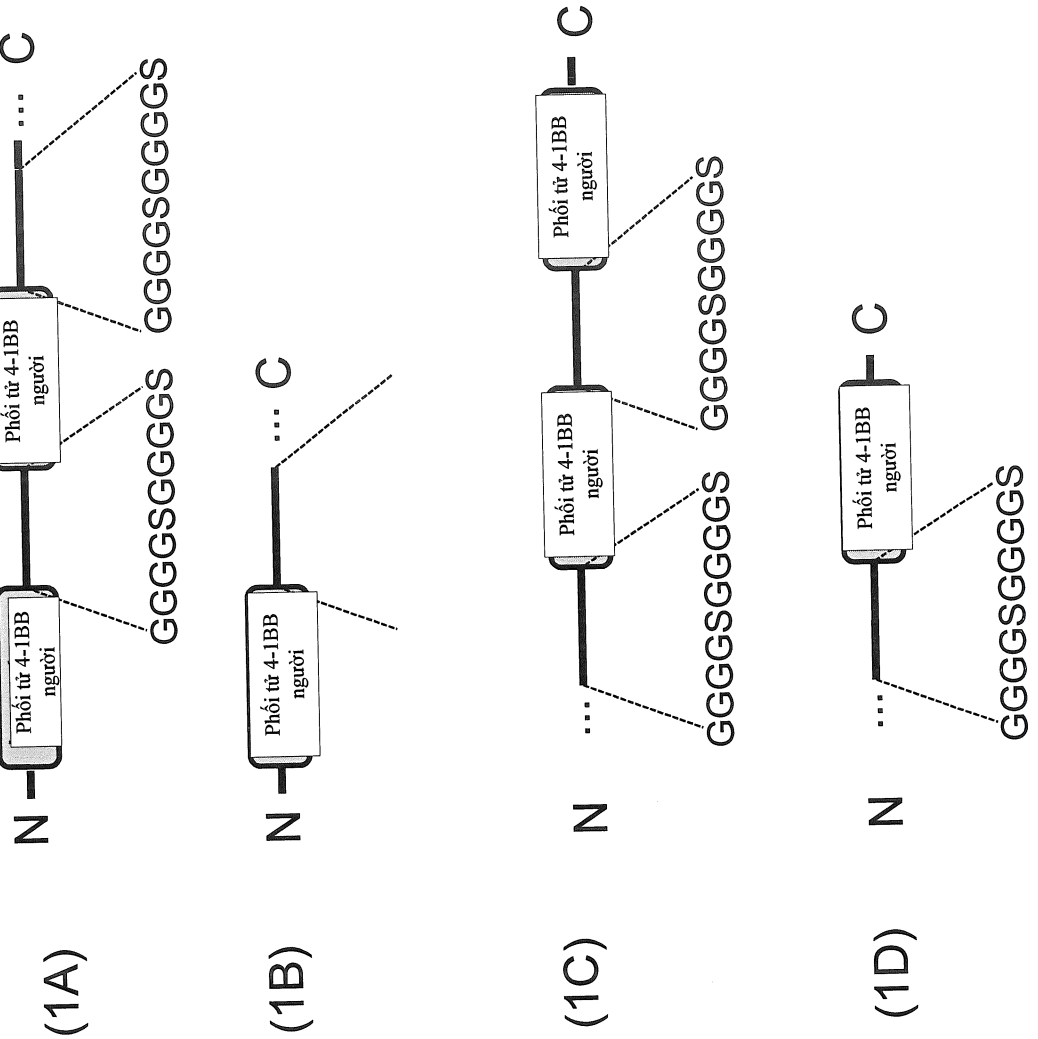
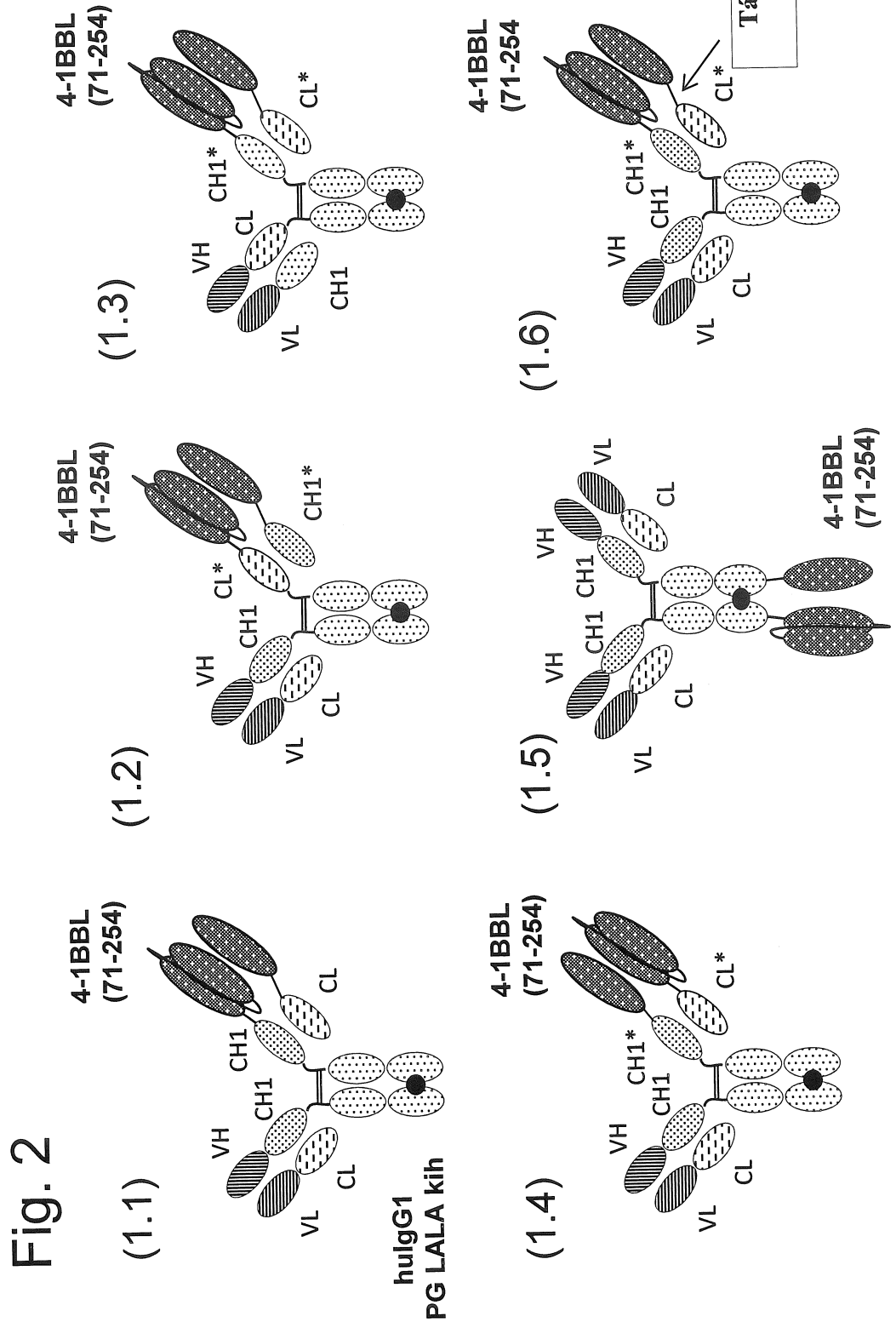

(1A)
N
Phối tử 4-1BB người
GGGGSGGGGS
Phối tử 4-1BB người
GGGGSGGGGS
... C
(1B)
N
Phối tử 4-1BB người
... C
(1C)
N
...
Phối tử 4-1BB người
GGGGSGGGGS
Phối tử 4-1BB người
GGGGSGGGGS
... C
(1D)
N
...
Phối tử 4-1BB người
GGGGSGGGGS
... C

Fig. 2


(1.1)
4-1BBL (71-254)
VH
CH1
CH1
CL
VL
CL
hulgG1 PG LALA kih
(1.2)
4-1BBL (71-254)
VH
CH1
CL*
CH1*
VL
CL
(1.3)
4-1BBL (71-254)
VH
CH1*
CL
CL*
VL
CH1
(1.4)
4-1BBL (71-254)
VH
CH1*
CH1
CL*
VL
CL
(1.5)
VH
VL
CL
CH1
VH
CH1
CL
VL
4-1BBL (71-254)
(1.6)
4-1BBL (71-254
Tác nhân liên kết (G4S)1
CL*
VH
CH1*
CH1
CL
VL

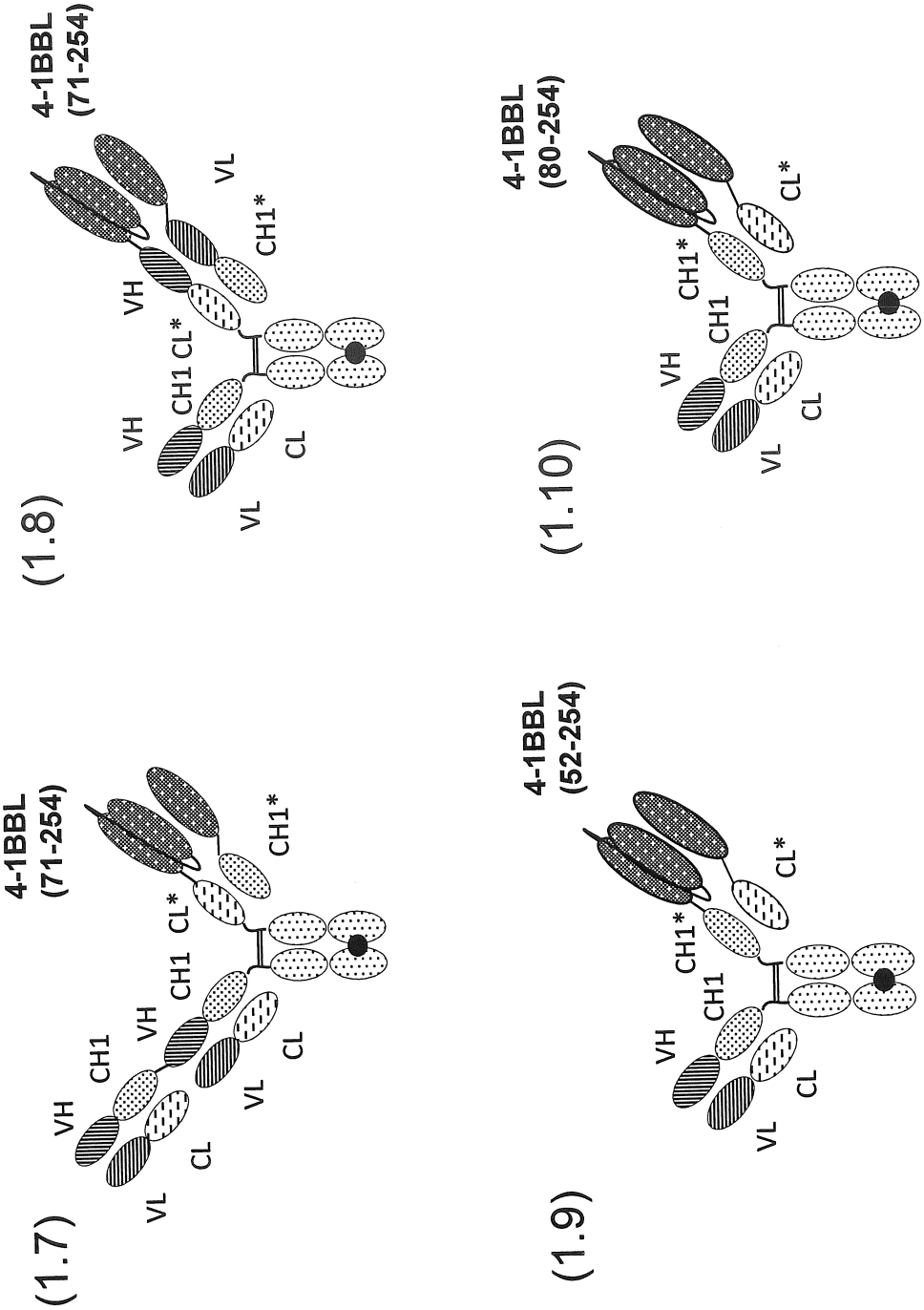

4-1BBL
(71-254)
VL
CH1*
VH
CH1
CL*
VH
CL
VL
(1.8)
4-1BBL
(80-254)
CL*
CH1*
CH1
VH
CL
VL
(1.10)
4-1BBL
(71-254)
CH1*
CL*
CH1
VH
CH1
CL
VL
VH
CL
VL
(1.7)
4-1BBL
(52-254)
CL*
CH1*
CH1
VH
CL
VL
(1.9)

Fig. 2

Fig. 3

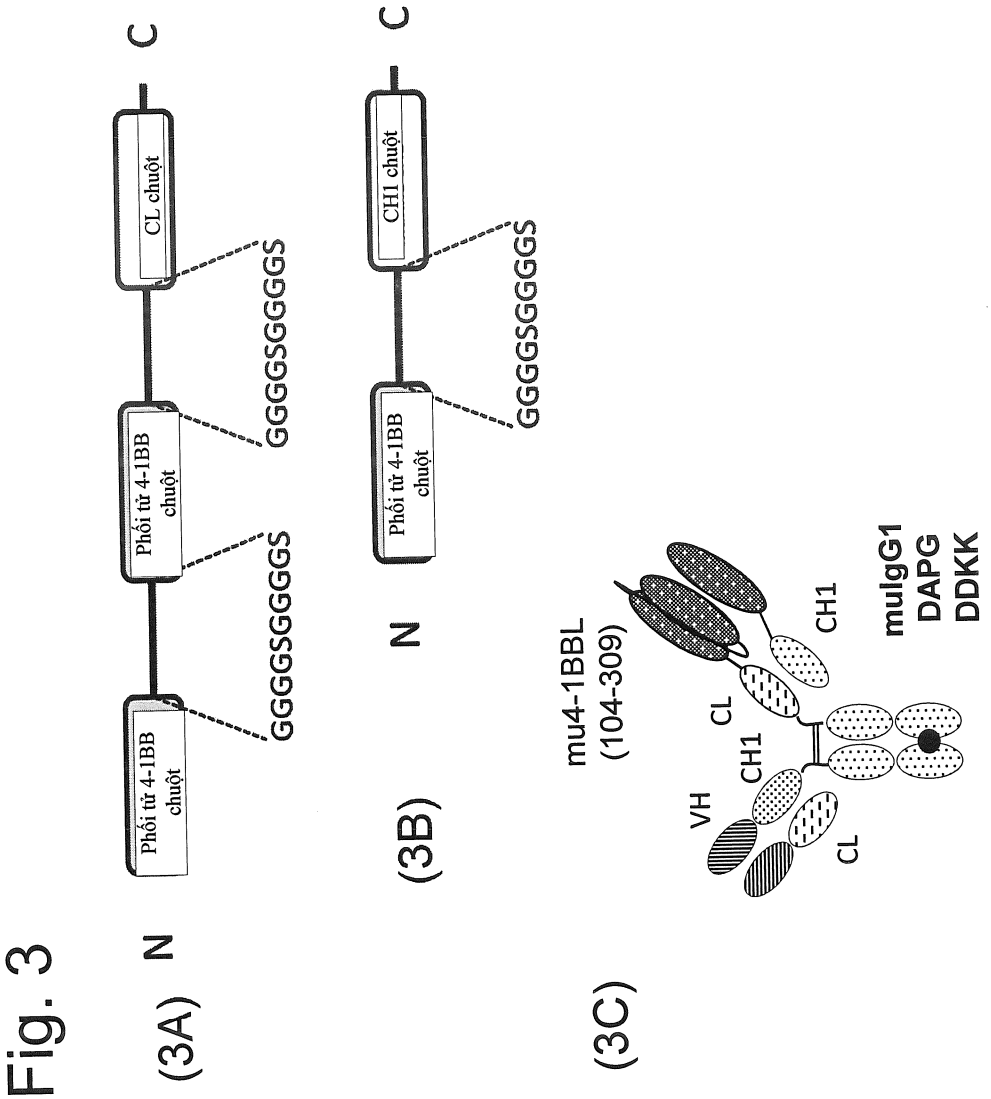
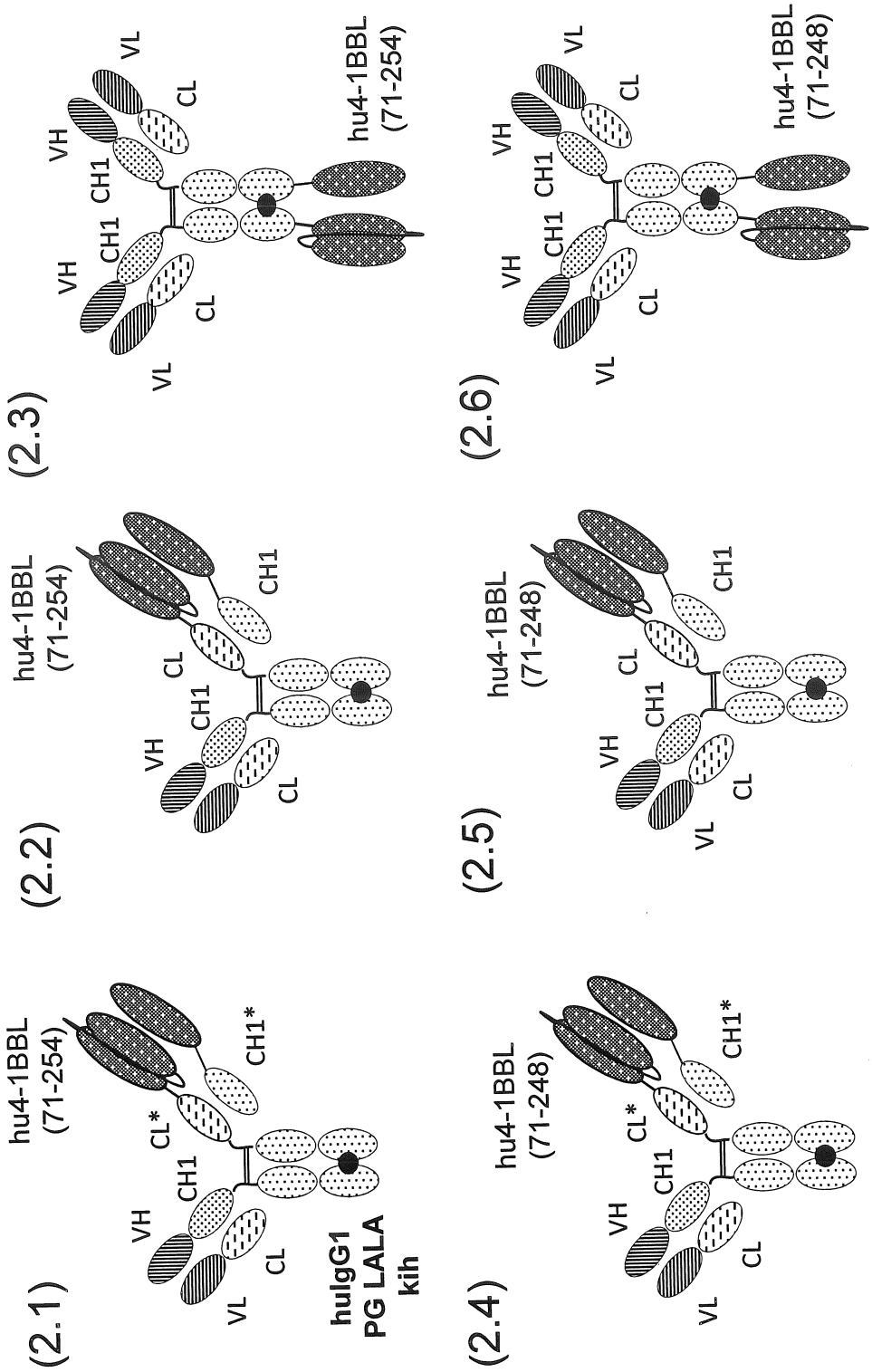

(3A)
N
Phối tử 4-1BB chuột
GGGGSGGGGS
Phối tử 4-1BB chuột
GGGGSGGGGS
CL chuột
C
(3B)
N
Phối tử 4-1BB chuột
GGGGSGGGGS
CH1 chuột
C
(3C)
mu4-1BBL (104-309)
VH
CH1
CL
CL
CH1
muIgG1
DAPG
DDKK

Fig. 4


(2.1)
hu4-1BBL
(71-254)
CL*
CH1*
VH
CH1
VL
CL
huIgG1
PG LALA
kih
(2.2)
hu4-1BBL
(71-254)
CH1
CL
VH
CH1
CL
(2.3)
VL
CL
VH
CH1
CH1
VH
CL
VL
hu4-1BBL
(71-254)
(2.4)
hu4-1BBL
(71-248)
CL*
CH1*
VH
CH1
VL
CL
(2.5)
hu4-1BBL
(71-248)
CH1
CL
VH
CH1
VL
CL
(2.6)
VL
CL
VH
CH1
CH1
VH
CL
VL
hu4-1BBL
(71-248)

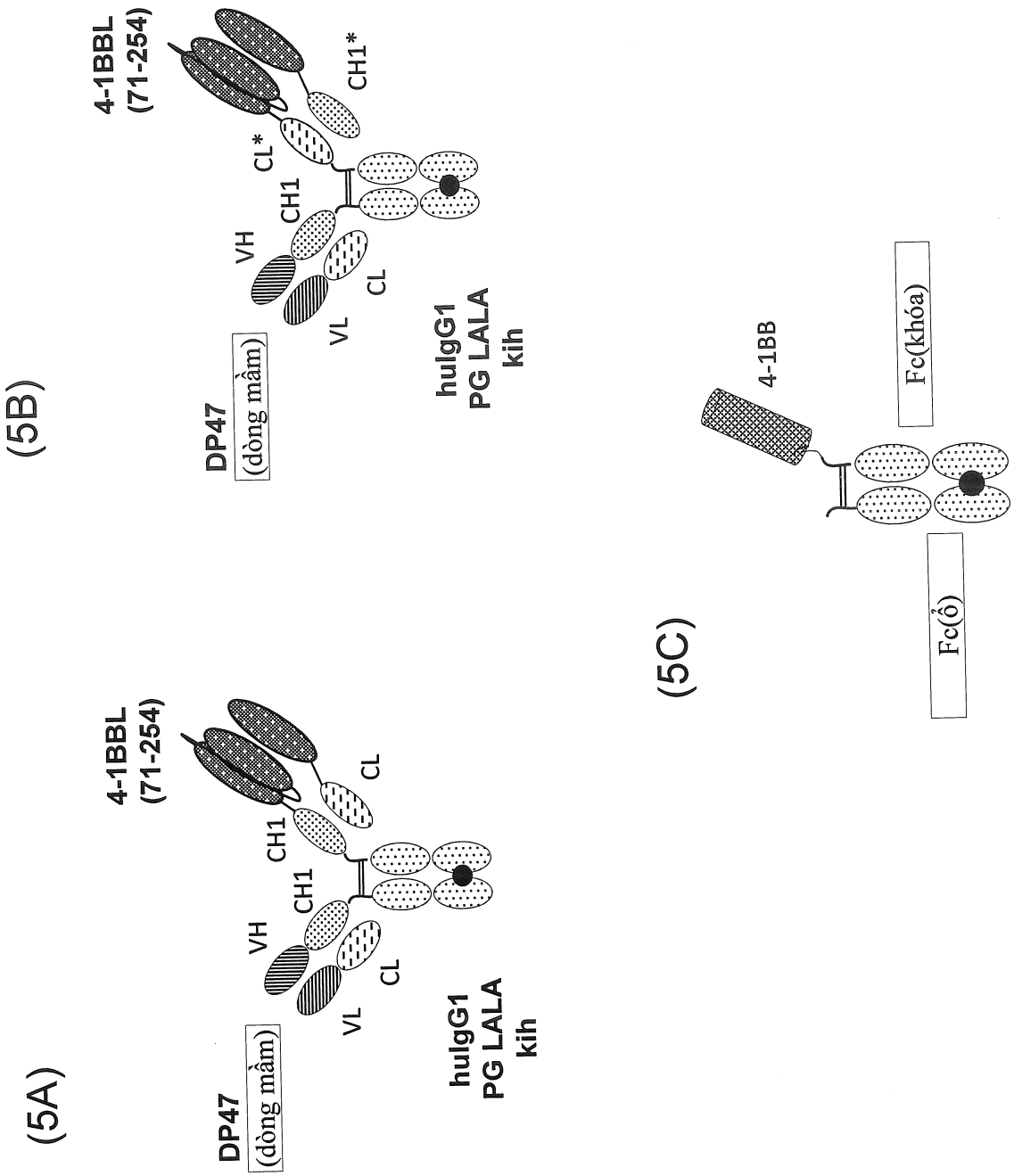

(5A)
4-1BBL
(71-254)
CH1
CL
VH
CH1
CL
VL
DP47
(dòng mầm)
hulgG1
PG LALA
kih
(5B)
4-1BBL
(71-254)
CH1*
CL*
CH1
VH
CL
VL
DP47
(dòng mầm)
hulgG1
PG LALA
kih
(5C)
4-1BB
Fc(khóa)
Fc(ổ)

Fig. 5

Fig. 6

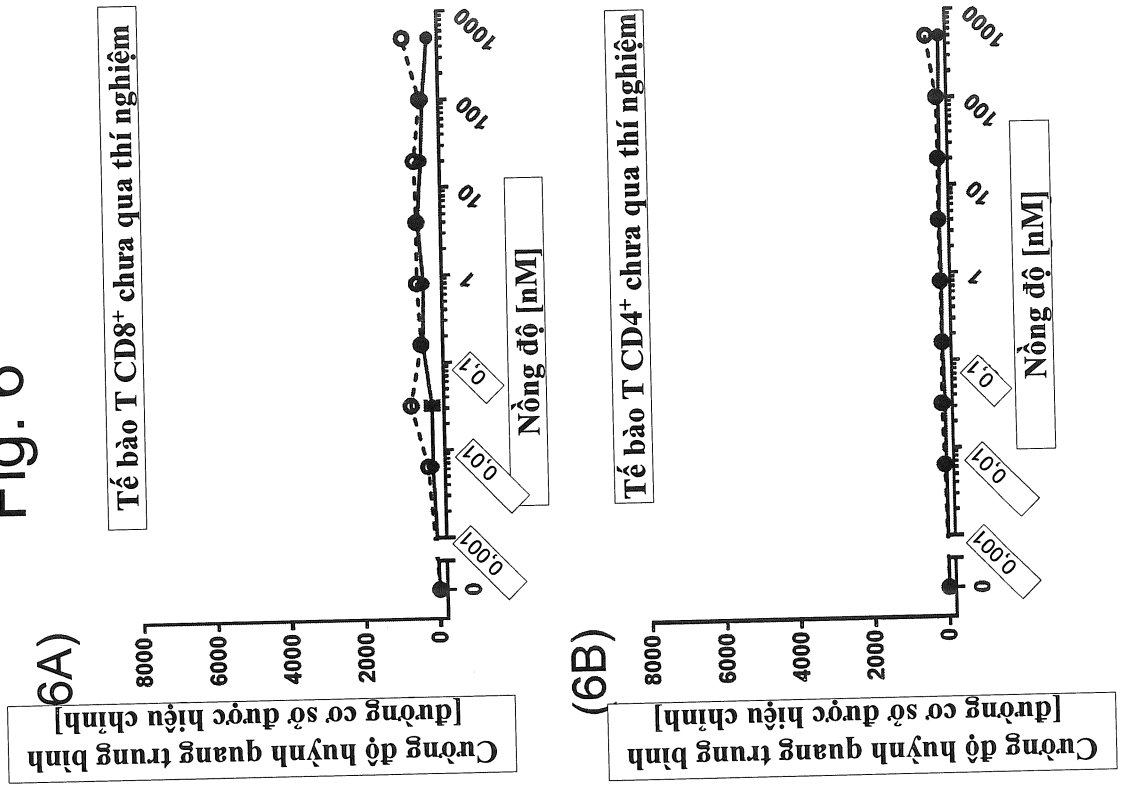

6A)
Tế bào T CD8+ chưa qua thí nghiệm
Tế bào T CD8+ được hoạt hóa
Cường độ huỳnh quang trung bình [đường cơ sở được hiệu chỉnh]
Nồng độ [nM]
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
2000
4000
6000
8000
6B)
Tế bào T CD4+ chưa qua thí nghiệm
Tế bào T CD4+ được hoạt hóa
Cường độ huỳnh quang trung bình [đường cơ sở được hiệu chỉnh]
Nồng độ [nM]
100
200
300
400
500

Fig. 6

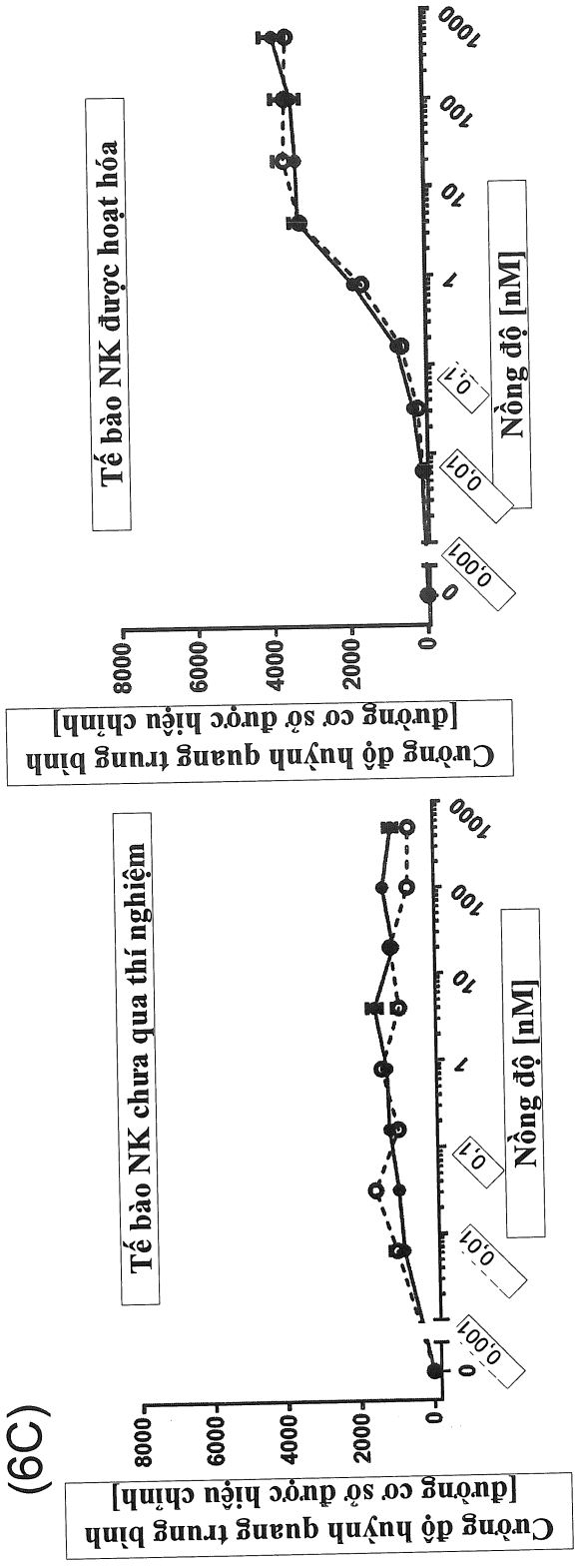

(6C)
Cường độ huỳnh quang trung bình
[đường cơ sở được hiệu chỉnh]
8000
6000
4000
2000
0
Tế bào NK chưa qua thí nghiệm
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]
Cường độ huỳnh quang trung bình
[đường cơ sở được hiệu chỉnh]
8000
6000
4000
2000
0
Tế bào NK được hoạt hóa
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]

Fig. 7A

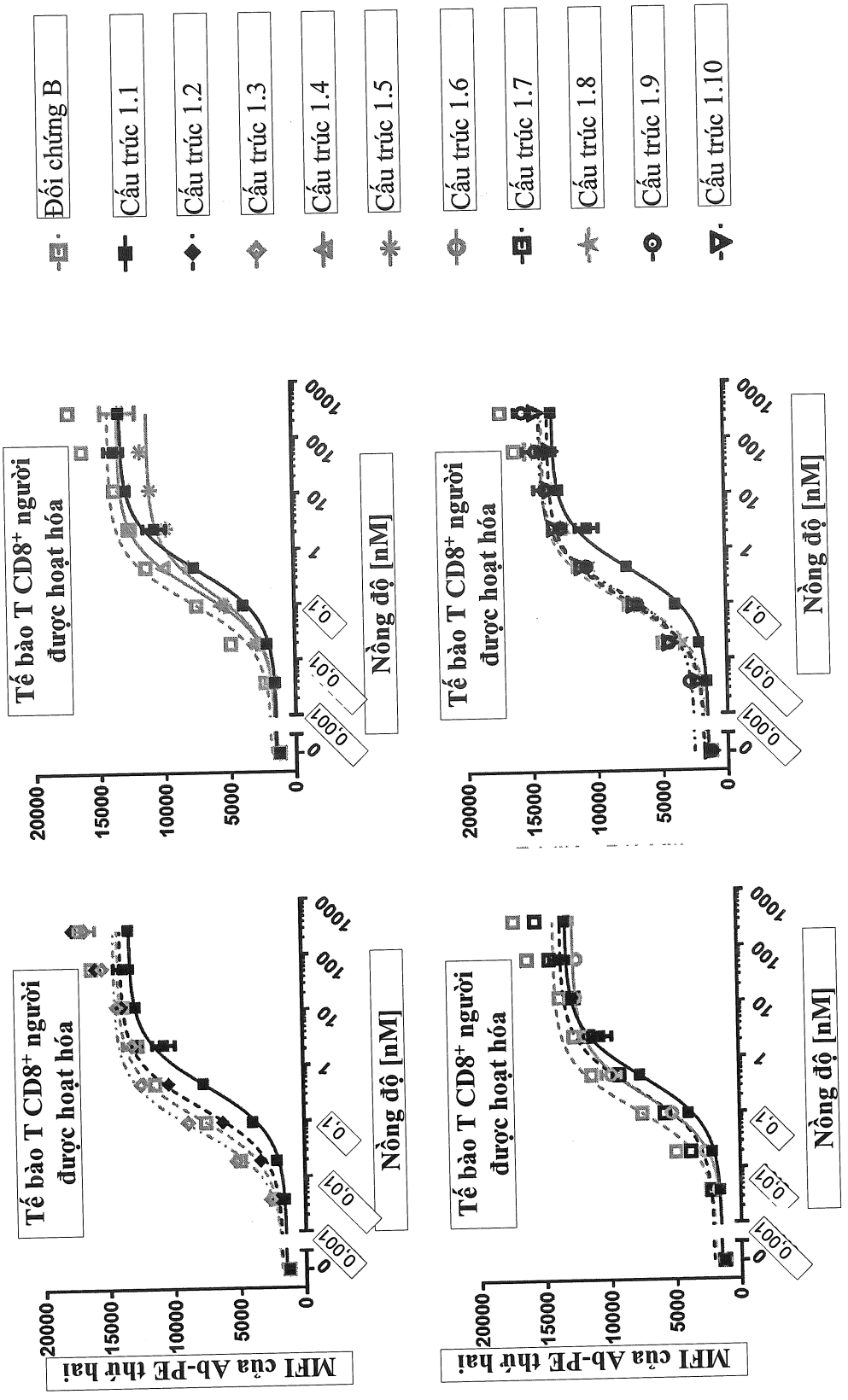
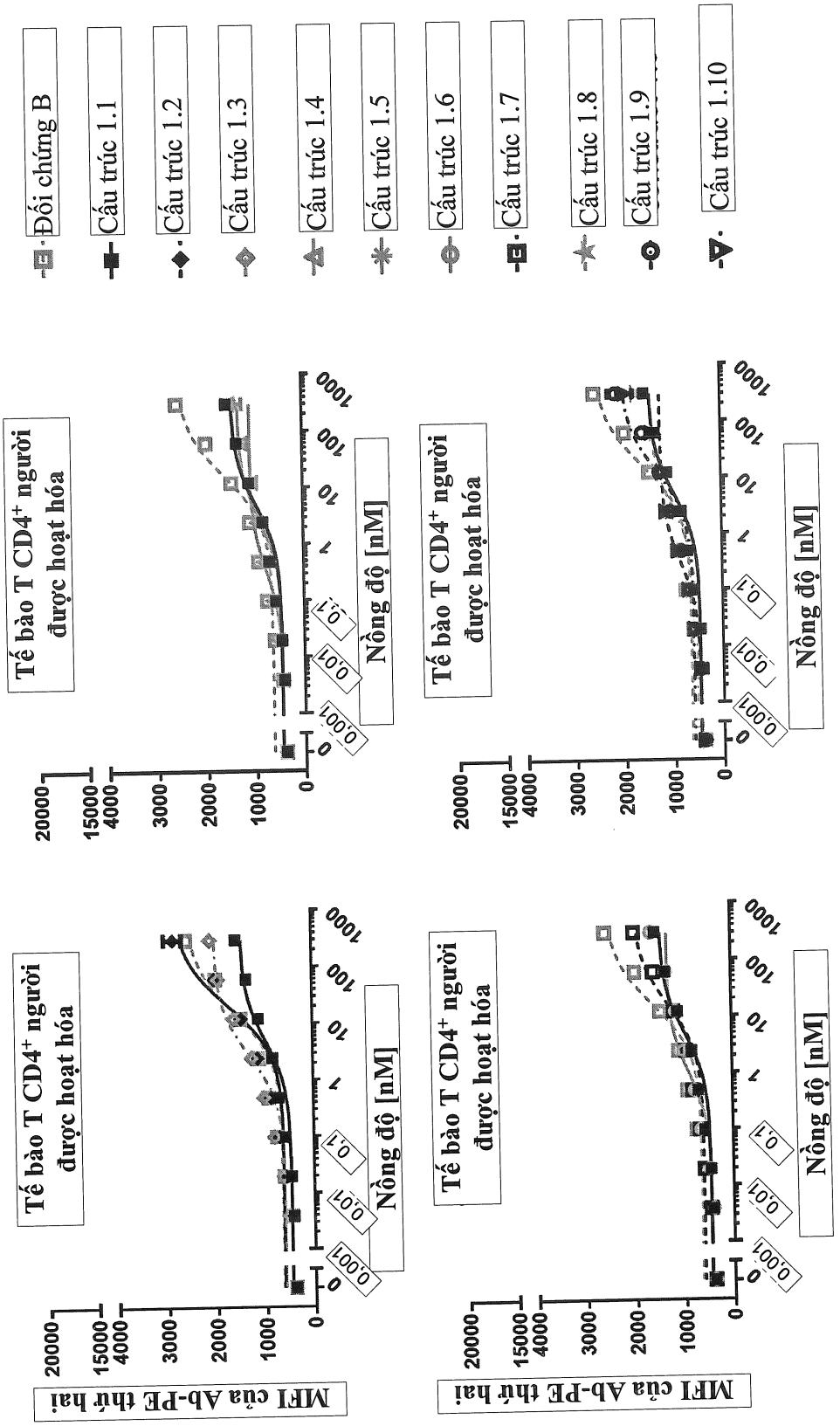

Đối chứng B
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.2
Cấu trúc 1.3
Cấu trúc 1.4
Cấu trúc 1.5
Cấu trúc 1.6
Cấu trúc 1.7
Cấu trúc 1.8
Cấu trúc 1.9
Cấu trúc 1.10
Tế bào T CD8+ người được hoạt hóa
MFI của Ab-PE thứ hai
Nồng độ [nM]
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
5000
10000
15000
20000

Fig. 7B


Đối chứng B
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.2
Cấu trúc 1.3
Cấu trúc 1.4
Cấu trúc 1.5
Cấu trúc 1.6
Cấu trúc 1.7
Cấu trúc 1.8
Cấu trúc 1.9
Cấu trúc 1.10
Tế bào T CD4+ người được hoạt hóa
MFI của Ab-PE thứ hai
Nồng độ [nM]
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
1000
2000
3000
4000
15000
20000

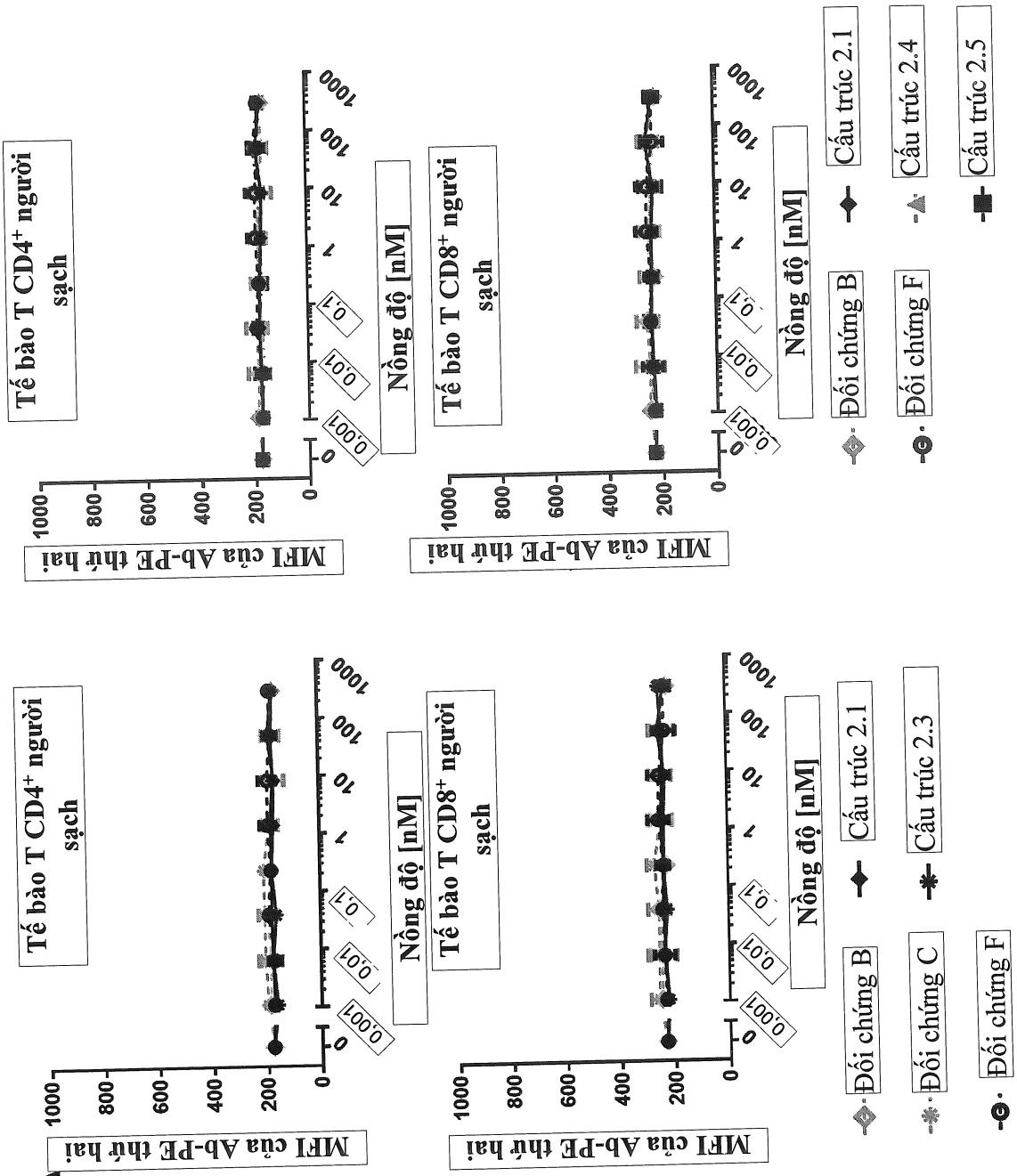

Tế bào T CD4+ người sạch
MFI của Ab-PE thứ hai
Nồng độ [nM]
Tế bào T CD8+ người sạch
Đối chứng B
Cấu trúc 2.1
Đối chứng C
Cấu trúc 2.3
Đối chứng F
Tế bào T CD4+ người sạch
MFI của Ab-PE thứ hai
Nồng độ [nM]
Tế bào T CD8+ người sạch
Đối chứng B
Cấu trúc 2.1
Cấu trúc 2.4
Đối chứng F
Cấu trúc 2.5

Fig. 8A

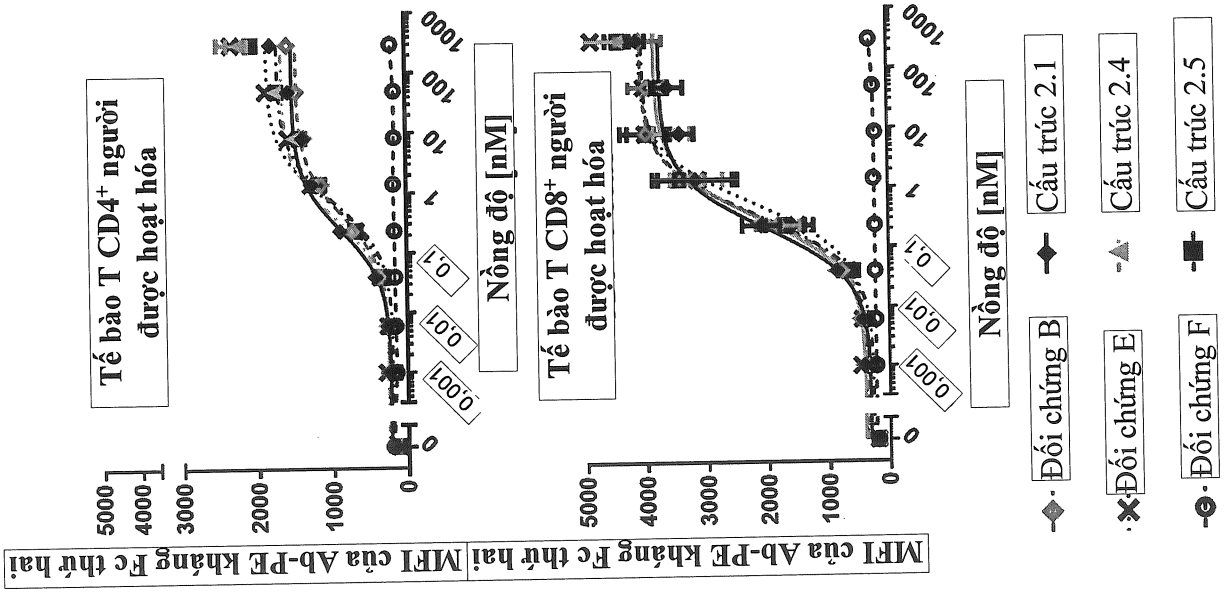

Tế bào T CD4+ người được hoạt hóa
Tế bào T CD8+ người được hoạt hóa
MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
Nồng độ [nM]
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
1000
2000
3000
4000
5000
Đối chứng B
Cấu trúc 2.1
Đối chứng E
Cấu trúc 2.4
Đối chứng F
Cấu trúc 2.5

Fig. 8B

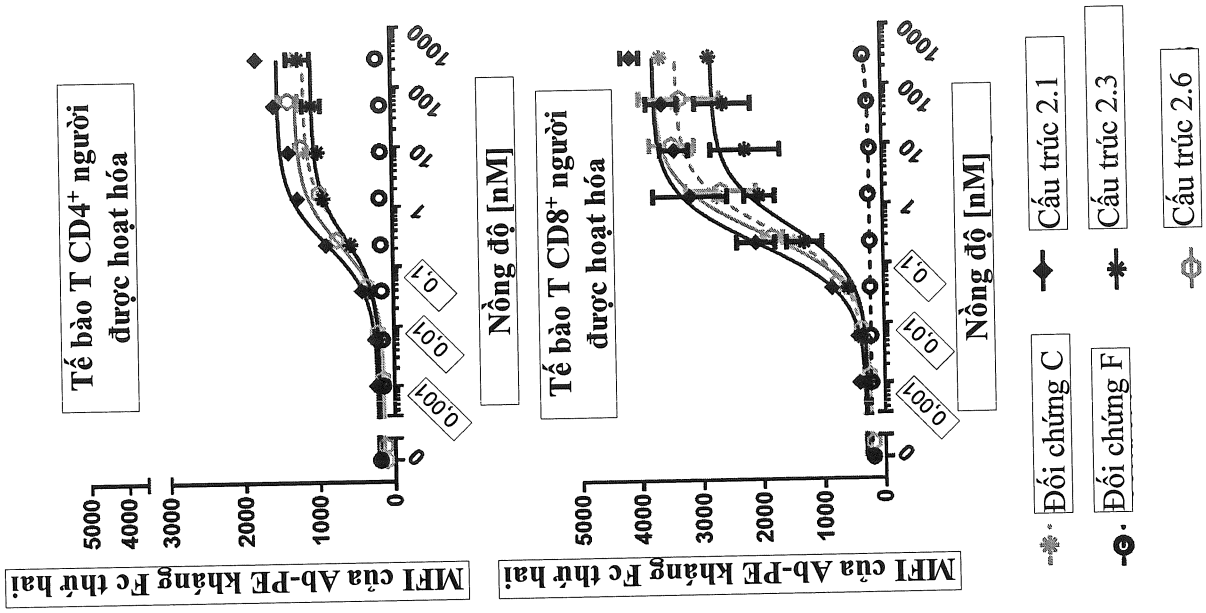

Tế bào T CD4+ người được hoạt hóa
Tế bào T CD8+ người được hoạt hóa
MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
Nồng độ [nM]
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
1000
2000
3000
4000
5000
Đối chứng C
Cấu trúc 2.1
Đối chứng F
Cấu trúc 2.3
Cấu trúc 2.6

Fig. 9

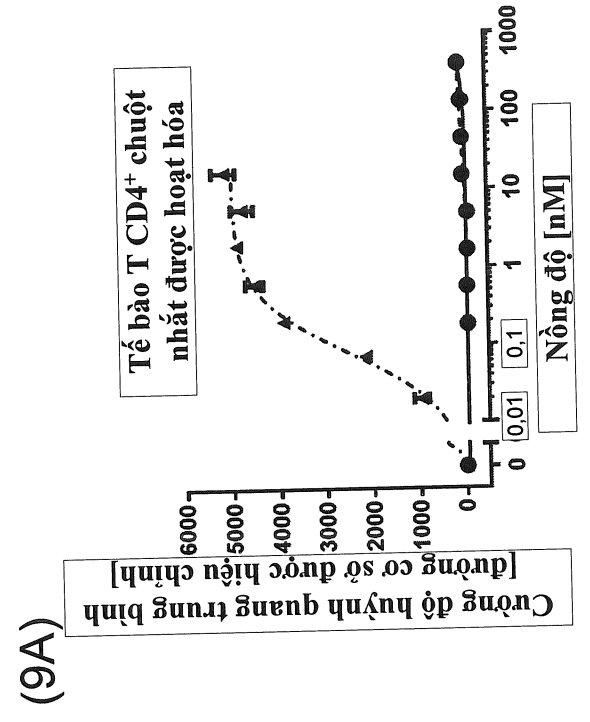
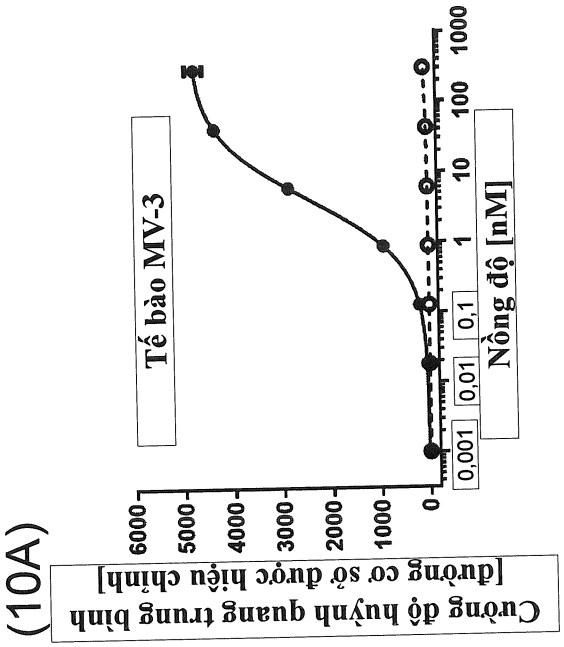

(9A)
Cường độ huỳnh quang trung bình
[đường cơ sở được hiệu chỉnh]
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Tế bào T CD4+ chuột
nhắt được hoạt hóa
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]
(9B)
Cường độ huỳnh quang trung bình
[đường cơ sở được hiệu chỉnh]
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
Tế bào T CD8+ chuột
nhắt được hoạt hóa
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]

Fig. 10


(10A)
Cường độ huỳnh quang trung bình
[đường cơ sở được hiệu chỉnh]
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Tế bào MV-3
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]

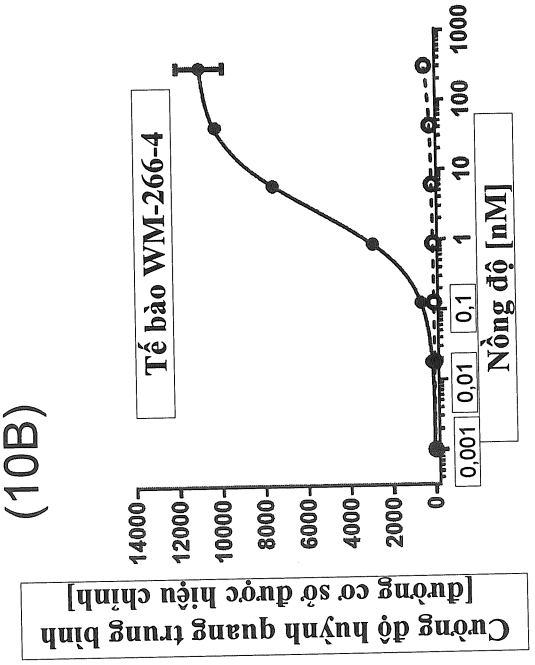

(10B)
Cường độ huỳnh quang trung bình
[đường cơ sở được hiệu chỉnh]
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Tế bào WM-266-4
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]

Fig. 11A

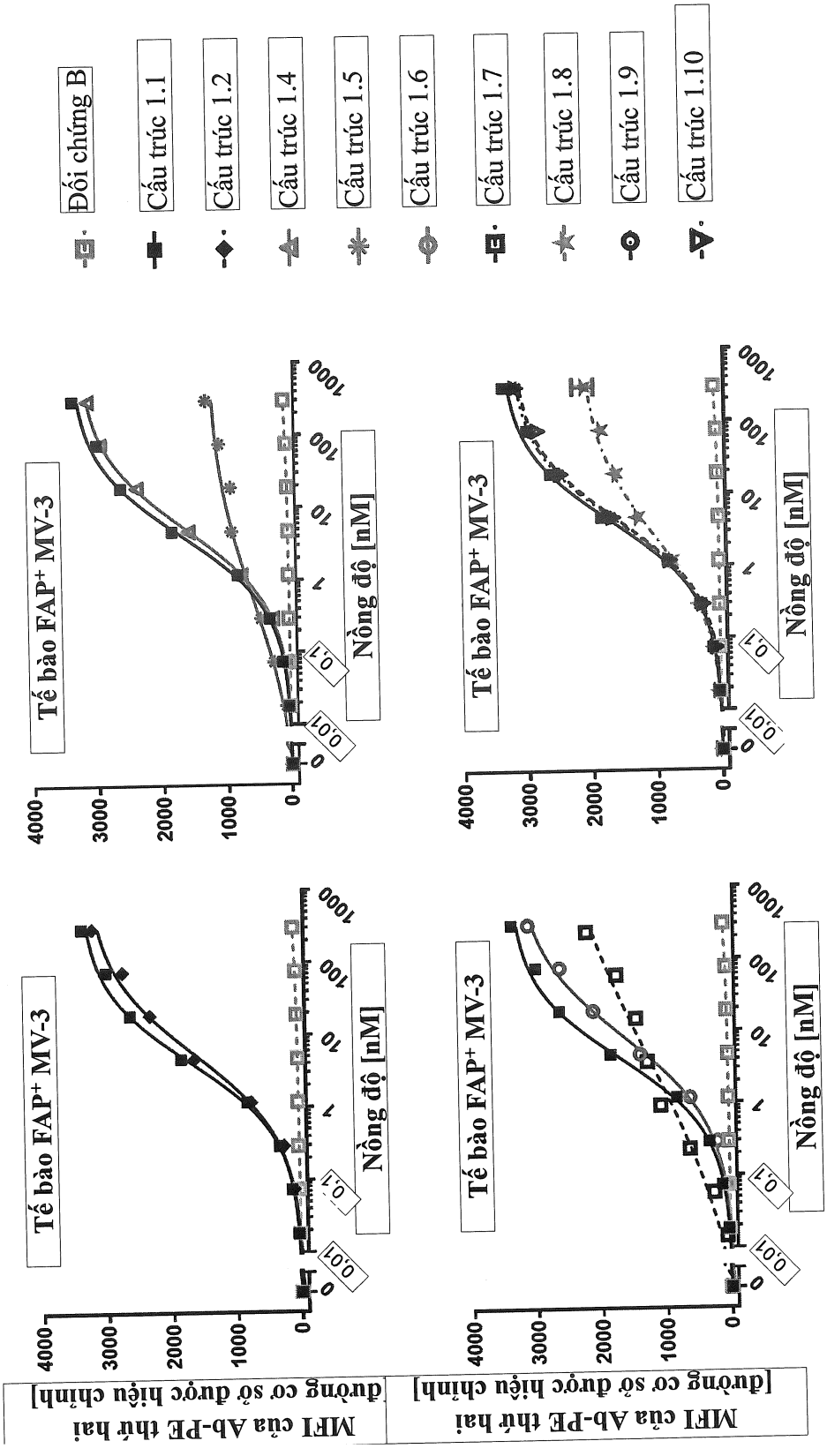

Đối chứng B
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.2
Cấu trúc 1.4
Cấu trúc 1.5
Cấu trúc 1.6
Cấu trúc 1.7
Cấu trúc 1.8
Cấu trúc 1.9
Cấu trúc 1.10
MFI của Ab-PE thứ hai [dương cơ sở được hiệu chỉnh]
Tế bào FAP+ MV-3
Nồng độ [nM]
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
1000
2000
3000
4000

Fig. 11B

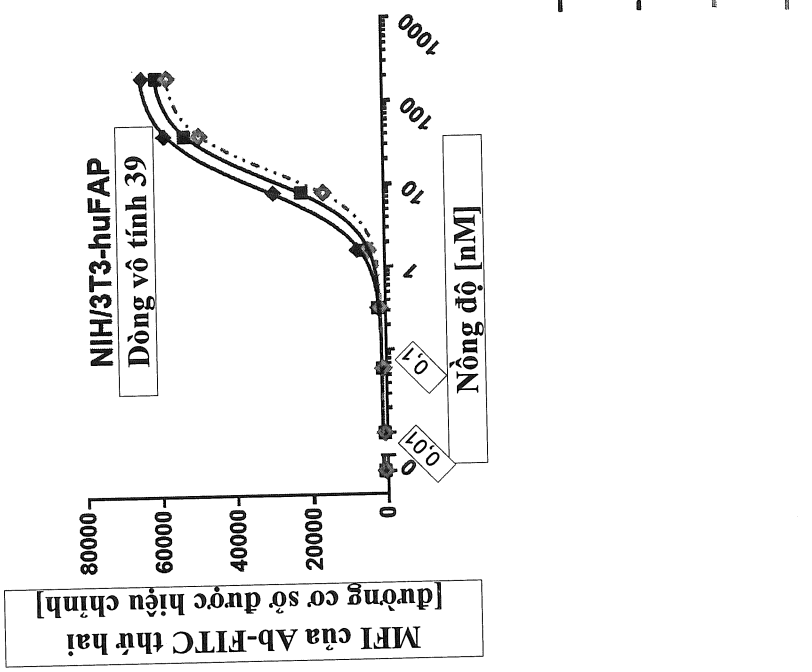
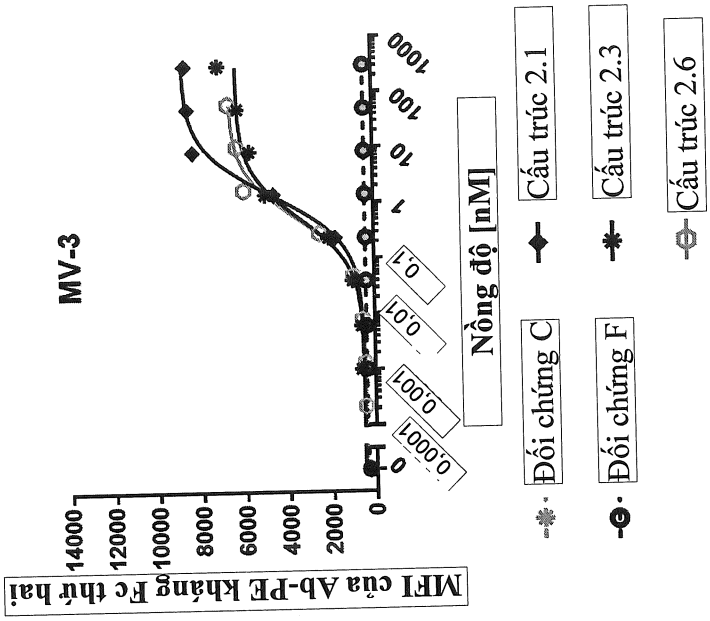

MFI của Ab-FITC thứ hai
[đương cơ sở được hiệu chỉnh]
80000
60000
40000
20000
0
NIH/3T3-huFAP
Dòng vô tính 39
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.2
Cấu trúc 1.3
Cấu trúc 1.5

Fig. 12A


MV-3
MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]
Đối chứng C
Cấu trúc 2.1
Đối chứng F
Cấu trúc 2.3
Cấu trúc 2.6

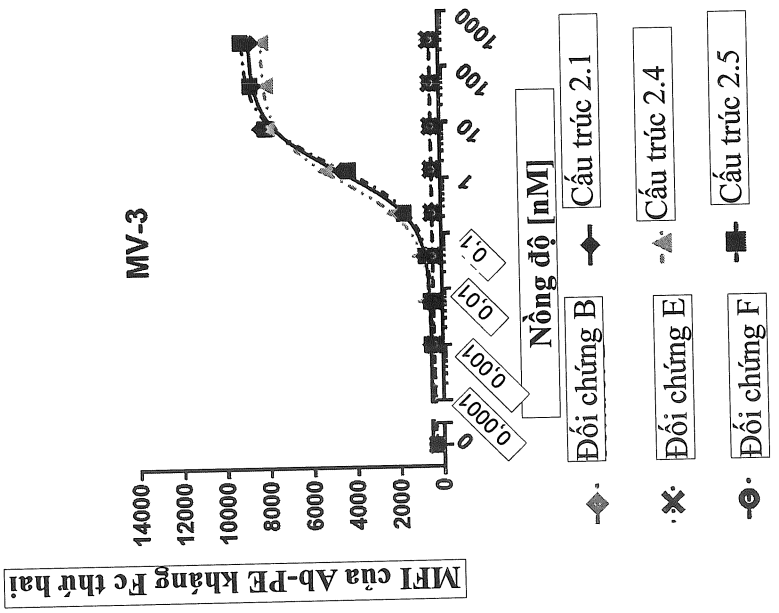

MV-3
MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]
Đối chứng B
Cấu trúc 2.1
Đối chứng E
Cấu trúc 2.4
Đối chứng F
Cấu trúc 2.5

Fig. 12B

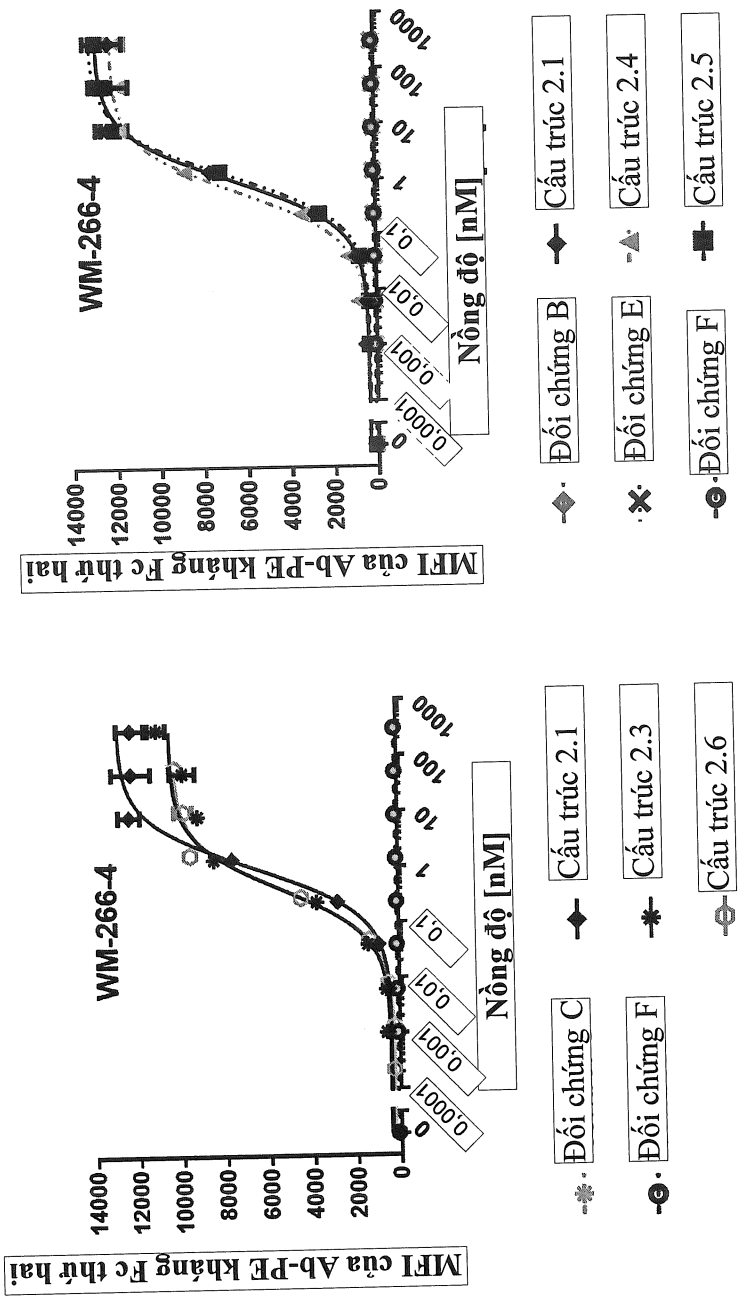

WM-266-4
MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
Nồng độ [nM]
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
Đối chứng B
Cấu trúc 2.1
Đối chứng E
Cấu trúc 2.4
Đối chứng F
Cấu trúc 2.5
WM-266-4
MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
Nồng độ [nM]
Đối chứng C
Cấu trúc 2.1
Đối chứng F
Cấu trúc 2.3
Cấu trúc 2.6

Fig. 13

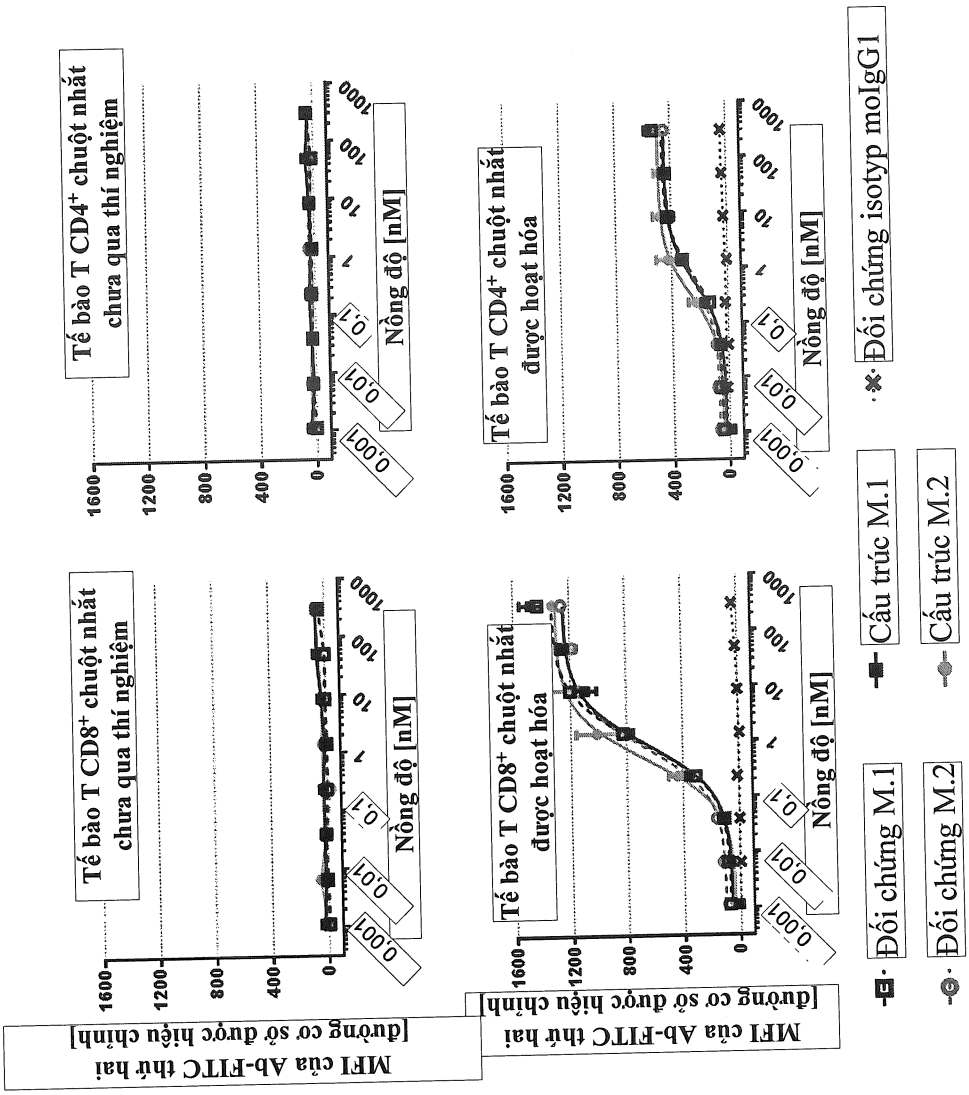
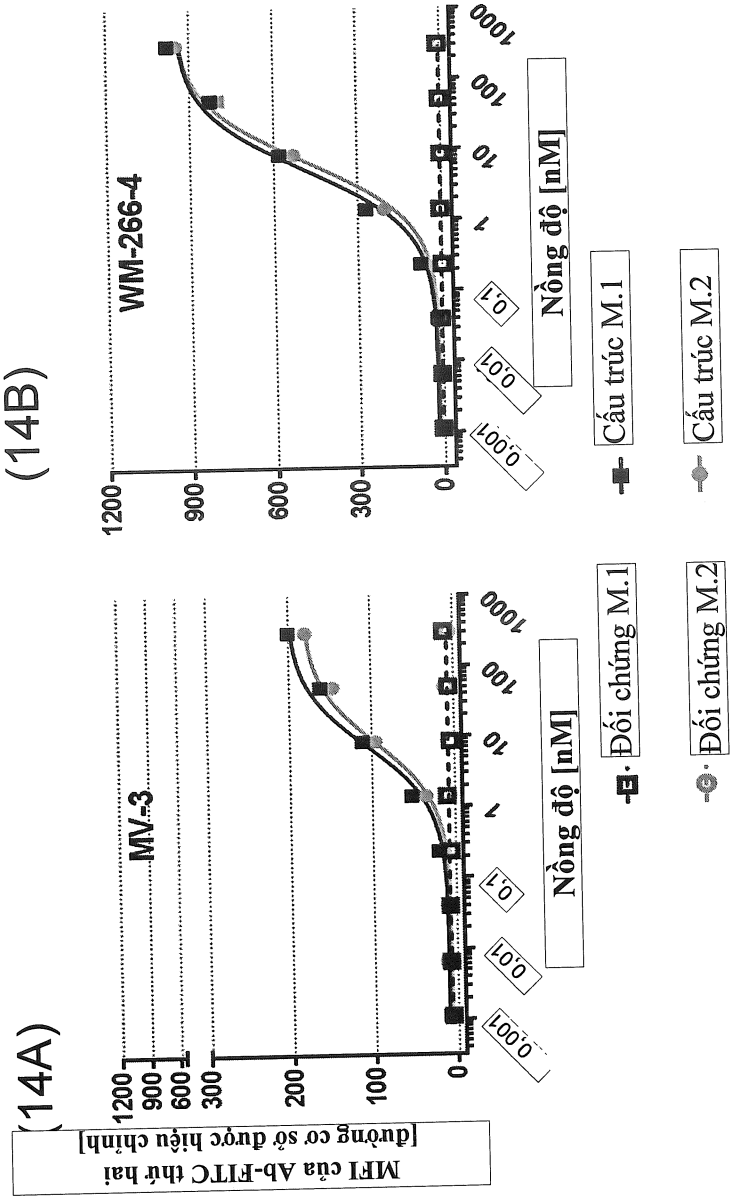

(13A)
(13B)
Tế bào T CD8+ chuột nhắt chưa qua thí nghiệm
Tế bào T CD4+ chuột nhắt chưa qua thí nghiệm
Tế bào T CD8+ chuột nhắt được hoạt hóa
Tế bào T CD4+ chuột nhắt được hoạt hóa
MFI của Ab-FITC thứ hai [dương cơ sở được hiệu chỉnh]
Nồng độ [nM]
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
0
400
800
1200
1600
Đối chứng M.1
Đối chứng M.2
Cấu trúc M.1
Cấu trúc M.2
Đối chứng isotyp molgG1

Fig. 14


(14A)
MFI của Ab-FITC thứ hai
[đường cơ sở được hiệu chỉnh]
MV-3
1200
900
600
300
200
100
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]
Đối chứng M.1
Đối chứng M.2
(14B)
WM-266-4
1200
900
600
300
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]
Cấu trúc M.1
Cấu trúc M.2

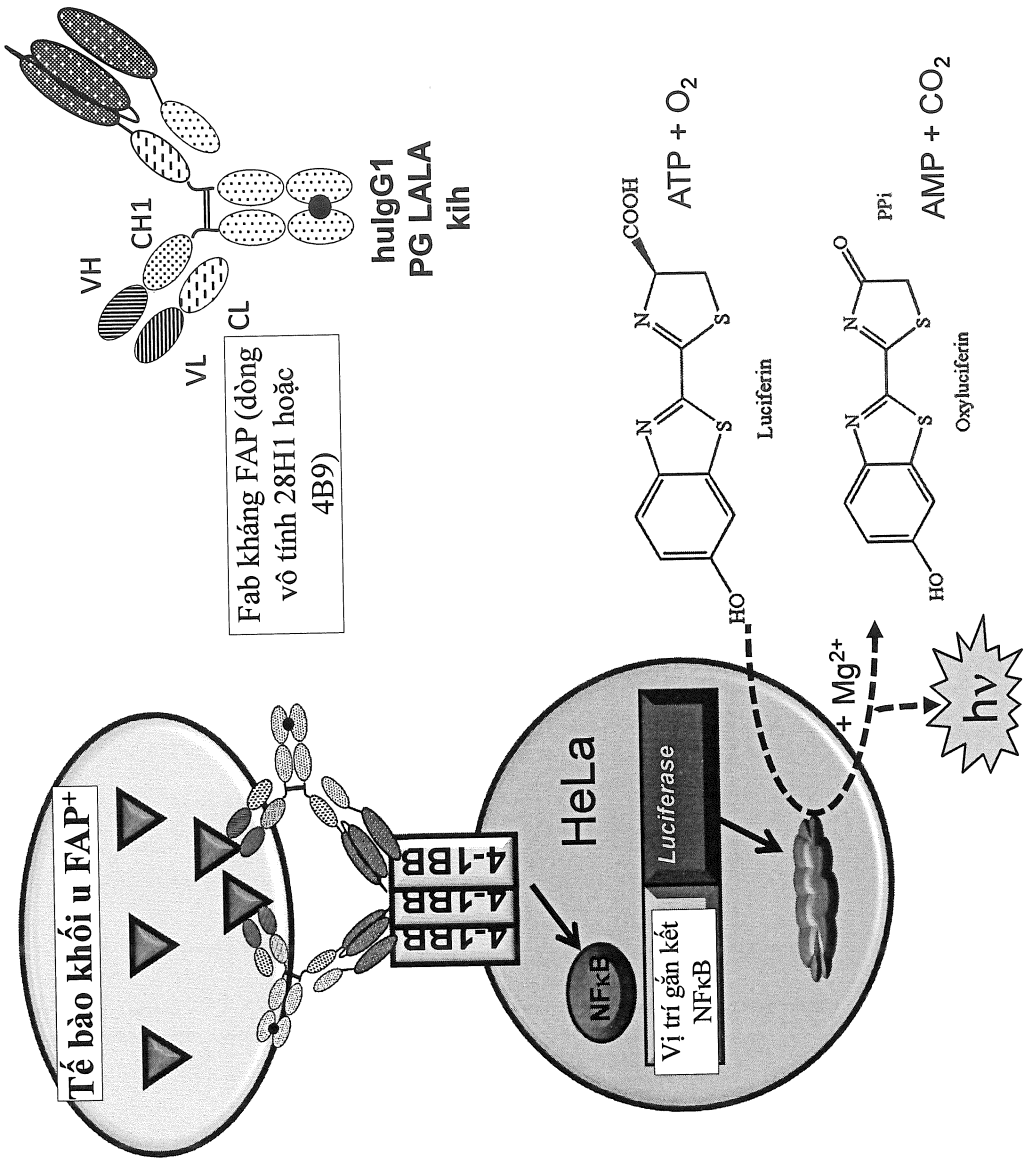

Tế bào khối u FAP+
4-1BB
4-1BB
4-1BB
HeLa
NFκB
Vị trí gắn kết NFκB
Luciferase
+ Mg2+
hν
Fab kháng FAP (dòng vô tính 28H1 hoặc 4B9)
VH
CH1
VL
CL
hulgG1 PG LALA kih
COOH
ATP + O2
Luciferin
PPi
AMP + CO2
Oxyluciferin

Fig. 15

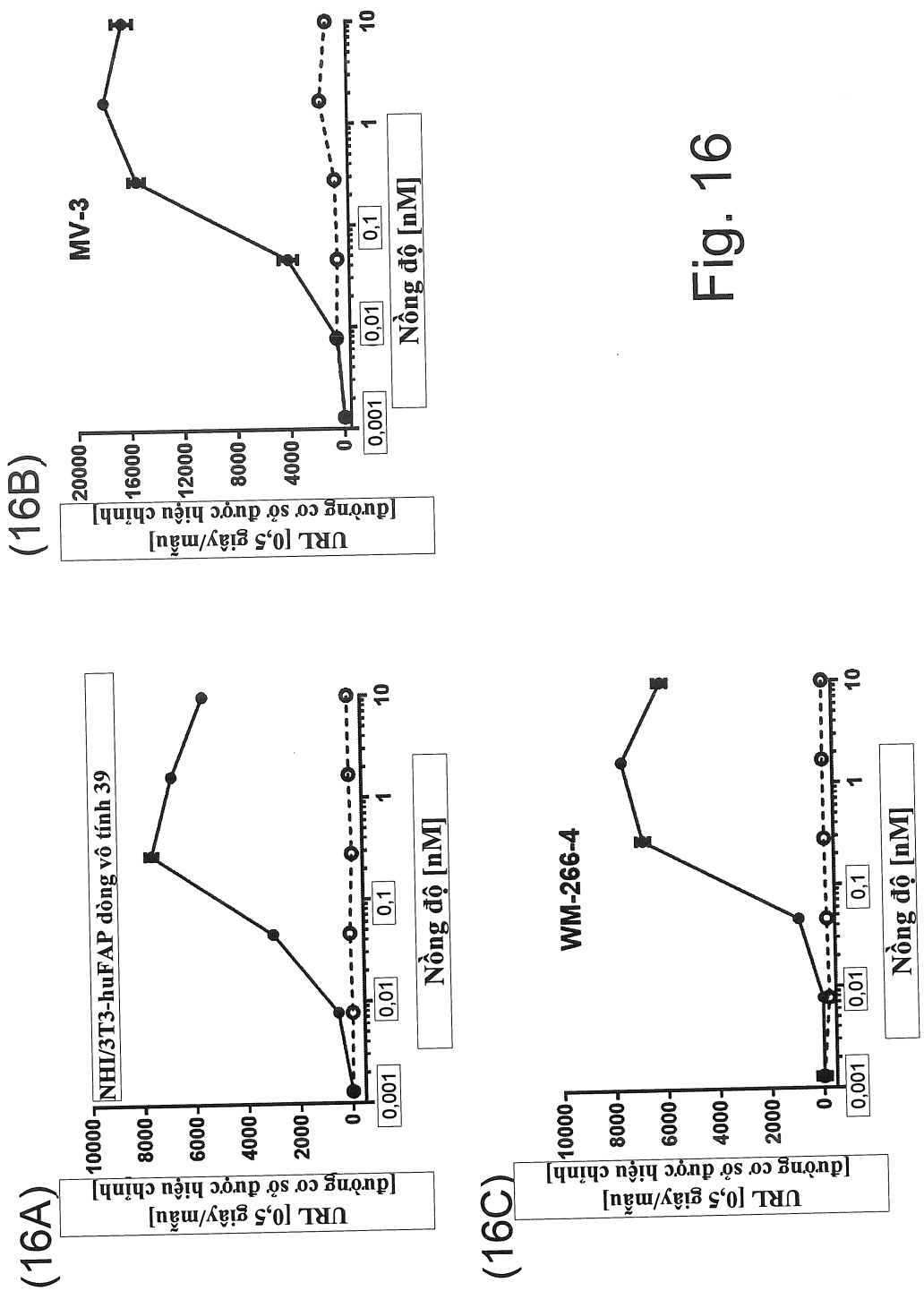

(16A)
NHI/3T3-huFAP dòng vô tính 39
URL [0,5 giây/mẫu]
[dưỡng cơ sở được hiệu chỉnh]
10000
8000
6000
4000
2000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Nồng độ [nM]
(16B)
MV-3
URL [0,5 giây/mẫu]
[dưỡng cơ sở được hiệu chỉnh]
20000
16000
12000
8000
4000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Nồng độ [nM]
(16C)
WM-266-4
URL [0,5 giây/mẫu]
[dưỡng cơ sở được hiệu chỉnh]
10000
8000
6000
4000
2000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Nồng độ [nM]

Fig. 16

Fig. 17A

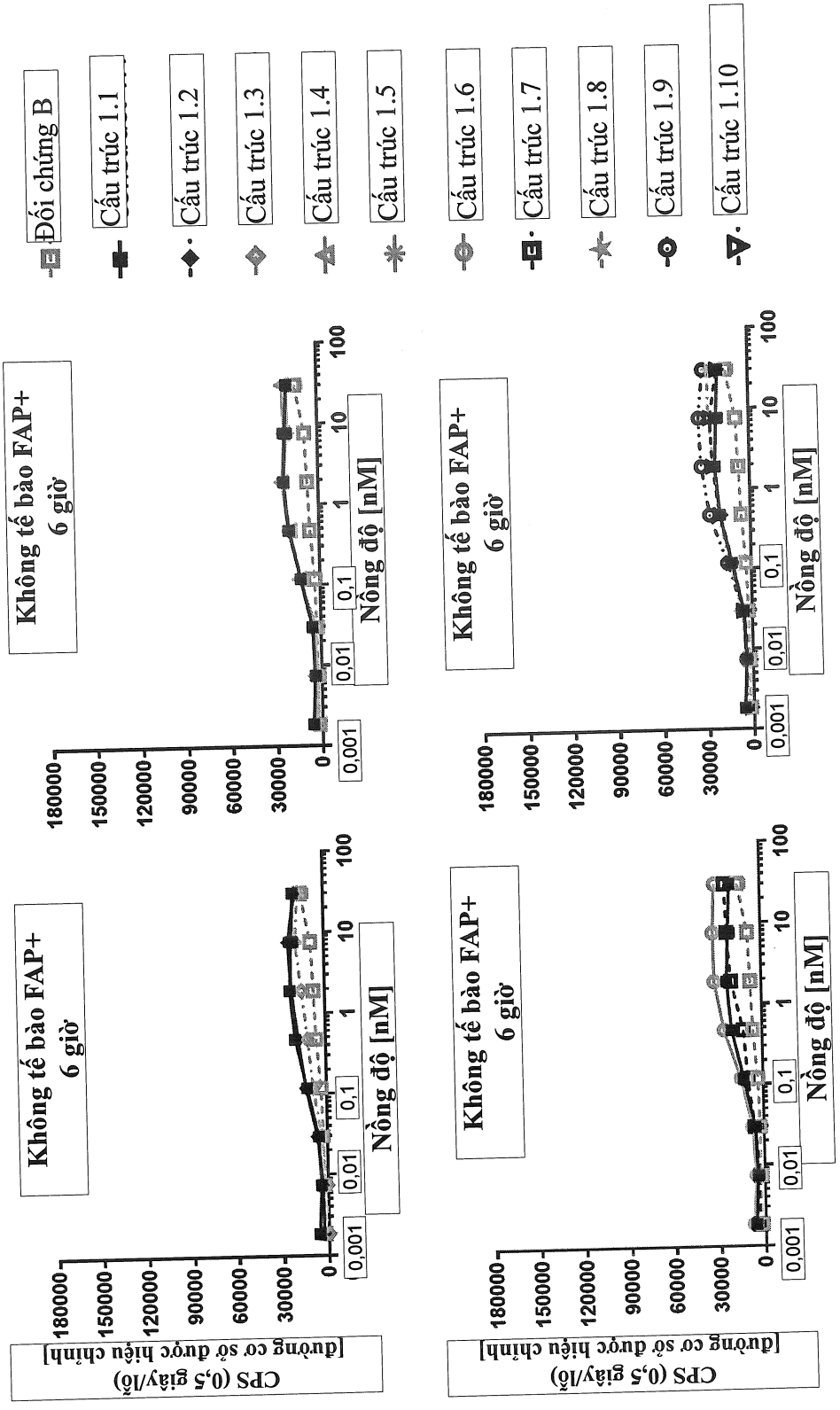

Đối chứng B
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.2
Cấu trúc 1.3
Cấu trúc 1.4
Cấu trúc 1.5
Cấu trúc 1.6
Cấu trúc 1.7
Cấu trúc 1.8
Cấu trúc 1.9
Cấu trúc 1.10
Không tế bào FAP+
6 giờ
CPS (0,5 giây/lần)
[dưỡng cơ sở được hiệu chỉnh]
Nồng độ [nM]
0
30000
60000
90000
120000
150000
180000
0,001
0,01
0,1
1
10
100

Fig. 17B

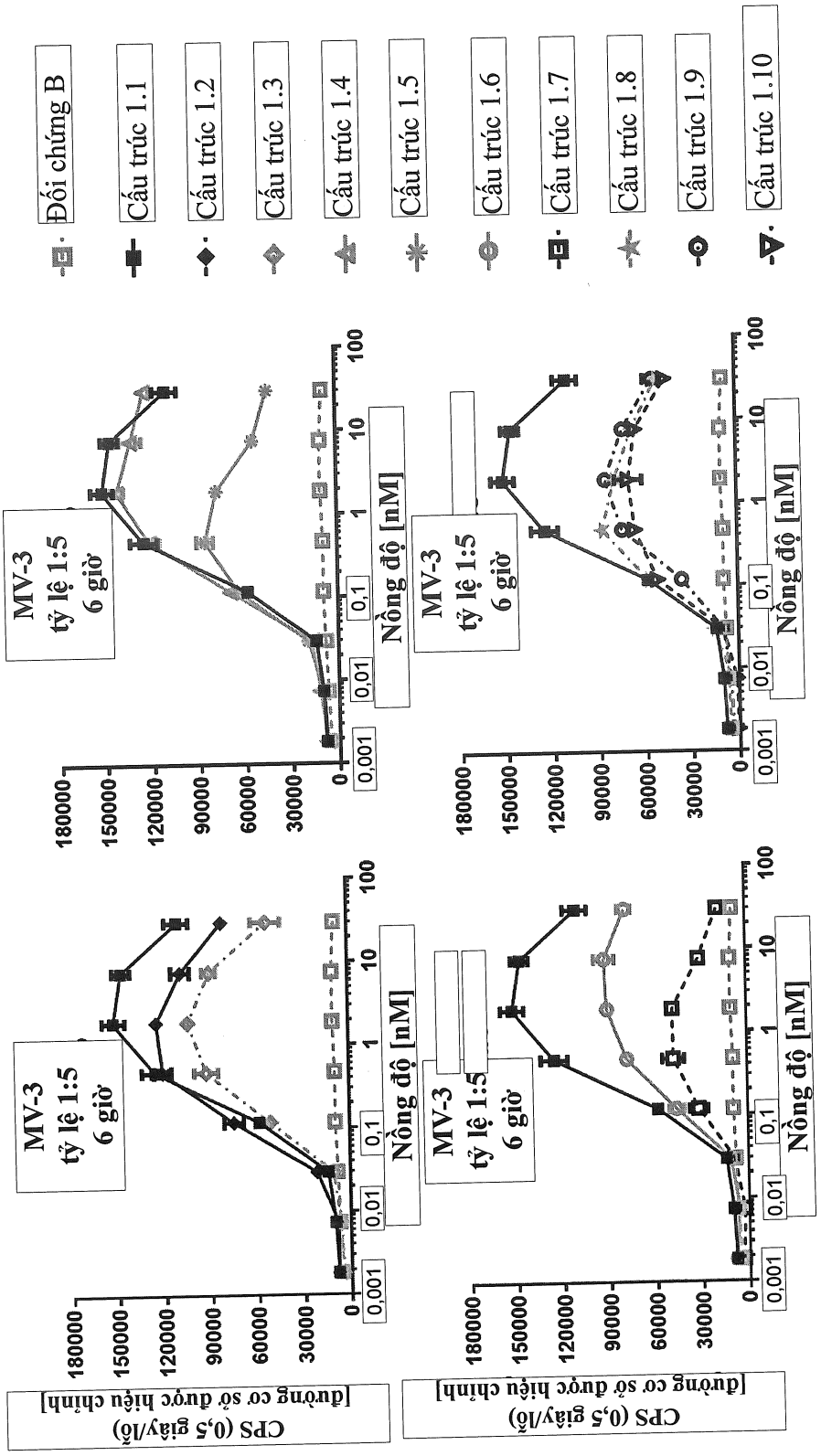

Đối chứng B
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.2
Cấu trúc 1.3
Cấu trúc 1.4
Cấu trúc 1.5
Cấu trúc 1.6
Cấu trúc 1.7
Cấu trúc 1.8
Cấu trúc 1.9
Cấu trúc 1.10
MV-3
tỷ lệ 1:5
6 giờ
CPS (0,5 giây/lỗ)
[tương co sỏ được hiệu chỉnh]
Nồng độ [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
100
0
30000
60000
90000
120000
150000
180000

Fig. 17C

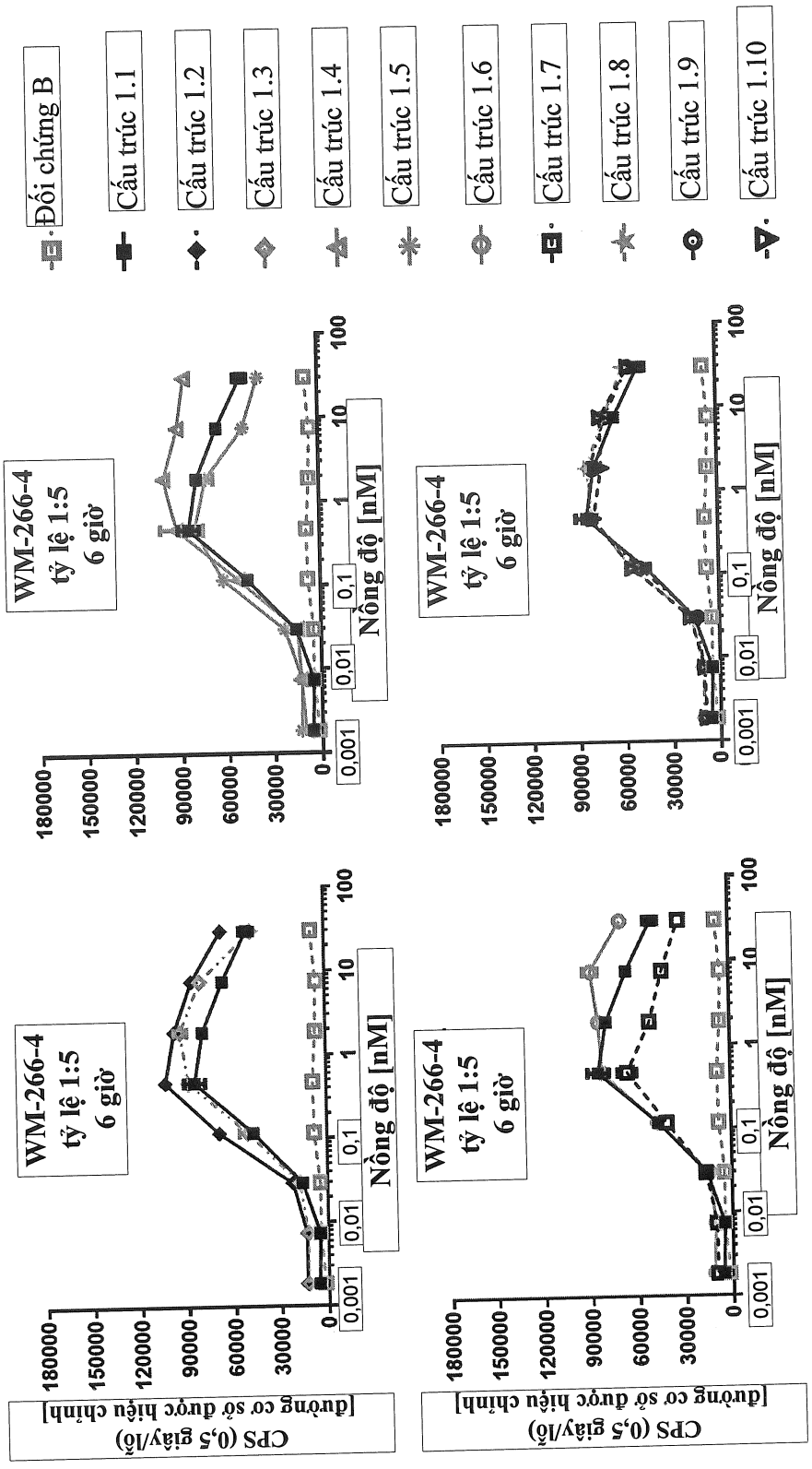
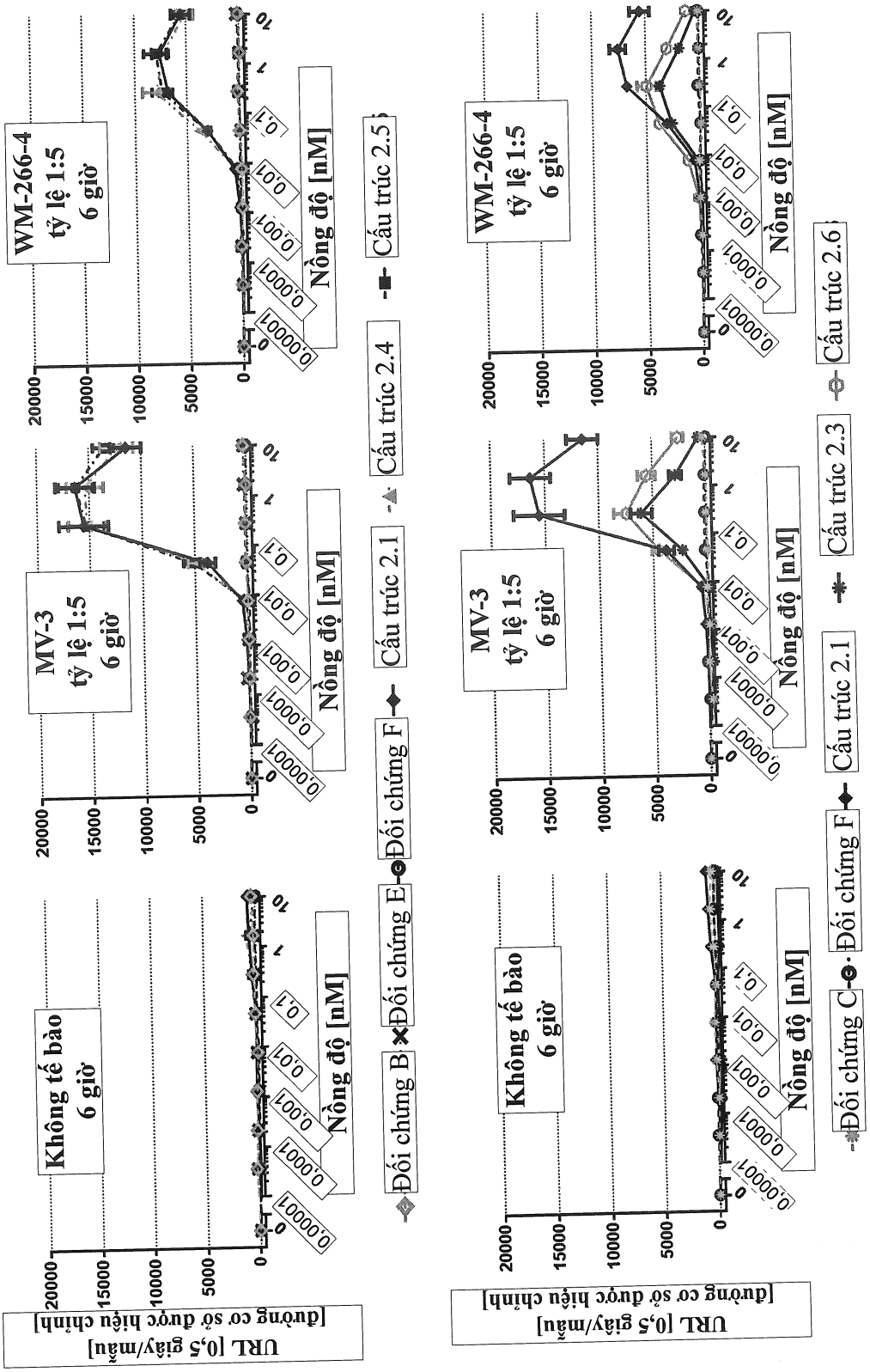

Đối chứng B
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.2
Cấu trúc 1.3
Cấu trúc 1.4
Cấu trúc 1.5
Cấu trúc 1.6
Cấu trúc 1.7
Cấu trúc 1.8
Cấu trúc 1.9
Cấu trúc 1.10
WM-266-4
tỷ lệ 1:5
6 giờ
CPS (0,5 giây/lần)
[tương ứng với được hiệu chỉnh]
Nồng độ [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
100
0
30000
60000
90000
120000
150000
180000

Fig. 18


URL [0,5 giây/mẫu]
[dường cơ sở được hiệu chỉnh]
Không tế bào
6 giờ
MV-3
tỷ lệ 1:5
6 giờ
WM-266-4
tỷ lệ 1:5
6 giờ
Nồng độ [nM]
0
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
5000
10000
15000
20000
Đối chứng B
Đối chứng C
Đối chứng E
Đối chứng F
Cấu trúc 2.1
Cấu trúc 2.3
Cấu trúc 2.4
Cấu trúc 2.5
Cấu trúc 2.6

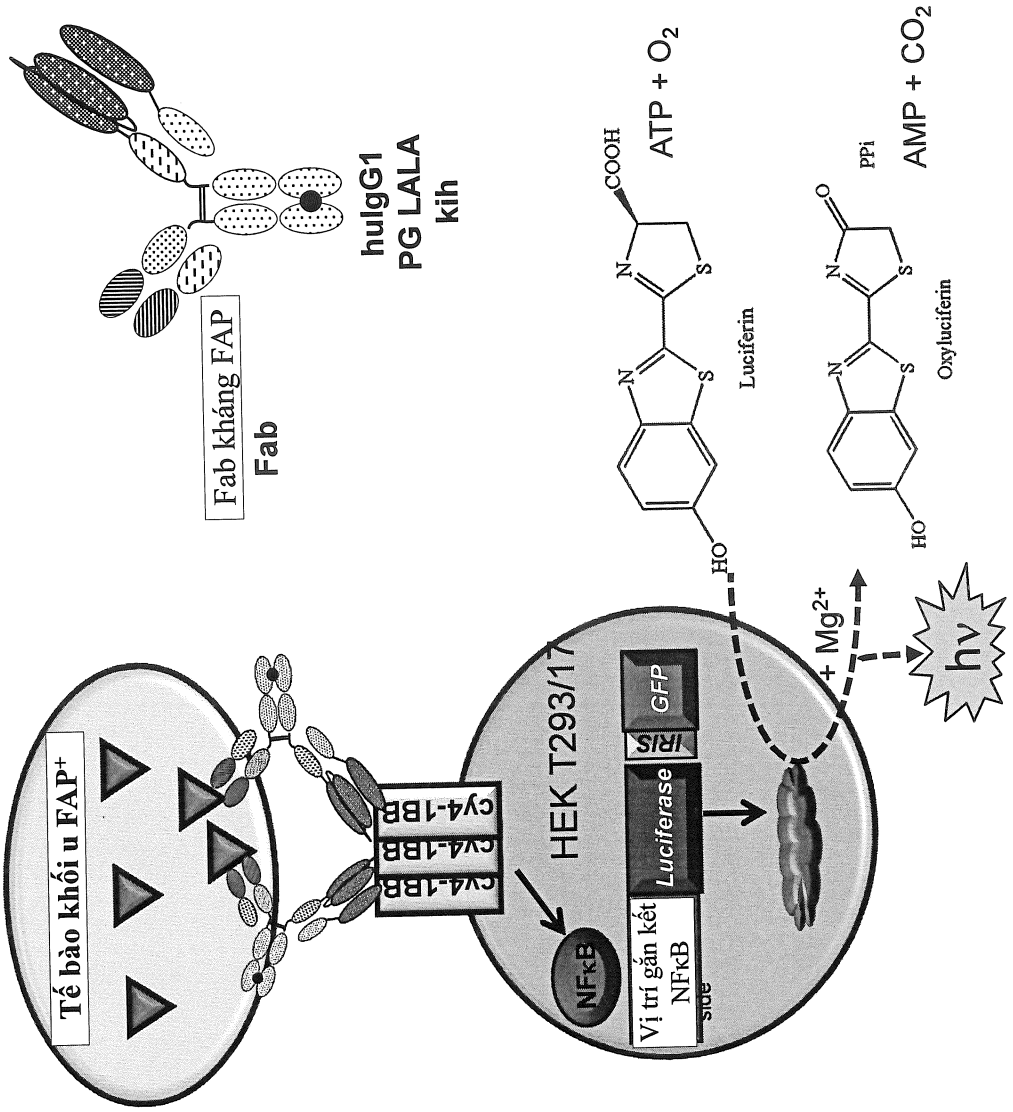
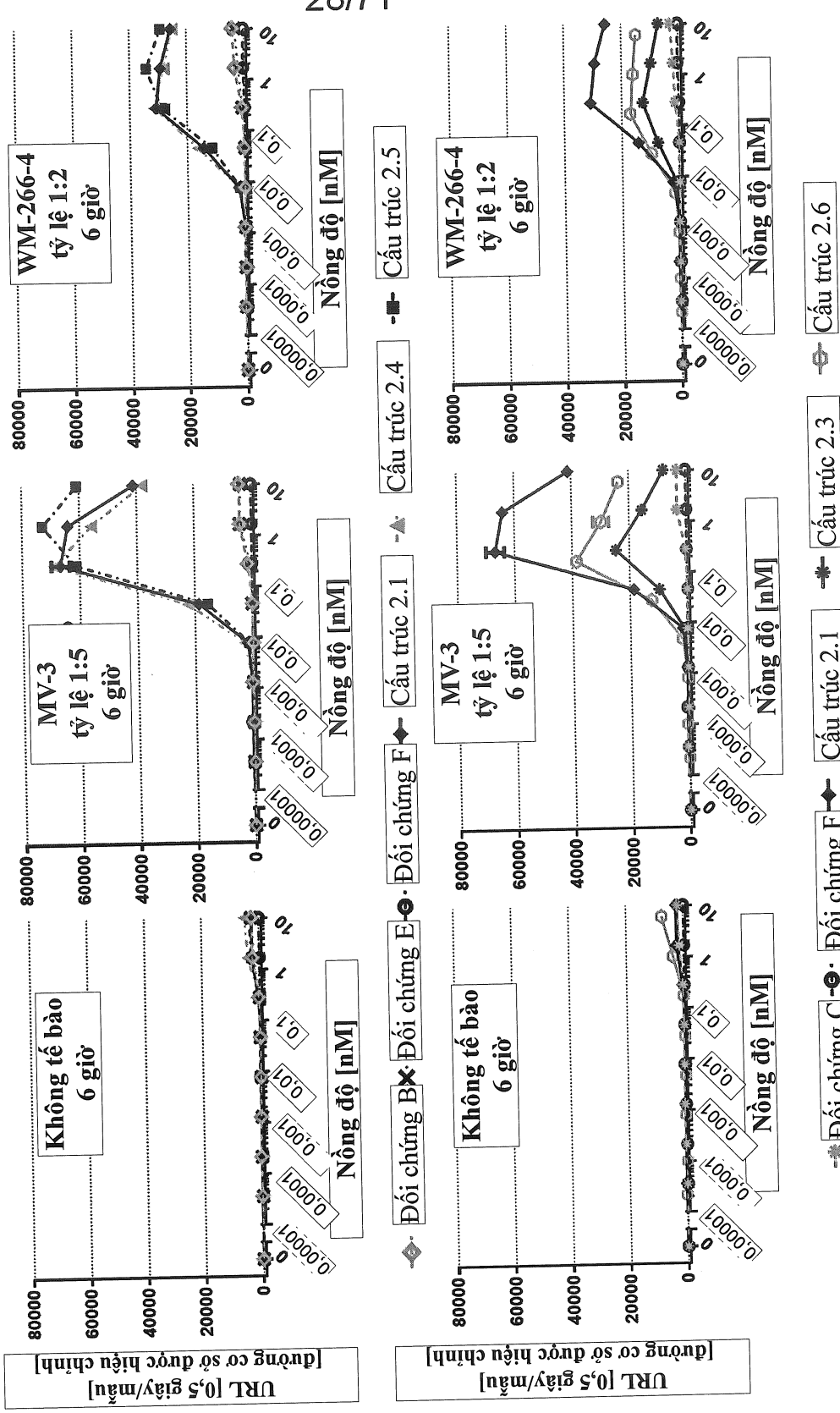

Tế bào khối u FAP+
Fab kháng FAP
Fab
hulgG1
PG LALA
kih
cy4-1BB
cy4-1BB
cy4-1BB
HEK T293/17
NFκB
Vị trí gắn kết NFκB
Luciferase
IRIS
GFP
ATP + O2
COOH
Luciferin
HO
PPi
AMP + CO2
Oxyluciferin
+ Mg2+
hv

Fig. 19

Fig. 20


URL [0,5 giây/mẫu]
[dương cơ sở được hiệu chỉnh]
Không tế bào
6 giờ
MV-3
tỷ lệ 1:5
6 giờ
WM-266-4
tỷ lệ 1:2
6 giờ
Nồng độ [nM]
0
20000
40000
60000
80000
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
Đối chứng B
Đối chứng C
Đối chứng E
Đối chứng F
Cấu trúc 2.1
Cấu trúc 2.3
Cấu trúc 2.4
Cấu trúc 2.5
Cấu trúc 2.6

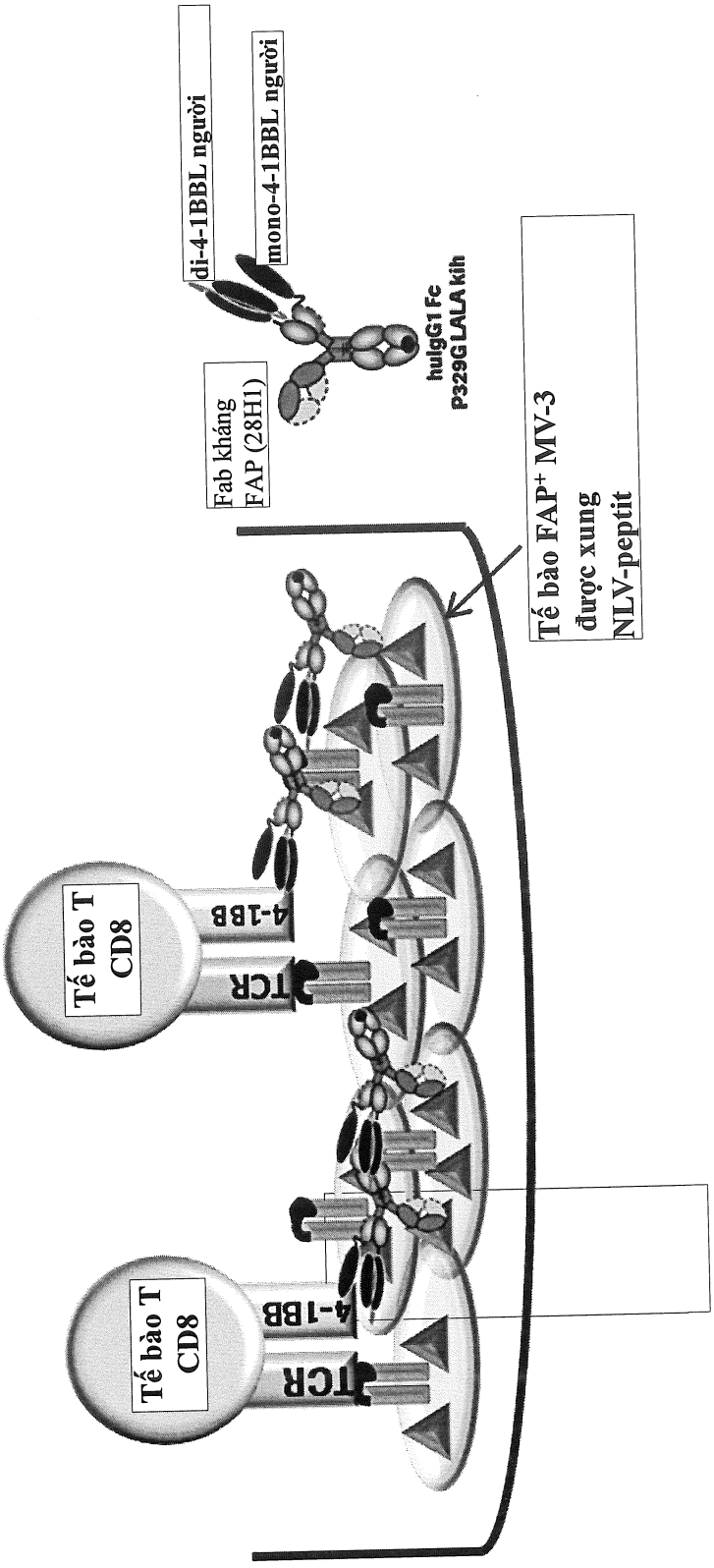

di-4-1BBL người
mono-4-1BBL người
Fab kháng FAP (28H1)
huIgG1 Fc P329G LALA kih
Tế bào FAP+ MV-3 được xung NLV-peptit
Tế bào T CD8
4-1BB
TCR
Tế bào T CD8
4-1BB
TCR

Fig. 21

Fig. 22

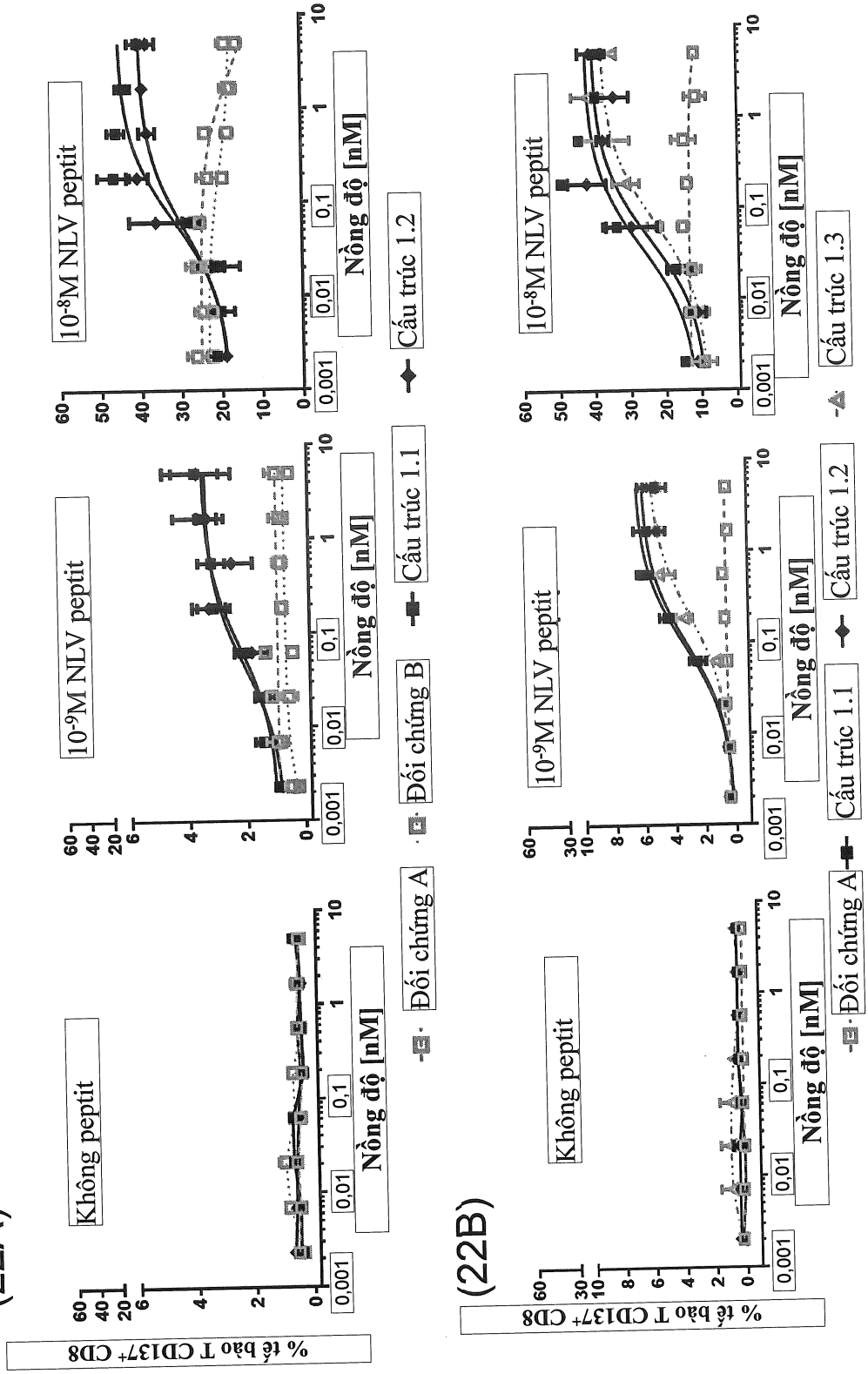

(22A)
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
% tế bào T CD137+ CD8
Nồng độ [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
Đối chứng A
Đối chứng B
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.2
(22B)
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
% tế bào T CD137+ CD8
Nồng độ [nM]
Đối chứng A
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.2
Cấu trúc 1.3

Fig. 22

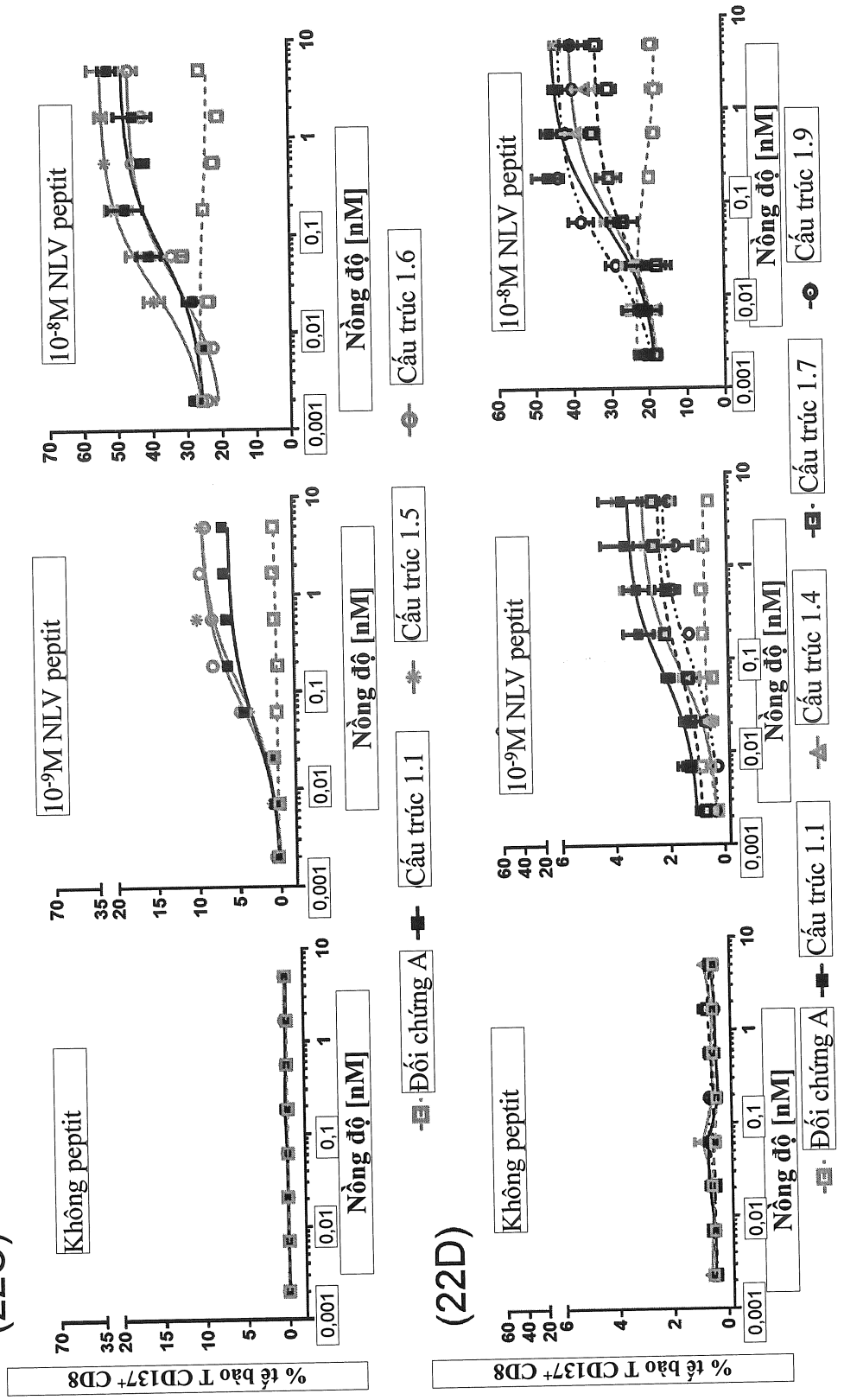

(22C)
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
% tế bào T CD137+ CD8
Nồng độ [nM]
Đối chứng A
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.5
Cấu trúc 1.6
(22D)
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
% tế bào T CD137+ CD8
Nồng độ [nM]
Đối chứng A
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.4
Cấu trúc 1.7
Cấu trúc 1.9

Fig. 22

(22E)

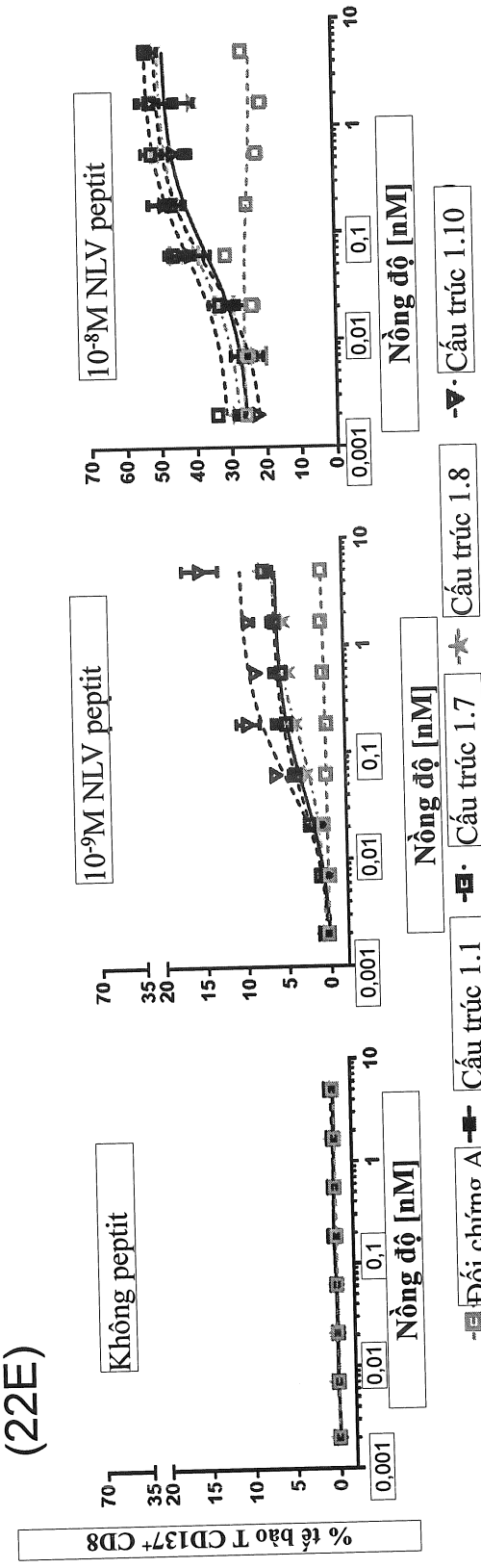

% tế bào T CD137+ CD8
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
Nồng độ [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
0
5
10
15
20
35
70
Đối chứng A
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.7
Cấu trúc 1.8
Cấu trúc 1.10

Fig. 23

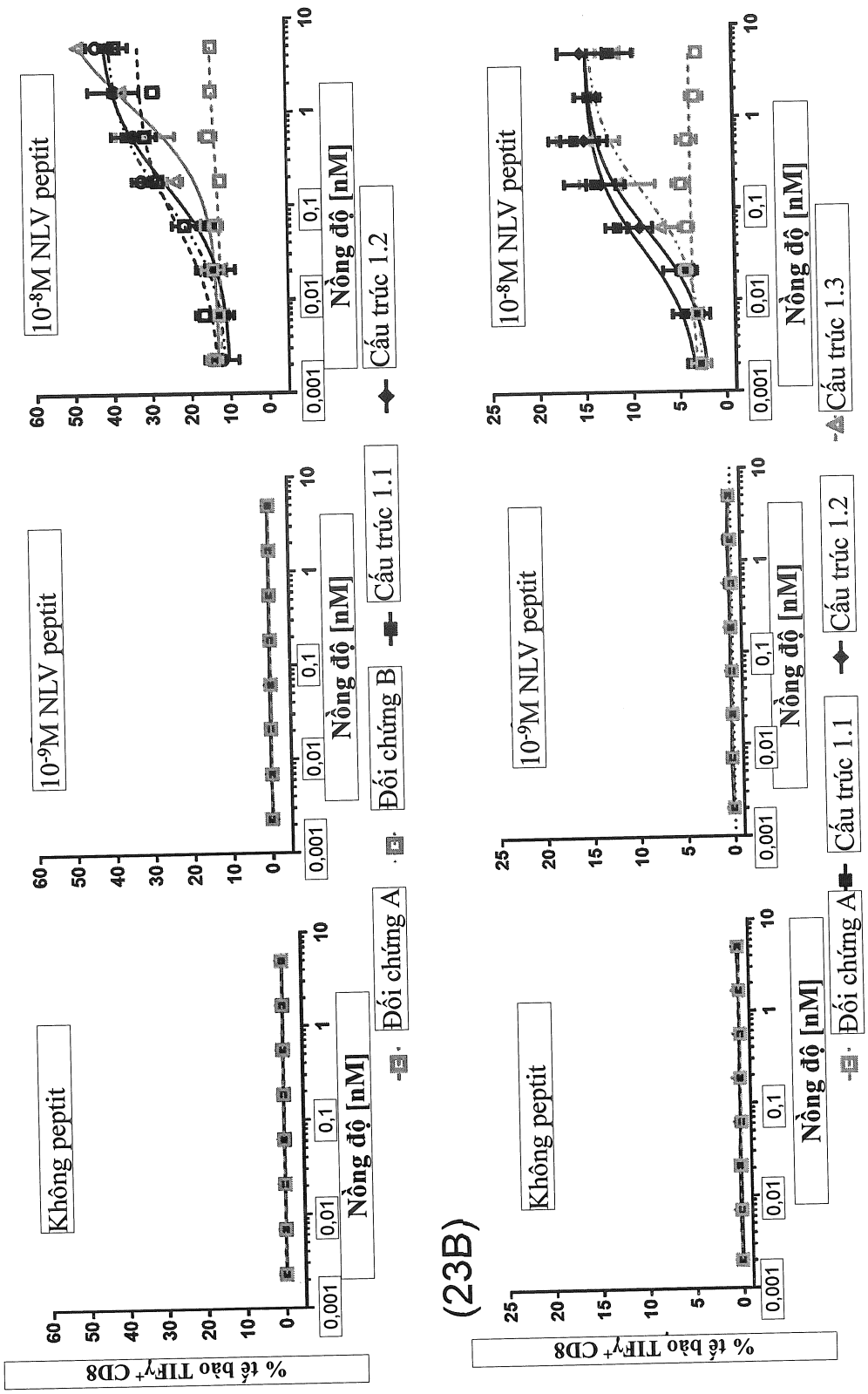

(23A)
(23B)
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
% tế bào TIFγ+ CD8
Nồng độ [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
0
5
10
15
20
25
30
40
50
60
Đối chứng A
Đối chứng B
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.2
Cấu trúc 1.3

Fig. 23

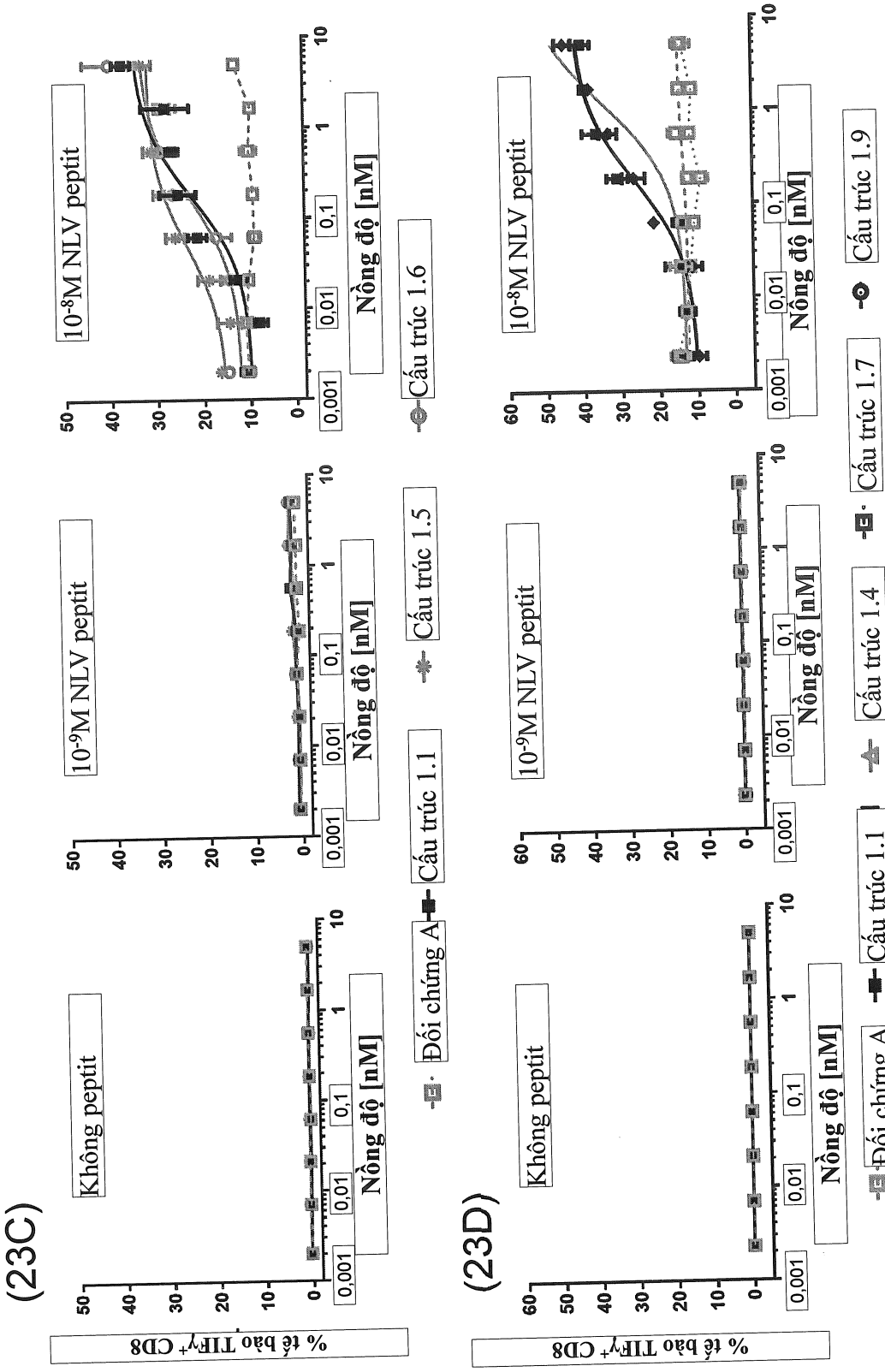

(23C)
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
% tế bào TIFγ+ CD8
Nồng độ [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
0
10
20
30
40
50
Đối chứng A
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.5
Cấu trúc 1.6
(23D)
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
% tế bào TIFγ+ CD8
Nồng độ [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
0
10
20
30
40
50
60
Đối chứng A
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.4
Cấu trúc 1.7
Cấu trúc 1.9

Fig. 23

(23E)

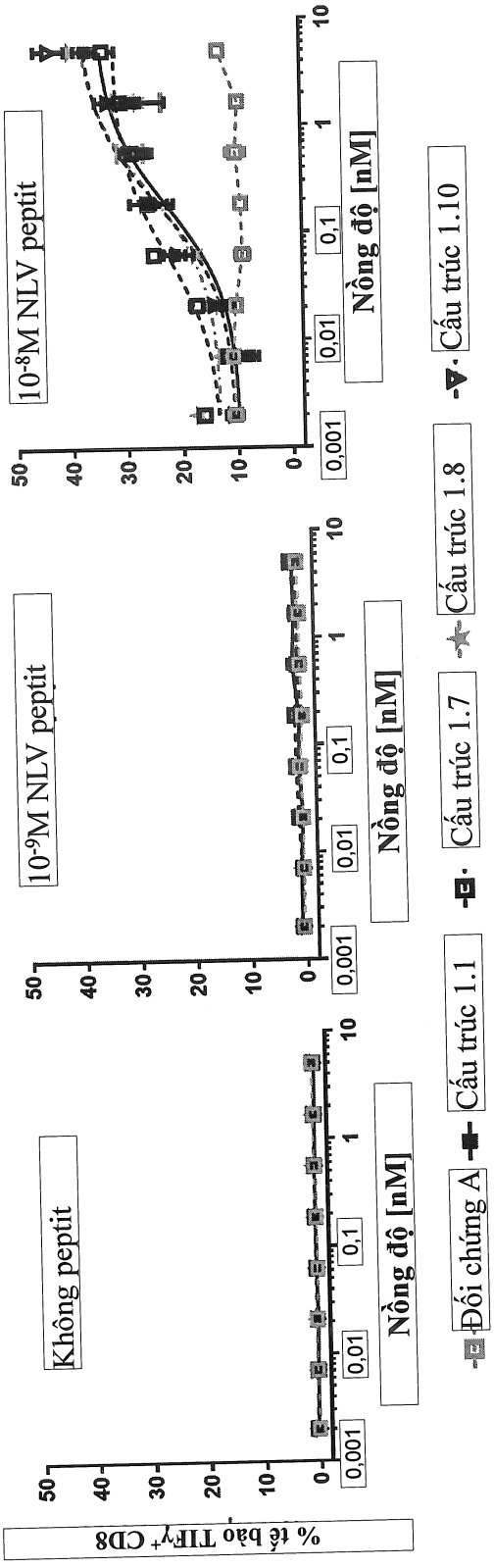

% tế bào TIFγ+ CD8
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
Nồng độ [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
0
10
20
30
40
50
Đối chứng A
Cấu trúc 1.1
Cấu trúc 1.7
Cấu trúc 1.8
Cấu trúc 1.10

Fig. 24

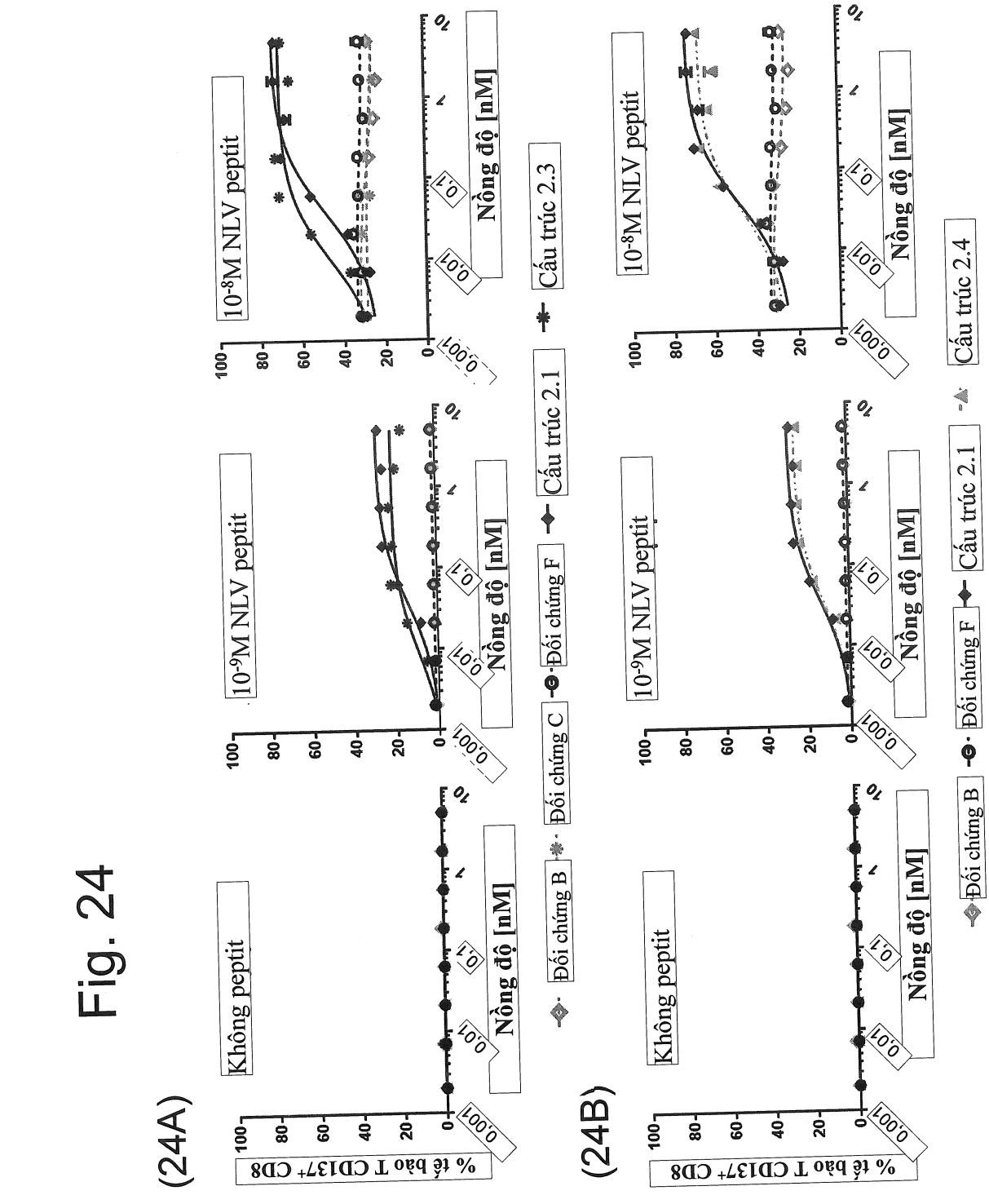
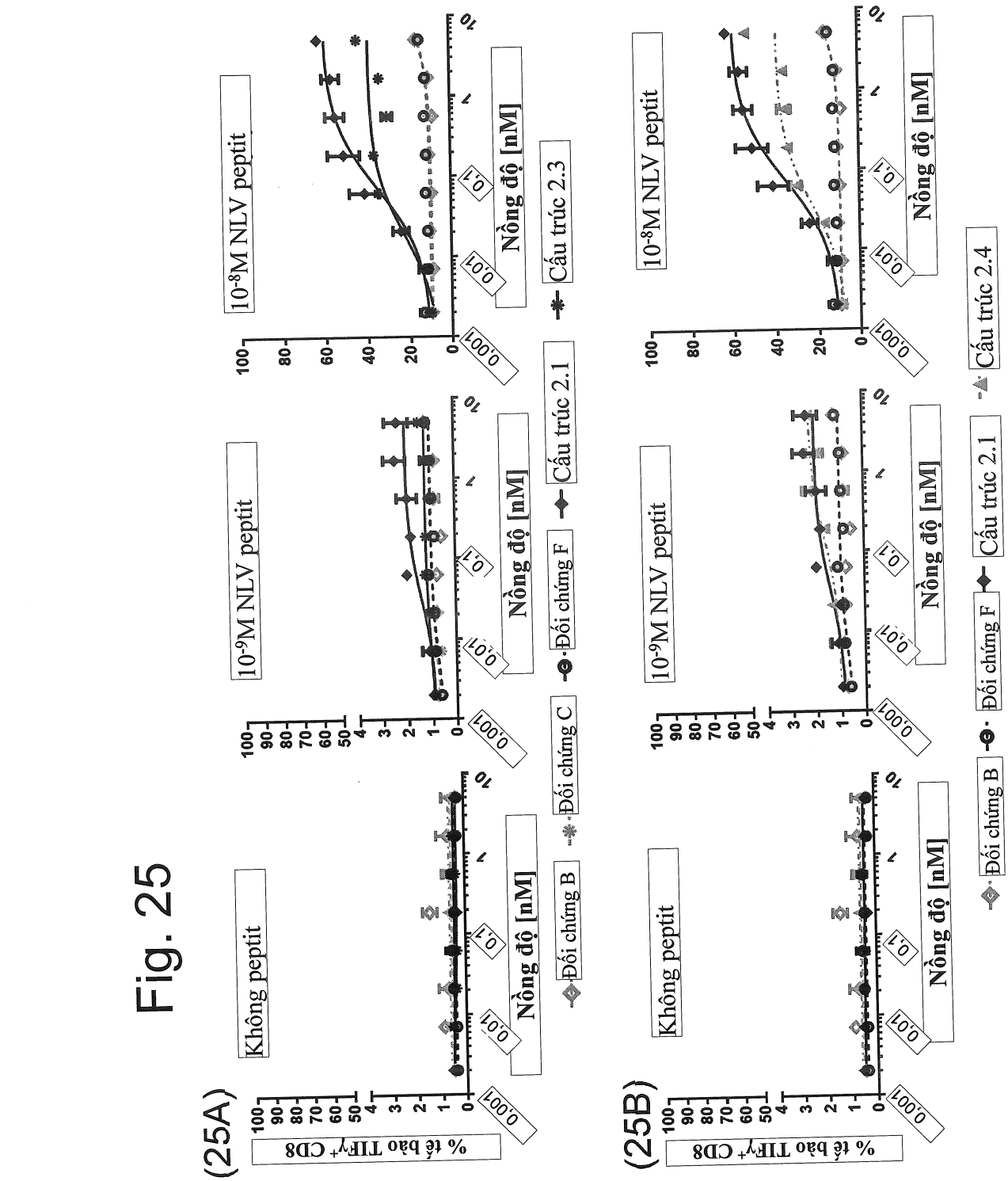

(24A)
(24B)
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
% tế bào T CD137+ CD8
Nồng độ [nM]
0,001
0,01
0,1
1
10
0
20
40
60
80
100
Đối chứng B
Đối chứng C
Đối chứng F
Cấu trúc 2.1
Cấu trúc 2.3
Cấu trúc 2.4

Fig. 25


(25A)
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
% tế bào TIFγ+ CD8
Nồng độ [nM]
Đối chứng B
Đối chứng C
Đối chứng F
Cấu trúc 2.1
Cấu trúc 2.3
(25B)
Không peptit
10-9M NLV peptit
10-8M NLV peptit
% tế bào TIFγ+ CD8
Nồng độ [nM]
Đối chứng B
Đối chứng F
Cấu trúc 2.1
Cấu trúc 2.4

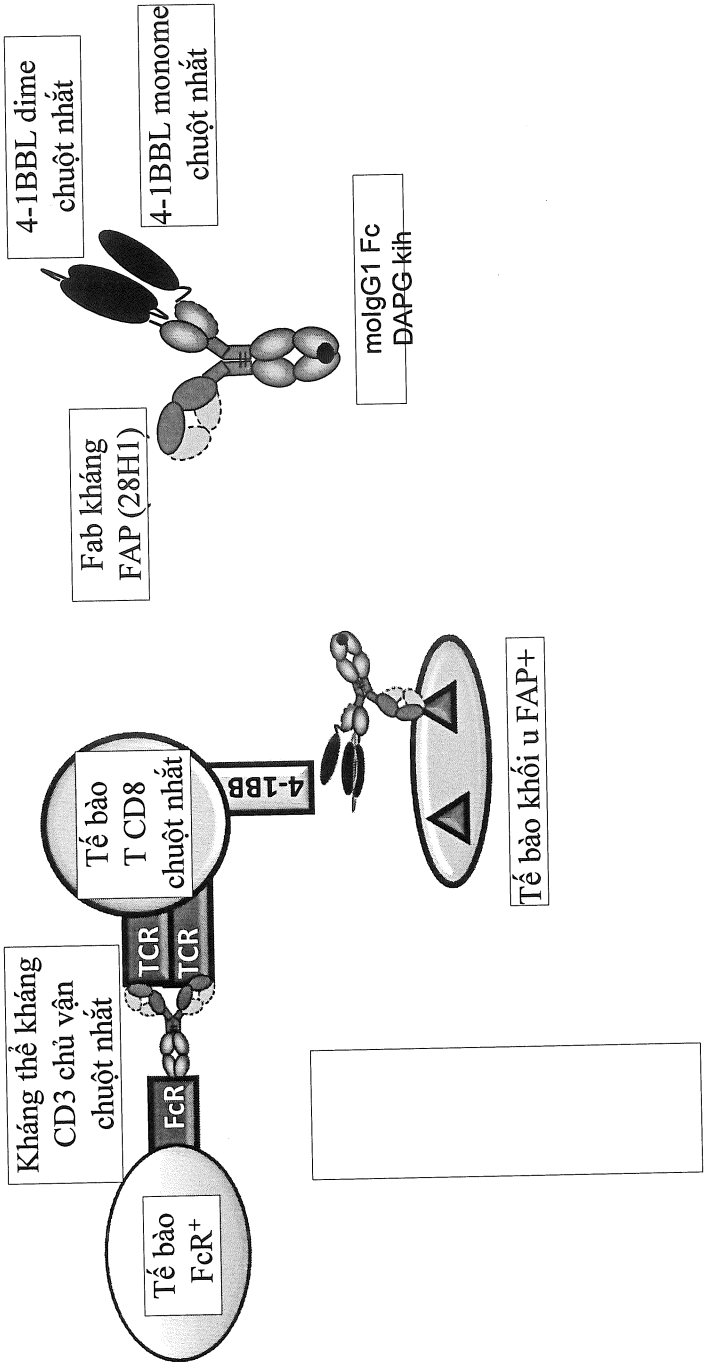

4-1BBL dime chuột nhắt
4-1BBL monome chuột nhắt
molgG1 Fc DAPG-kih
Fab kháng FAP (28H1)
4-1BB
Tế bào T CD8 chuột nhắt
TCR
TCR
FcR
Kháng thể kháng CD3 chủ vận chuột nhắt
Tế bào FcR+
Tế bào khối u FAP+

Fig. 26

Fig. 27

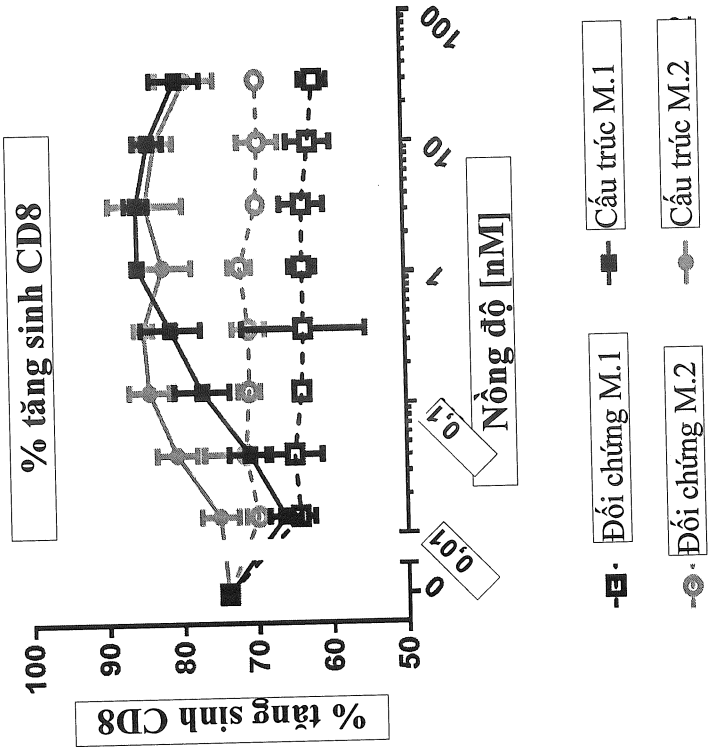

% tăng sinh CD8
100
90
80
70
60
50
% tăng sinh CD8
0
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ [nM]
Đối chứng M.1
Cấu trúc M.1
Đối chứng M.2
Cấu trúc M.2

Fig. 28A

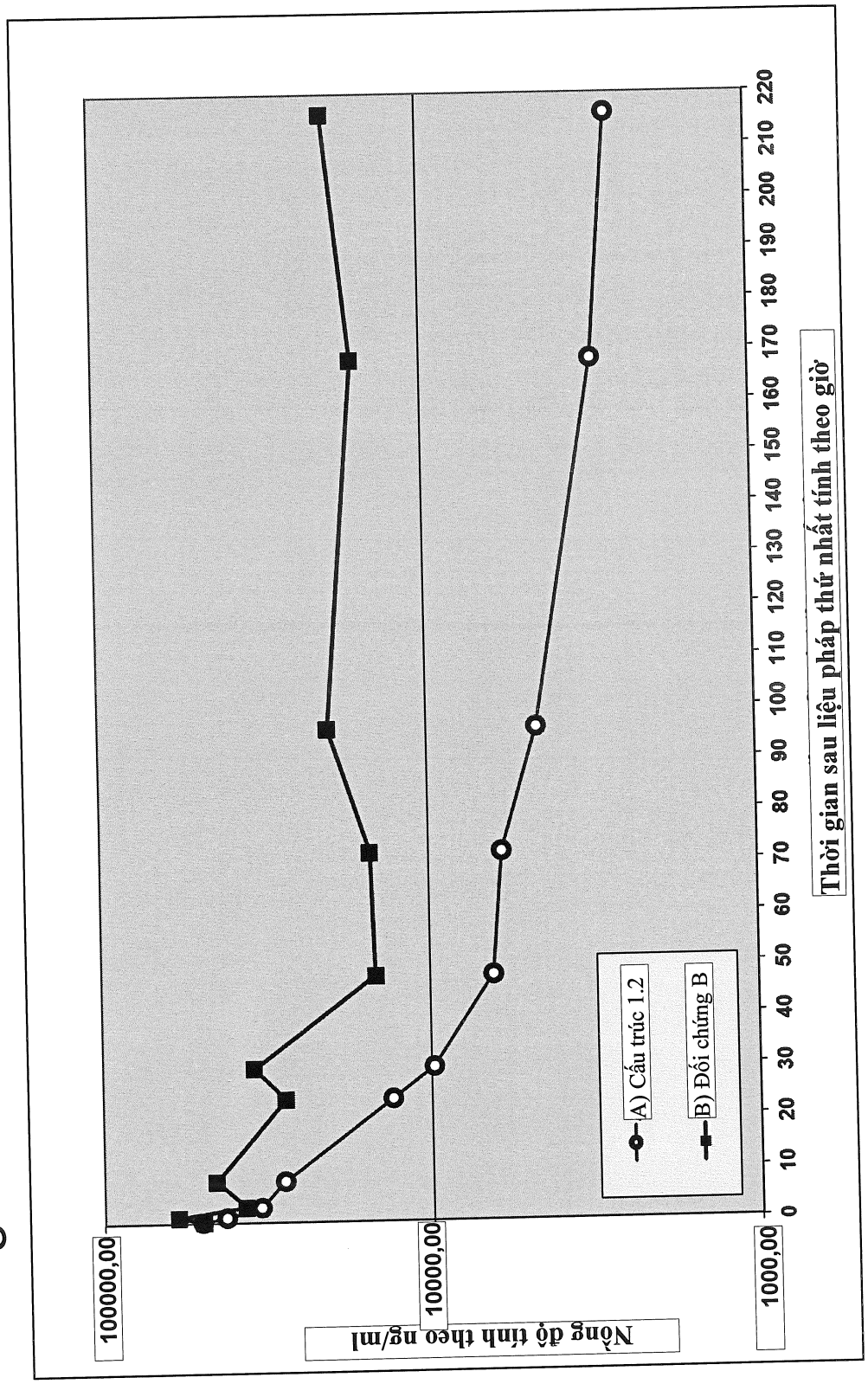
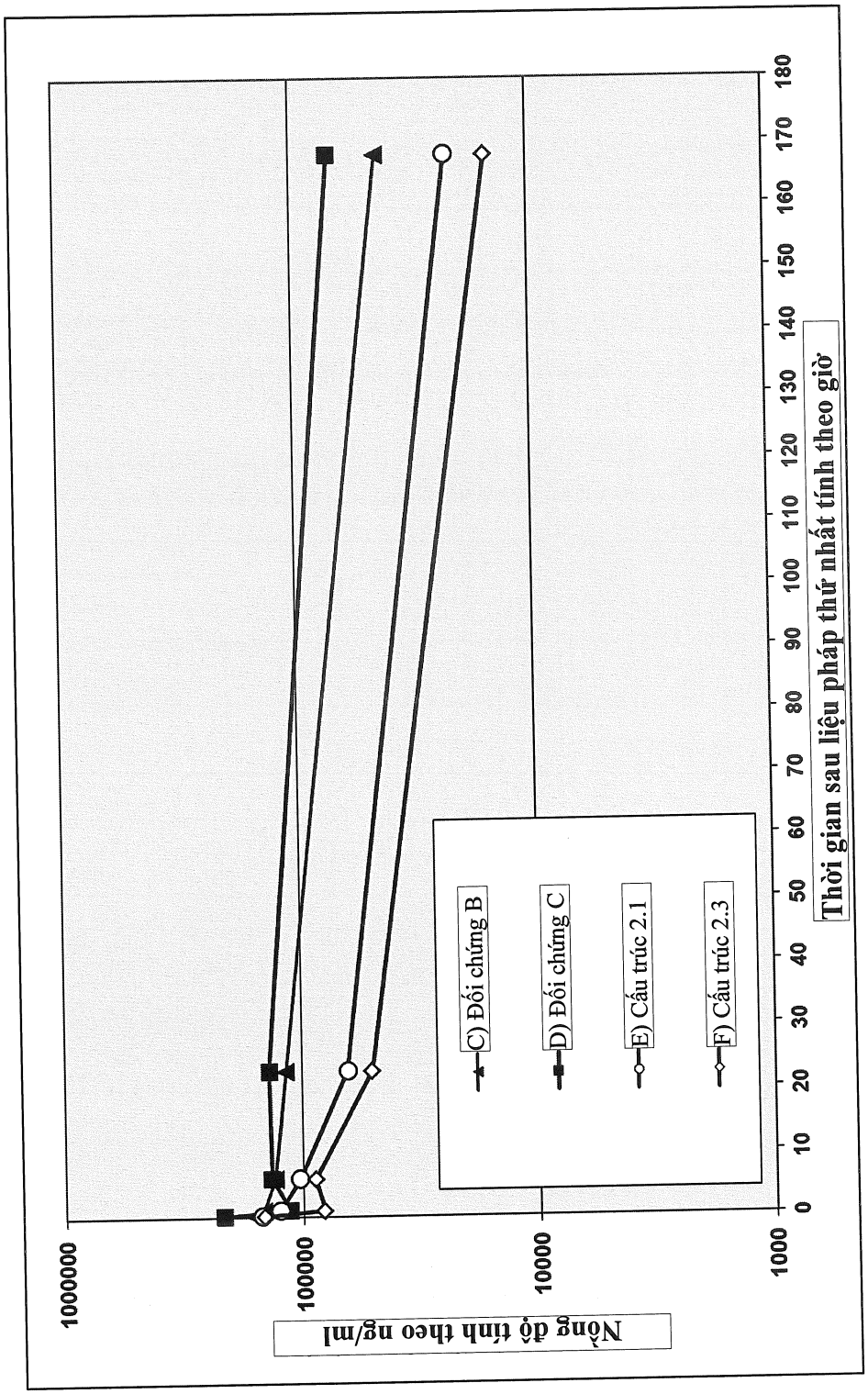

100000,00
10000,00
1000,00
Nồng độ tính theo ng/ml
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
Thời gian sau liệu pháp thứ nhất tính theo giờ
A) Cấu trúc 1.2
B) Đối chứng B

Fig. 28B


Nồng độ tính theo ng/ml
1000000
100000
10000
1000
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
Thời gian sau liệu pháp thứ nhất tính theo giờ
C) Đối chứng B
D) Đối chứng C
E) Cấu trúc 2.1
F) Cấu trúc 2.3

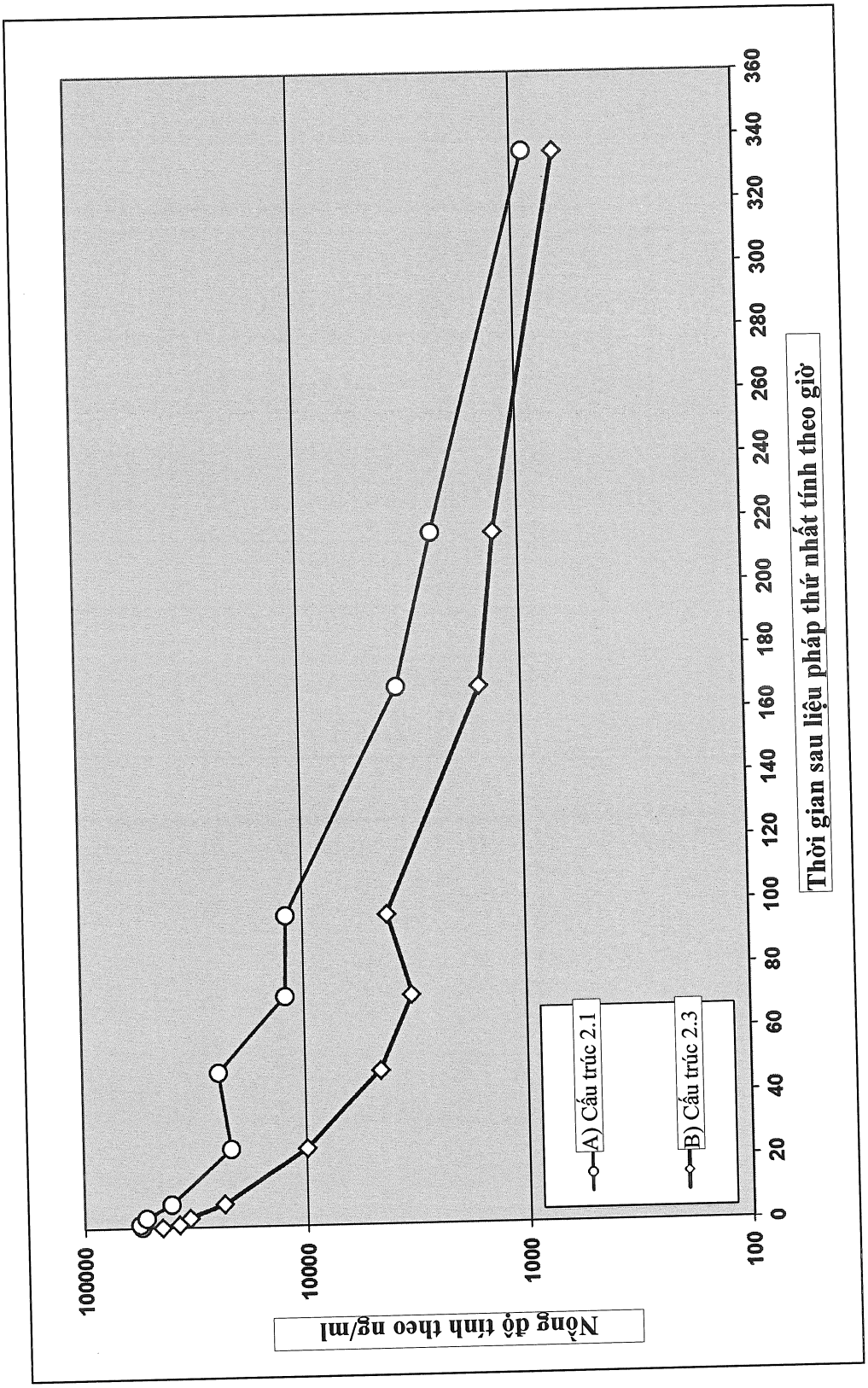

Nồng độ tính theo ng/ml
100000
10000
1000
100
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300
320
340
360
Thời gian sau liệu pháp thứ nhất tính theo giờ
A) Cấu trúc 2.1
B) Cấu trúc 2.3

Fig. 28C

Fig. 29

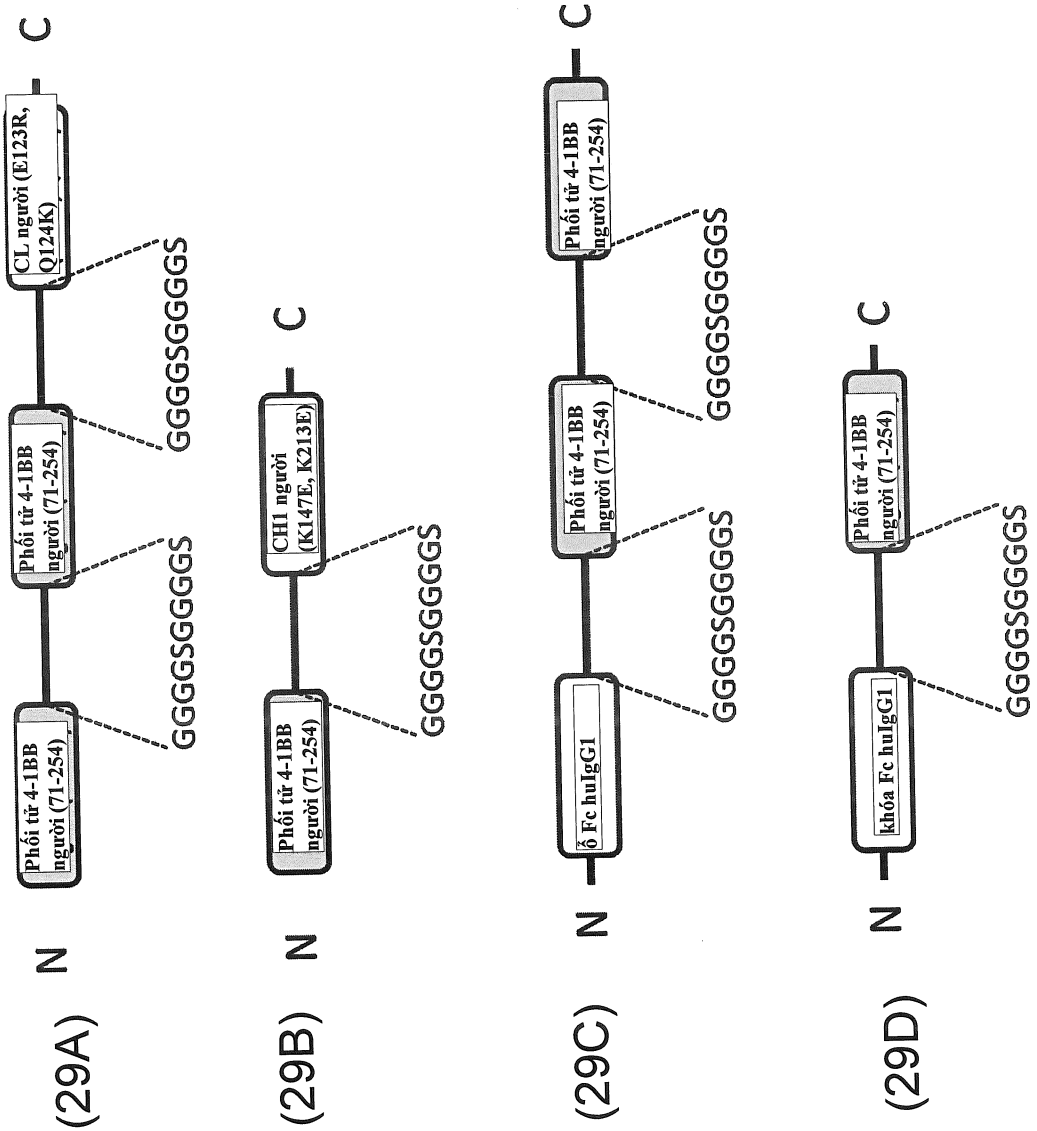

(29A)
N
Phối tử 4-1BB người (71-254)
GGGGSGGGGS
Phối tử 4-1BB người (71-254)
GGGGSGGGGS
CL người (E123R, Q124K)
C
(29B)
N
Phối tử 4-1BB người (71-254)
GGGGSGGGGS
CH1 người (K147E, K213E)
C
(29C)
N
ồ Fc huIgG1
GGGGSGGGGS
Phối tử 4-1BB người (71-254)
GGGGSGGGGS
Phối tử 4-1BB người (71-254)
C
(29D)
N
khóa Fc huIgG1
GGGGSGGGGS
Phối tử 4-1BB người (71-254)
C

Fig. 30

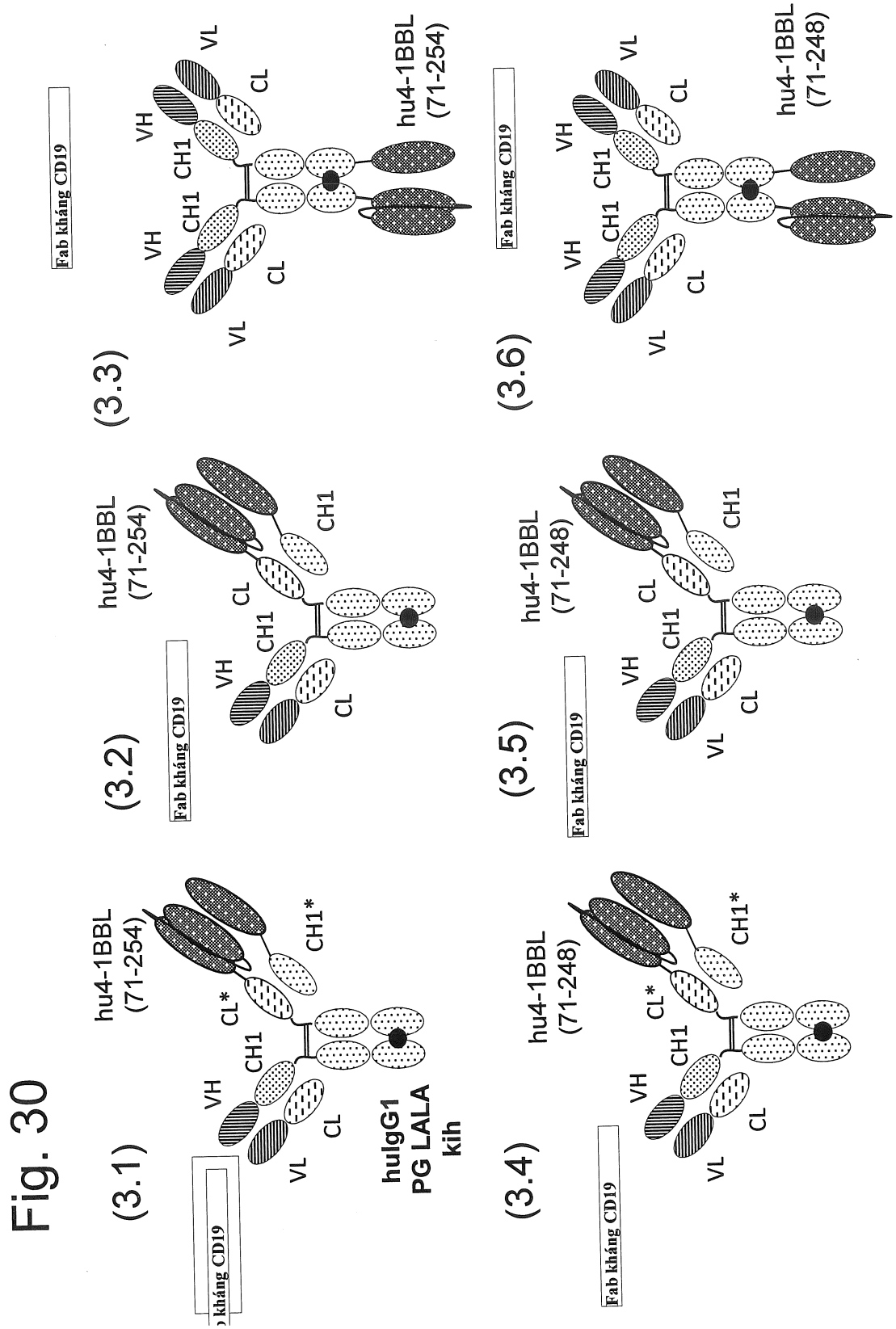
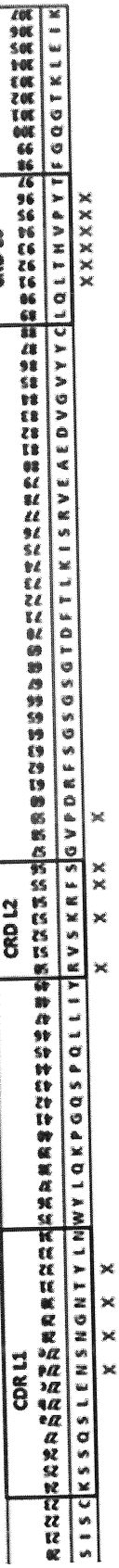

(3.1)
hu4-1BBL (71-254)
CL*
CH1*
VH
CH1
VL
CL
huIgG1 PG LALA kih
Fab kháng CD19
(3.2)
hu4-1BBL (71-254)
CH1
CL
VH
CH1
CL
Fab kháng CD19
(3.3)
Fab kháng CD19
VL
CL
VH
CH1
VH
CH1
VL
CL
hu4-1BBL (71-254)
(3.4)
hu4-1BBL (71-248)
CL*
CH1*
VH
CH1
VL
CL
Fab kháng CD19
(3.5)
hu4-1BBL (71-248)
CH1
CL
VH
CH1
VL
CL
Fab kháng CD19
(3.6)
Fab kháng CD19
VL
CL
VH
CH1
VH
CH1
VL
CL
hu4-1BBL (71-248)

Fig. 31A

CDR theo phương pháp đánh số theo Kabat



Trình tự VL 8B8

X X X

Fig. 31B

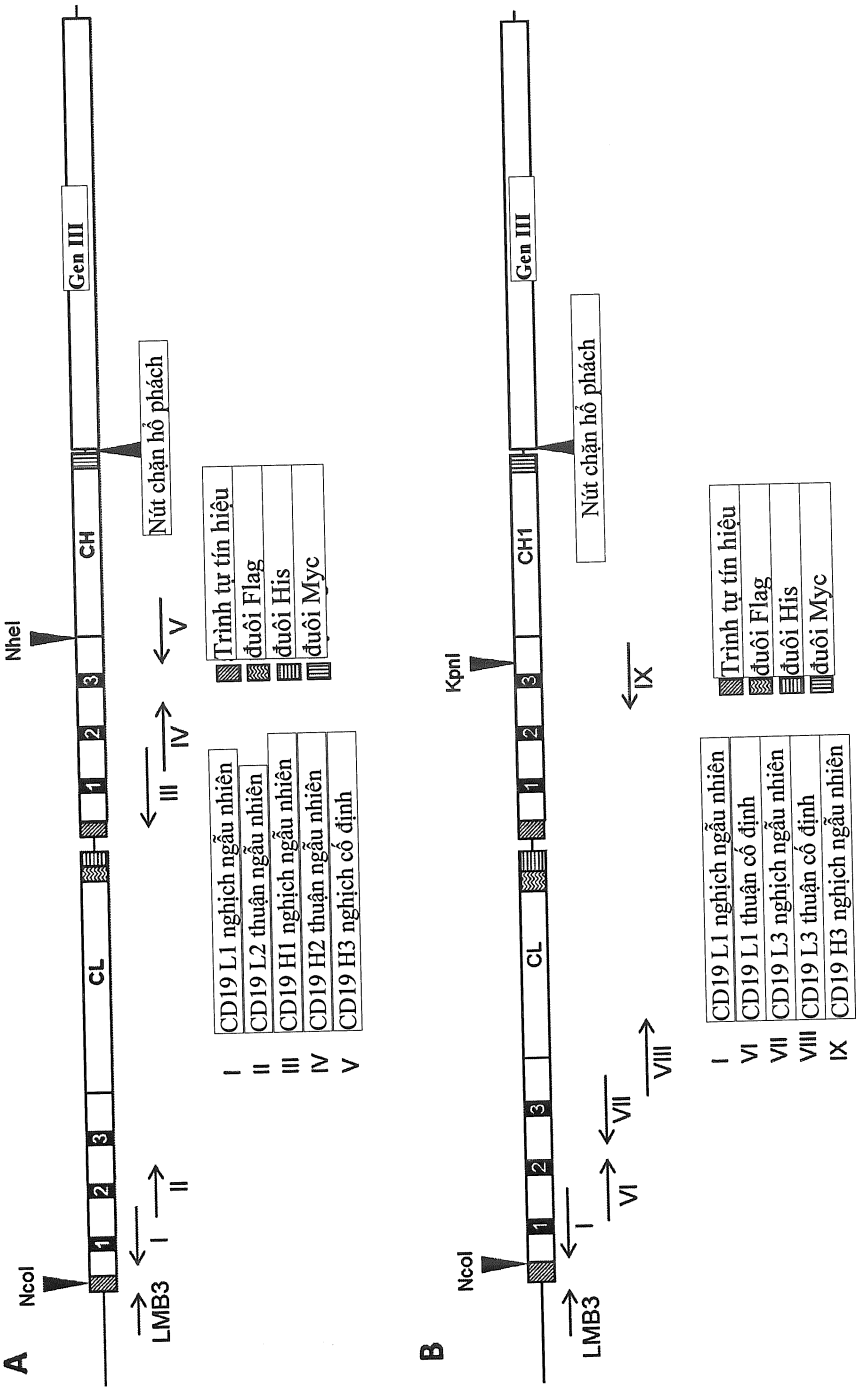

A
NcoI
LMB3
CL
CH
Gen III
NheI
Nút chặn hổ phách
I
II
III
IV
V
CD19 L1 nghịch ngẫu nhiên
CD19 L2 thuận ngẫu nhiên
CD19 H1 nghịch ngẫu nhiên
CD19 H2 thuận ngẫu nhiên
CD19 H3 nghịch cố định
Trình tự tín hiệu
đuôi Flag
đuôi His
đuôi Myc
B
NcoI
LMB3
CL
CH1
Gen III
KpnI
Nút chặn hổ phách
I
VI
VII
VIII
IX
CD19 L1 nghịch ngẫu nhiên
CD19 L1 thuận cố định
CD19 L3 nghịch ngẫu nhiên
CD19 L3 thuận cố định
CD19 H3 nghịch ngẫu nhiên
Trình tự tín hiệu
đuôi Flag
đuôi His
đuôi Myc

Fig. 32

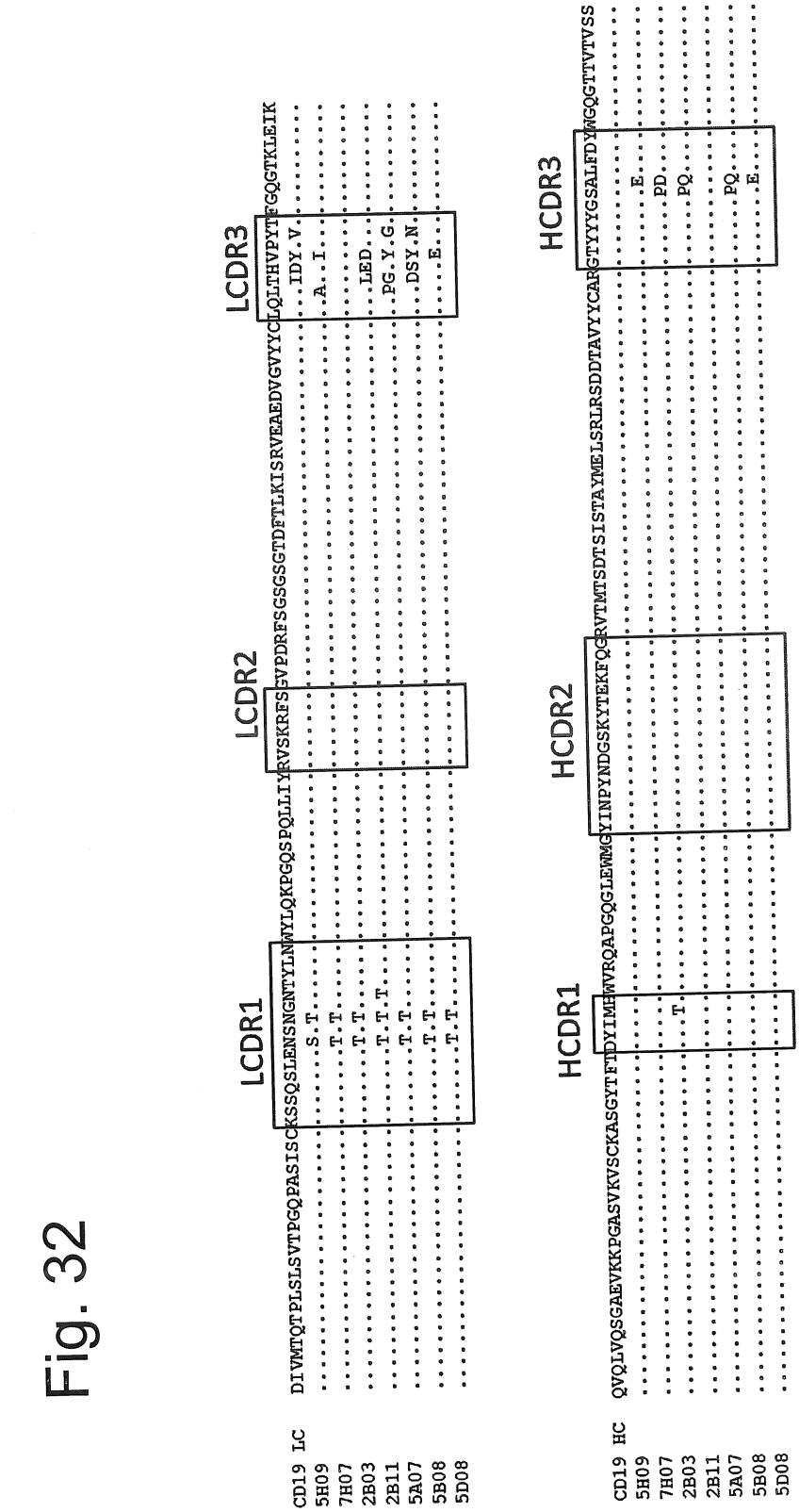
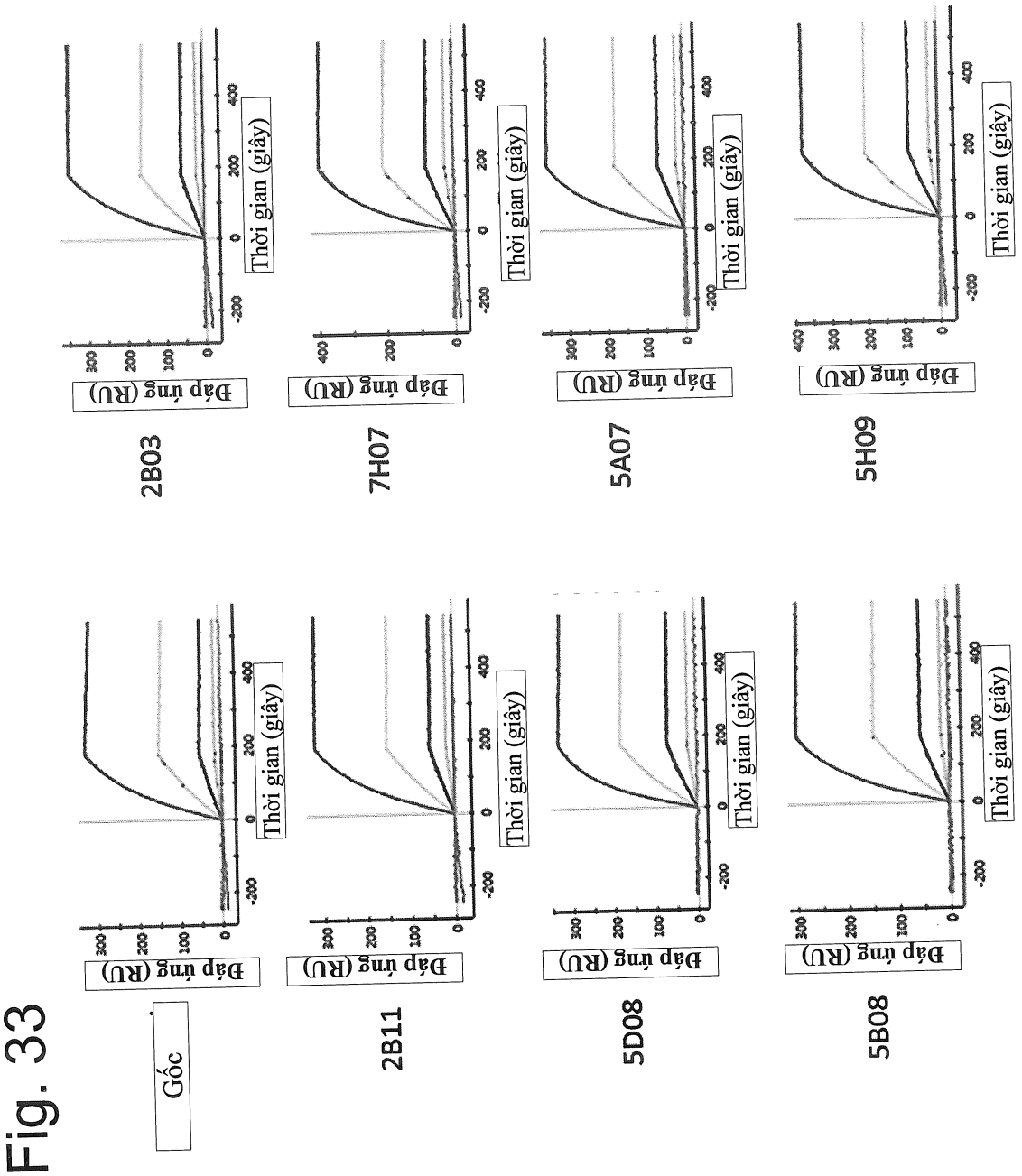

LCDR1
LCDR2
LCDR3
HCDR1
HCDR2
HCDR3
CD19 LC DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIK
5H09 .....S.T.....
7H07 .....T.T.....
2B03 .....T.T.....
2B11 .....T.T.T...
5A07 .....T.T.....
5B08 .....T.T.....
5D08 .....T.T.....
CD19 HC QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS
5H09 .....E.....
7H07 .....PD.....
2B03 .....PQ.....
2B11 .....PQ.....
5A07 .....PQ.....
5B08 .....E.....
5D08 .....

Fig. 33


Gốc
2B11
5D08
5B08
2B03
7H07
5A07
5H09
Đáp ứng (RU)
Thời gian (giây)

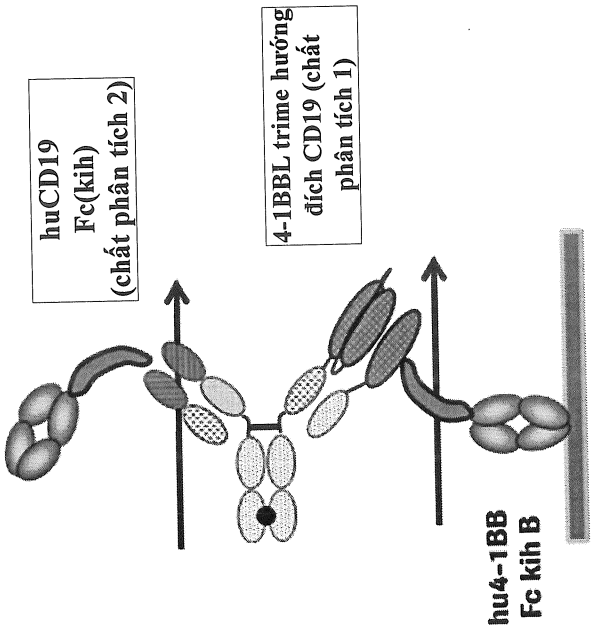

huCD19
Fc(kih)
(chất phân tích 2)
4-1BBL trime hướng
đích CD19 (chất
phân tích 1)
hu4-1BB
Fc kih B

Fig. 34

Fig. 35

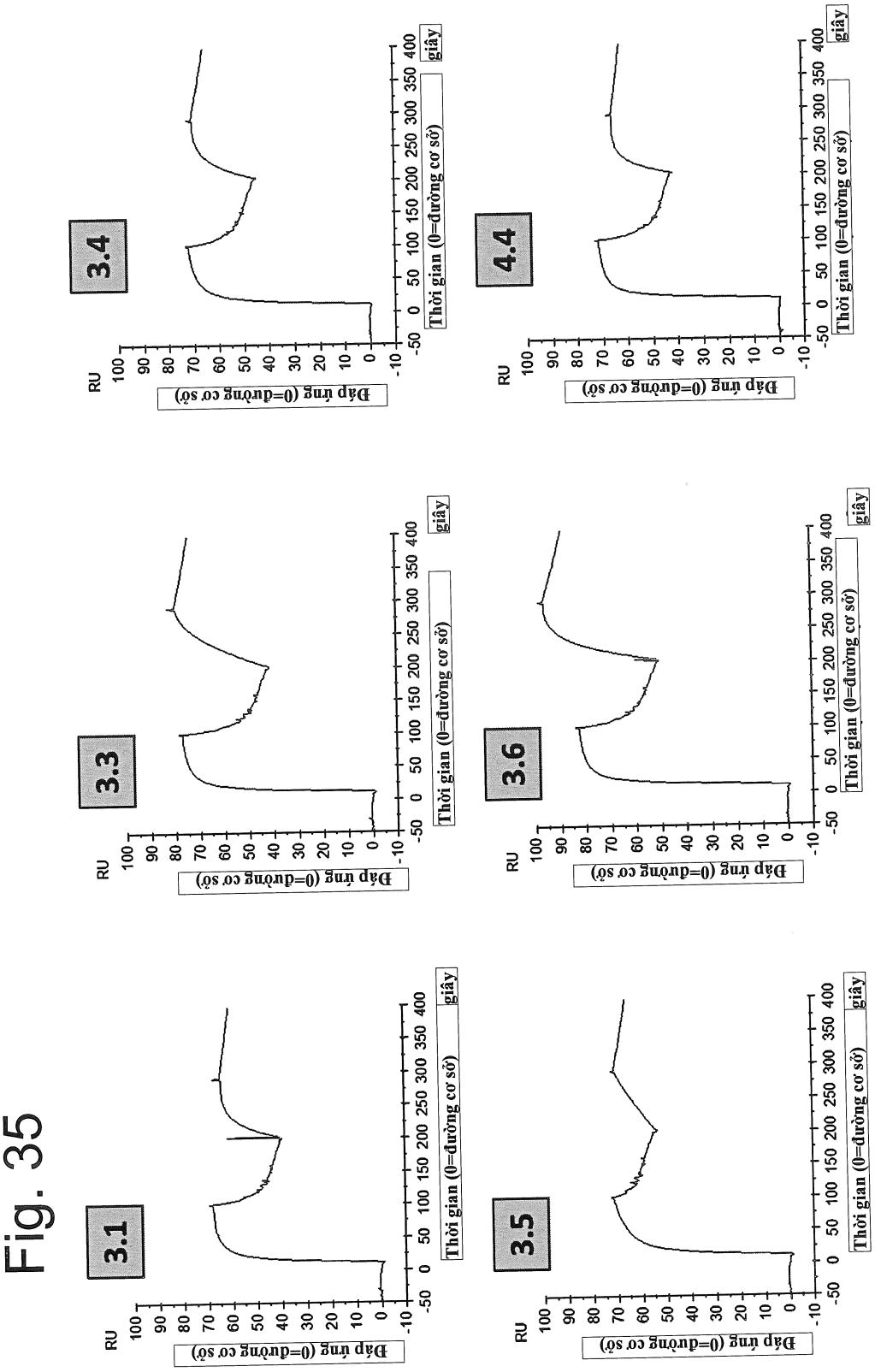

3.1
3.3
3.4
3.5
3.6
4.4
RU
Đáp ứng (0=đường cơ sở)
Thời gian (0=đường cơ sở)
giây

Fig. 36A

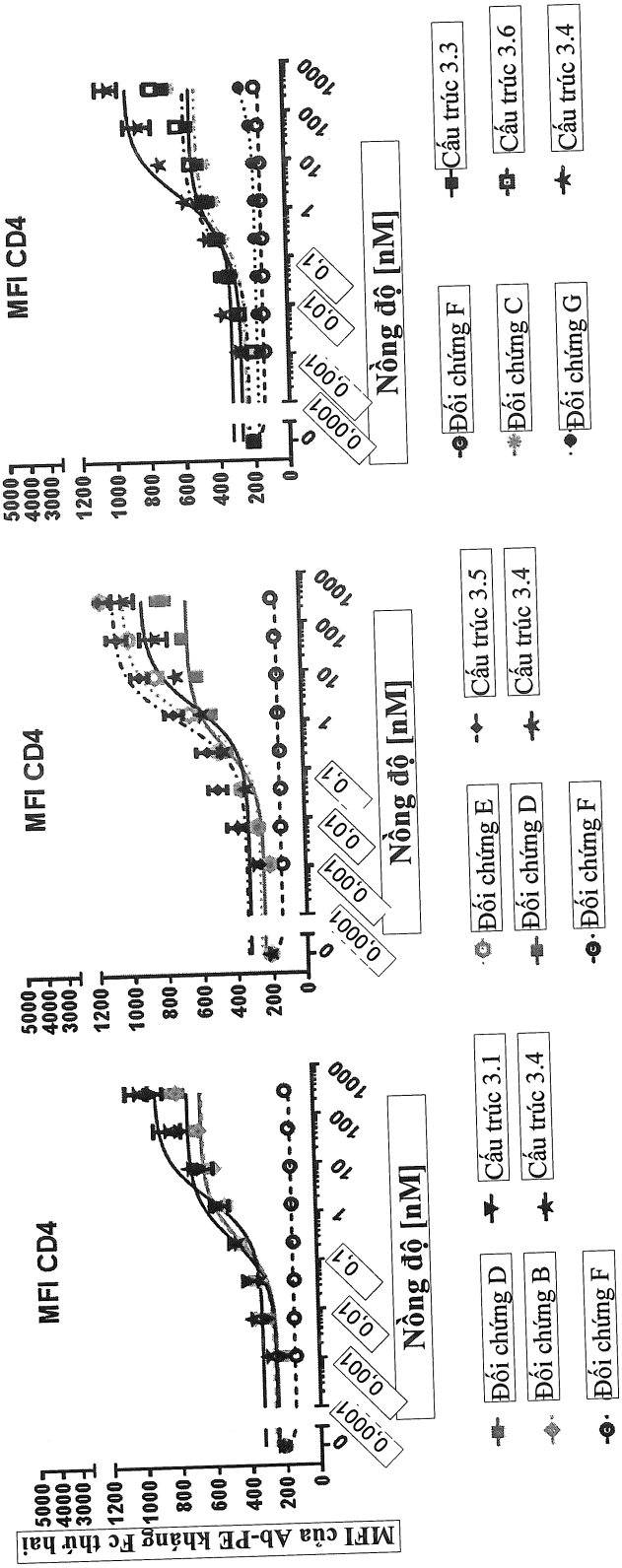

MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
MFI CD4
Nồng độ [nM]
Đối chứng D
Đối chứng B
Đối chứng F
Cấu trúc 3.1
Cấu trúc 3.4
MFI CD4
Nồng độ [nM]
Đối chứng E
Đối chứng D
Đối chứng F
Cấu trúc 3.5
Cấu trúc 3.4
MFI CD4
Nồng độ [nM]
Đối chứng F
Đối chứng C
Đối chứng G
Cấu trúc 3.3
Cấu trúc 3.6
Cấu trúc 3.4

Fig. 36B

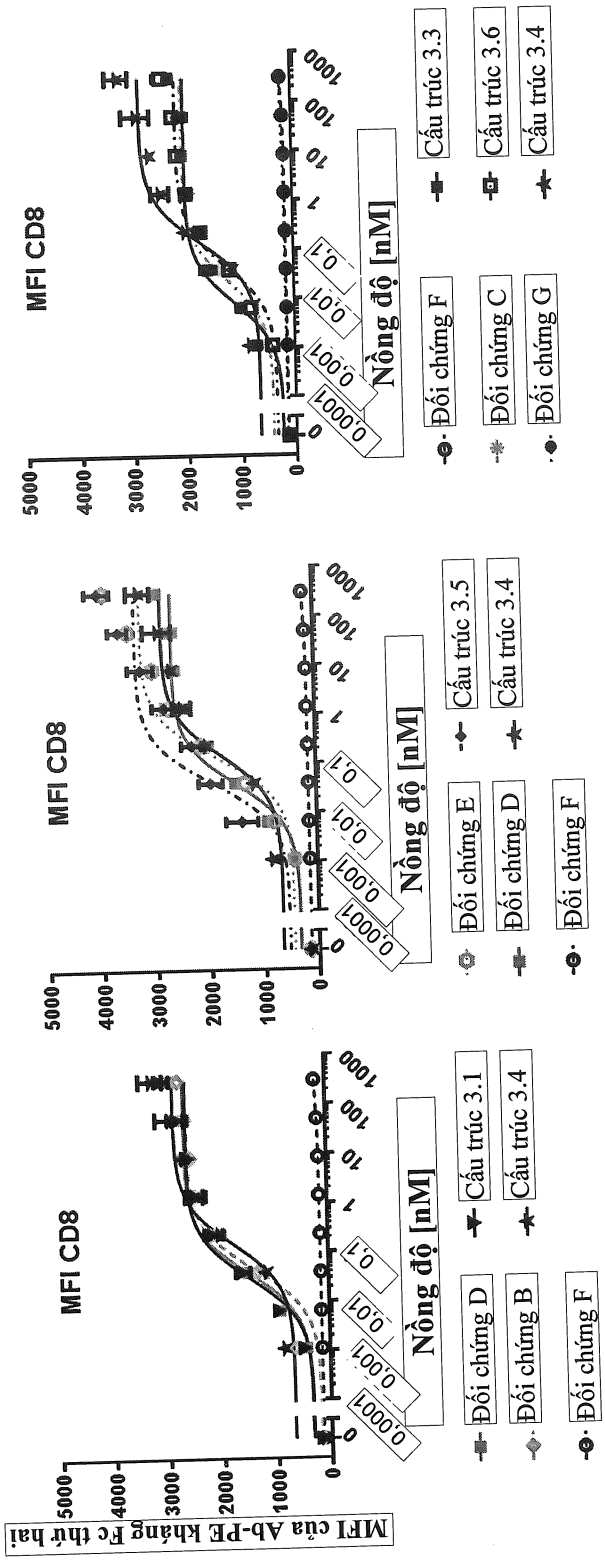

MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
MFI CD8
Nồng độ [nM]
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
0
1000
2000
3000
4000
5000
Đối chứng D
Đối chứng B
Đối chứng F
Cấu trúc 3.1
Cấu trúc 3.4
Đối chứng E
Đối chứng D
Đối chứng F
Cấu trúc 3.5
Cấu trúc 3.4
Đối chứng F
Đối chứng C
Đối chứng G
Cấu trúc 3.3
Cấu trúc 3.6
Cấu trúc 3.4

Fig. 37A

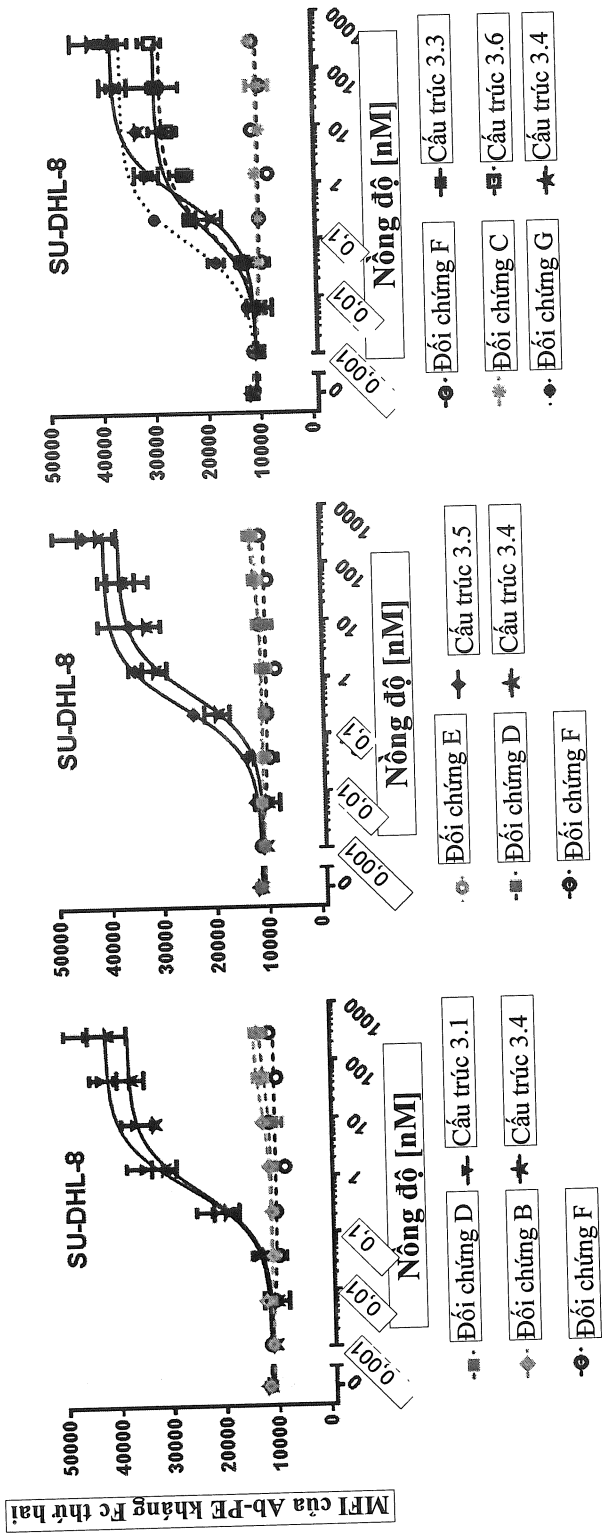

SU-DHL-8
MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
Nồng độ [nM]
Đối chứng D
Cấu trúc 3.1
Đối chứng B
Cấu trúc 3.4
Đối chứng F
Đối chứng E
Cấu trúc 3.5
Đối chứng D
Cấu trúc 3.4
Đối chứng F
Đối chứng F
Cấu trúc 3.3
Đối chứng C
Cấu trúc 3.6
Đối chứng G
Cấu trúc 3.4

Fig. 37B

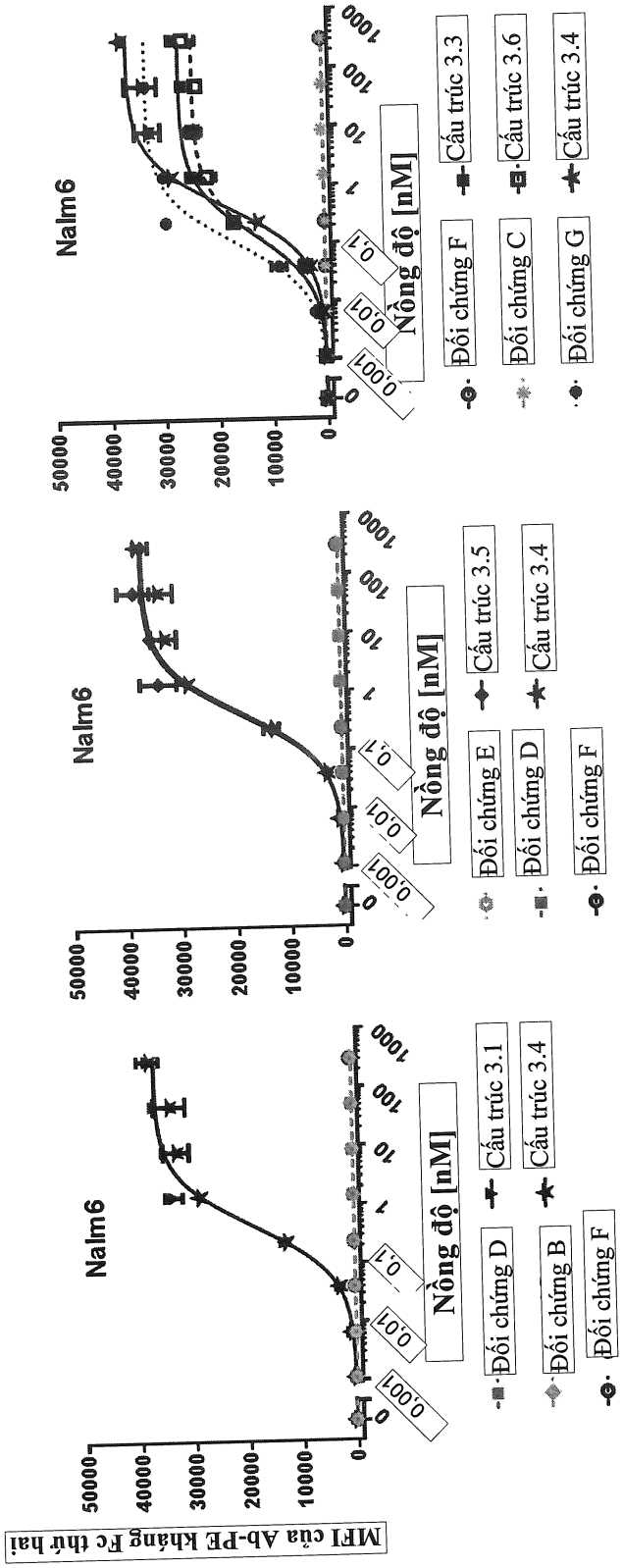

MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
Nalm6
Nồng độ [nM]
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
10000
20000
30000
40000
50000
Đối chứng D
Cấu trúc 3.1
Đối chứng B
Cấu trúc 3.4
Đối chứng F
Nalm6
Nồng độ [nM]
Đối chứng E
Cấu trúc 3.5
Đối chứng D
Cấu trúc 3.4
Đối chứng F
Nalm6
Nồng độ [nM]
Đối chứng F
Cấu trúc 3.3
Đối chứng C
Cấu trúc 3.6
Đối chứng G
Cấu trúc 3.4

Fig. 37C

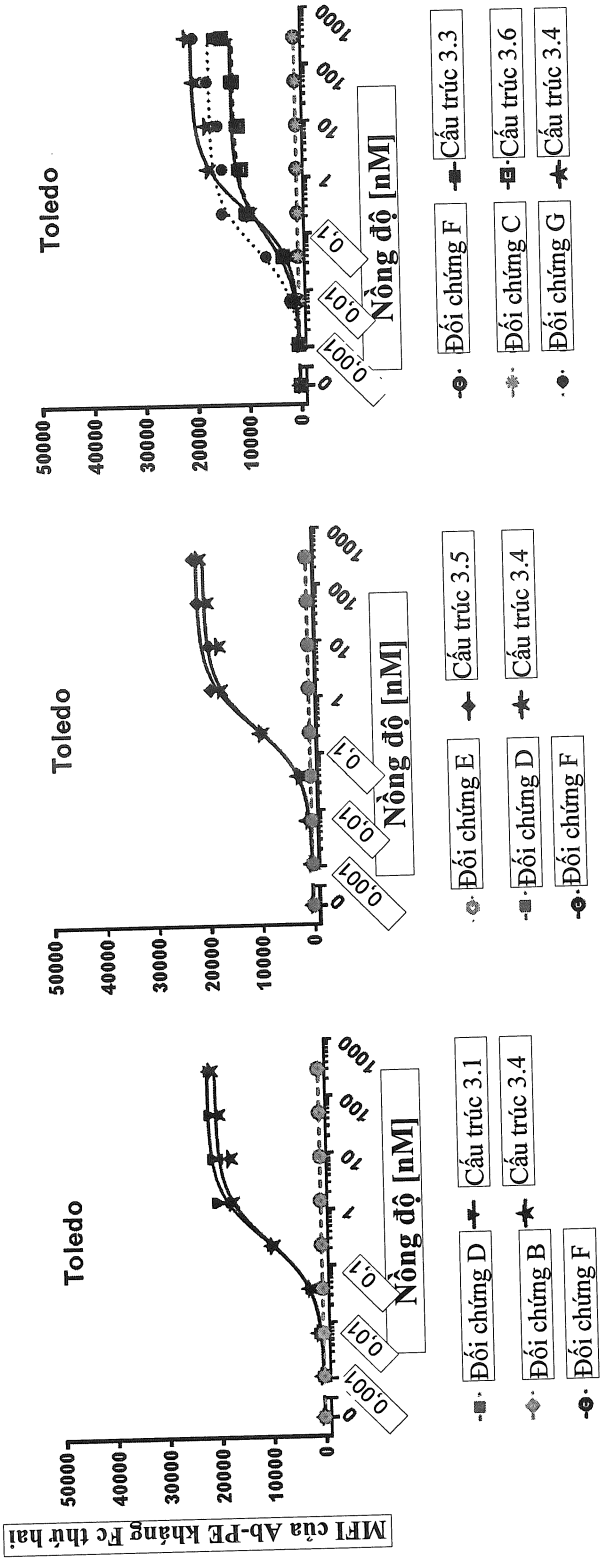

MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
Toledo
Nồng độ [nM]
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
0
10000
20000
30000
40000
50000
Đối chứng D
Cấu trúc 3.1
Đối chứng B
Cấu trúc 3.4
Đối chứng F
Toledo
Nồng độ [nM]
Đối chứng E
Cấu trúc 3.5
Đối chứng D
Cấu trúc 3.4
Đối chứng F
Toledo
Nồng độ [nM]
Đối chứng F
Cấu trúc 3.3
Đối chứng C
Cấu trúc 3.6
Đối chứng G
Cấu trúc 3.4

Fig. 37D

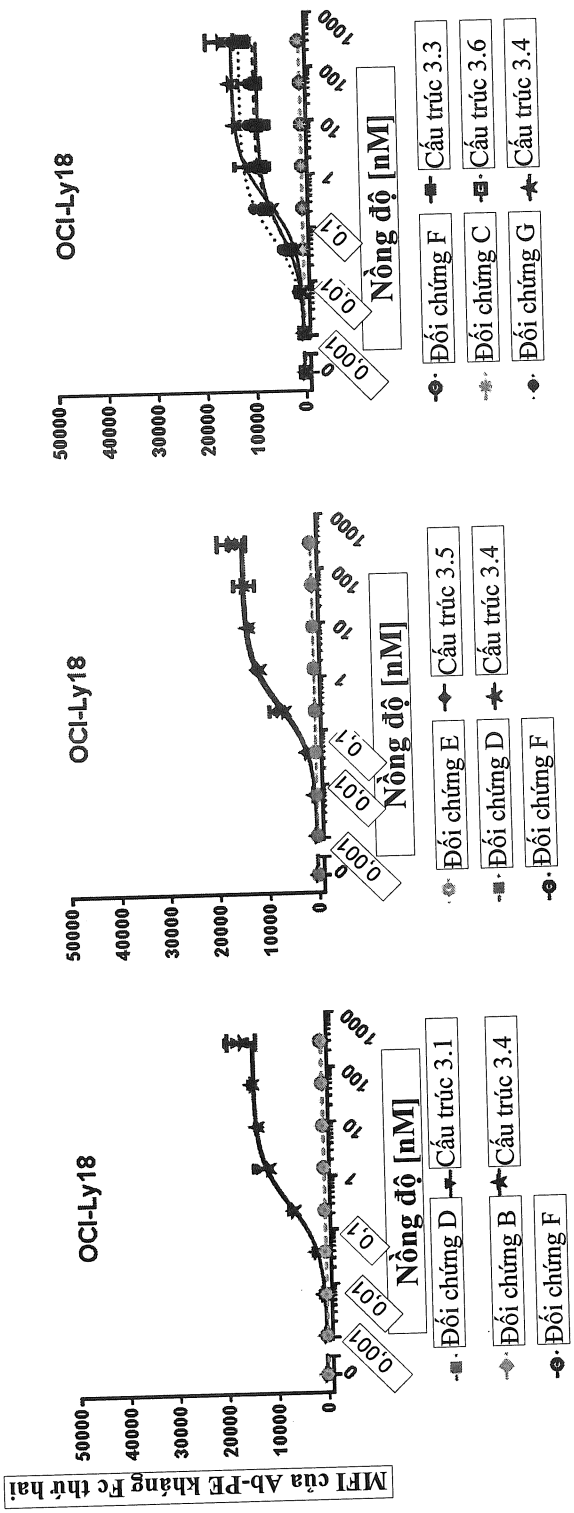
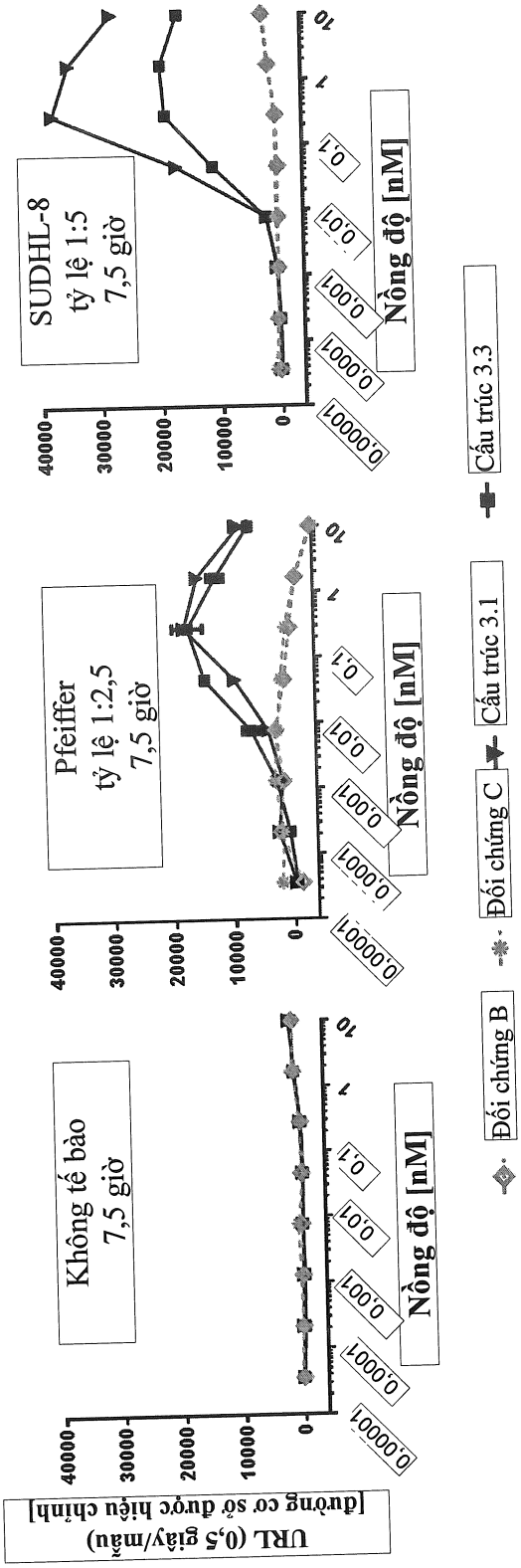

MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
OCI-Ly18
Nồng độ [nM]
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
0
10000
20000
30000
40000
50000
Đối chứng D
Cấu trúc 3.1
Đối chứng B
Cấu trúc 3.4
Đối chứng F
OCI-Ly18
Nồng độ [nM]
Đối chứng E
Cấu trúc 3.5
Đối chứng D
Cấu trúc 3.4
Đối chứng F
OCI-Ly18
Nồng độ [nM]
Đối chứng F
Cấu trúc 3.3
Đối chứng C
Cấu trúc 3.6
Đối chứng G
Cấu trúc 3.4

Fig. 38


URL (0,5 giây/mẫu)
[dương cơ sở được hiệu chỉnh]
Không tế bào
7,5 giờ
Pfeiffer
tỷ lệ 1:2,5
7,5 giờ
SUDHL-8
tỷ lệ 1:5
7,5 giờ
Nồng độ [nM]
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
0
10000
20000
30000
40000
Đối chứng B
Đối chứng C
Cấu trúc 3.1
Cấu trúc 3.3

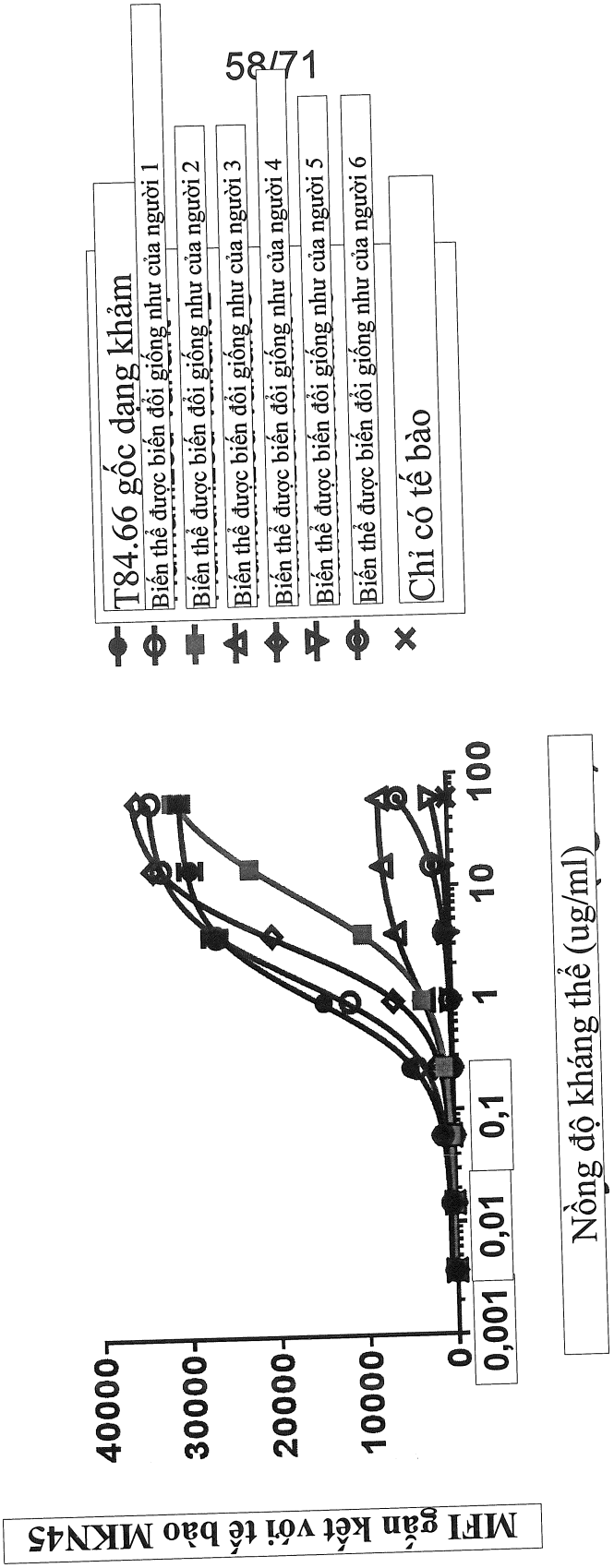

T84.66 gốc dạng khảm
Biến thể được biến đổi giống như của người 1
Biến thể được biến đổi giống như của người 2
Biến thể được biến đổi giống như của người 3
Biến thể được biến đổi giống như của người 4
Biến thể được biến đổi giống như của người 5
Biến thể được biến đổi giống như của người 6
Chỉ có tế bào
MFI gắn kết với tế bào MKN45
40000
30000
20000
10000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (ug/ml)

Fig. 39

Fig. 40

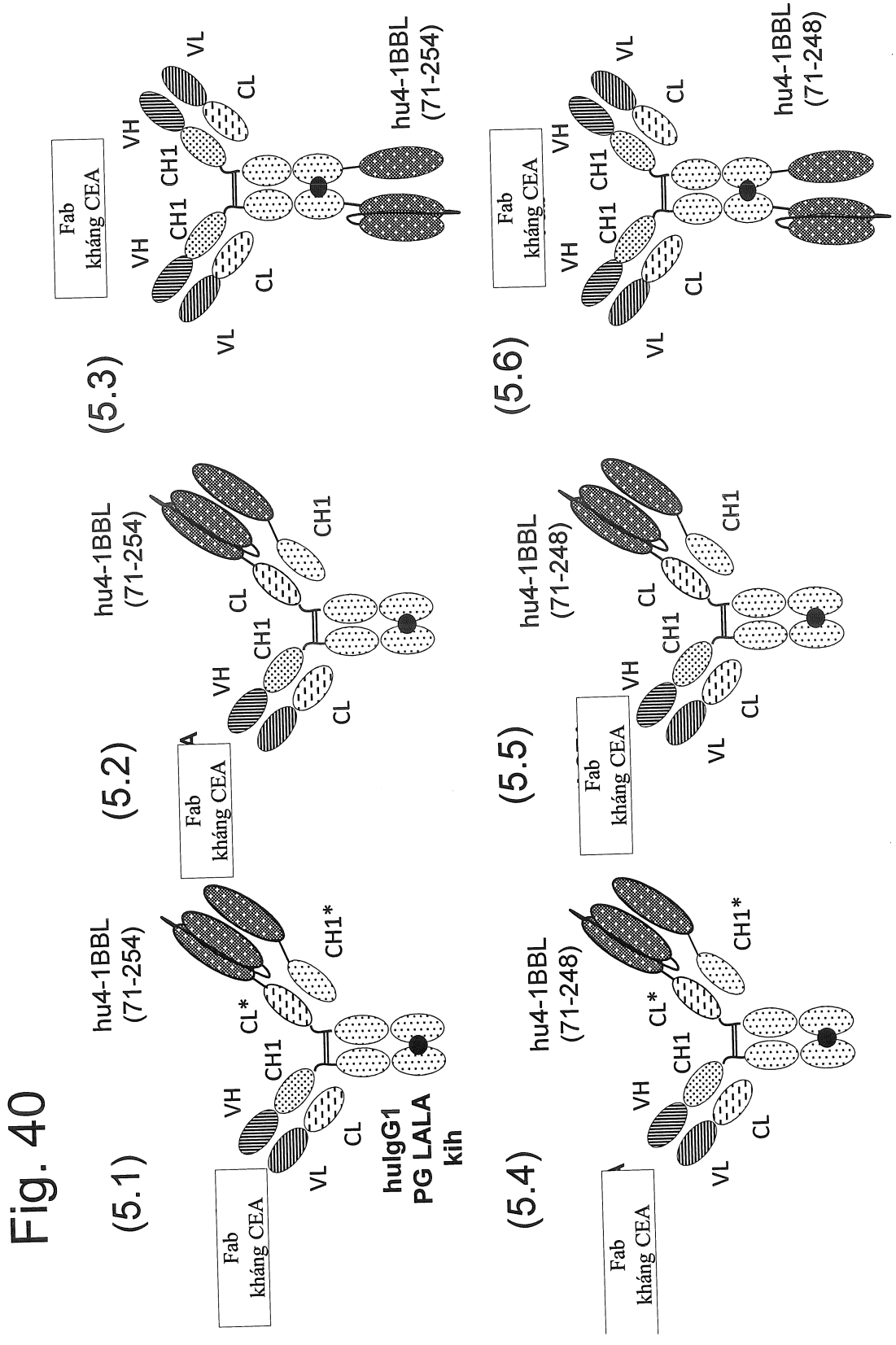
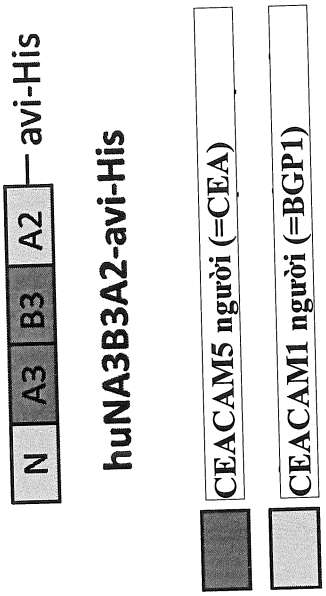

(5.1)
hu4-1BBL (71-254)
Fab kháng CEA
VH
CH1
CL*
CH1*
VL
CL
hulgG1 PG LALA kih
(5.2)
hu4-1BBL (71-254)
Fab kháng CEA
(5.3)
Fab kháng CEA
hu4-1BBL (71-254)
(5.4)
hu4-1BBL (71-248)
Fab kháng CEA
(5.5)
hu4-1BBL (71-248)
Fab kháng CEA
(5.6)
Fab kháng CEA
hu4-1BBL (71-248)

Fig. 41

(41A)



(41B)

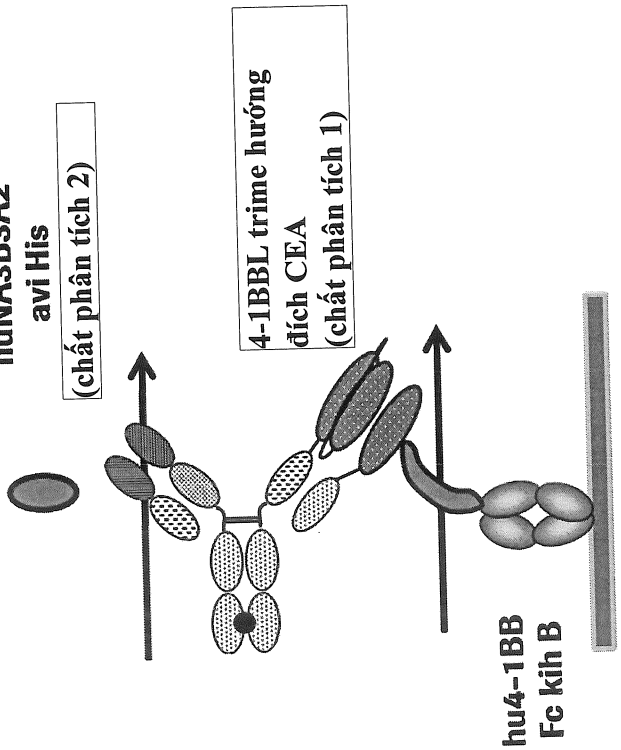


Fig. 42

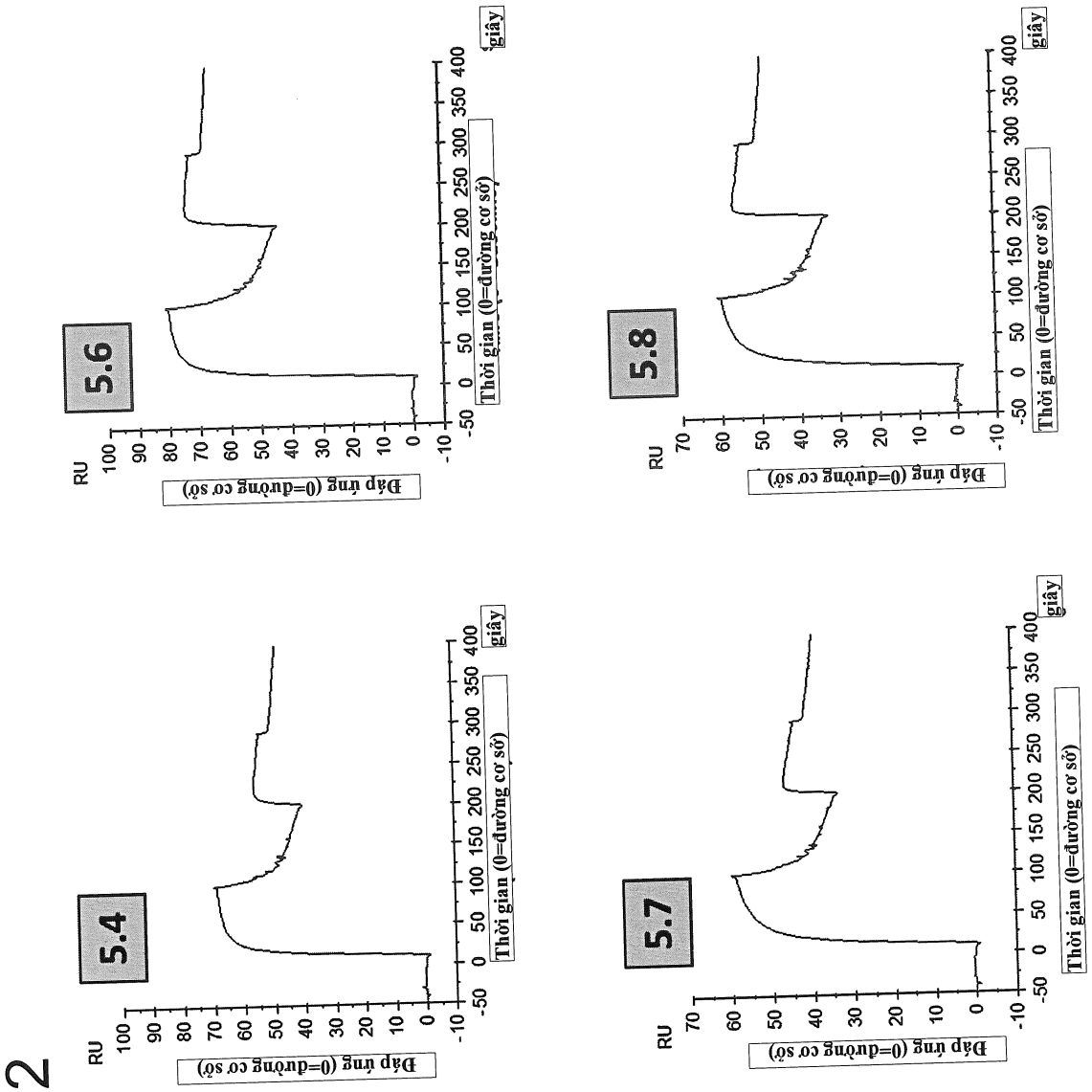


Fig. 43

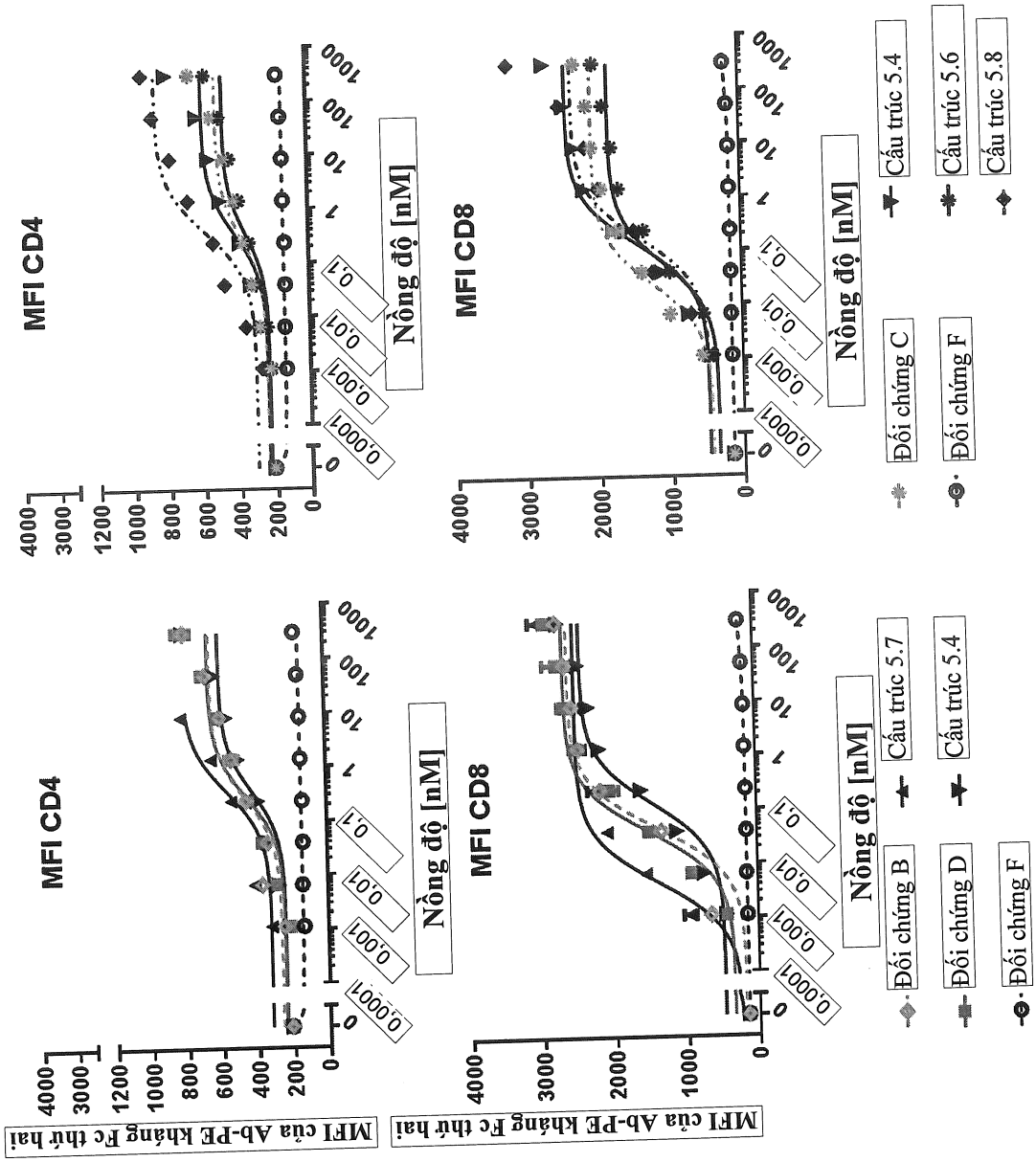

MFI CD4
MFI CD8
MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
Nồng độ [nM]
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
200
400
600
800
1000
1200
1000
2000
3000
4000
Đối chứng B
Đối chứng C
Đối chứng D
Đối chứng F
Cấu trúc 5.4
Cấu trúc 5.5
Cấu trúc 5.6
Cấu trúc 5.7
Cấu trúc 5.8

Fig. 44

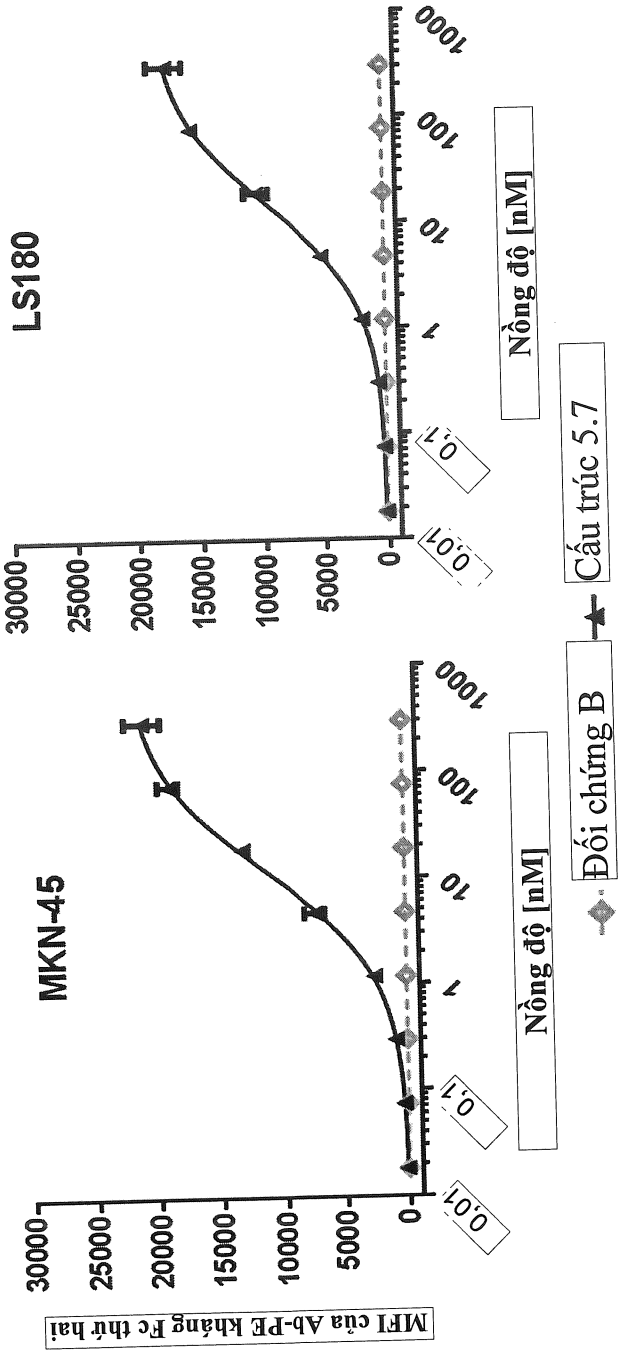

MFI của Ab-PE kháng Fc thứ hai
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
MKN-45
LS180
0.01
0.1
1
10
100
1000
Nồng độ [nM]
Đối chứng B
Cấu trúc 5.7

Fig. 45

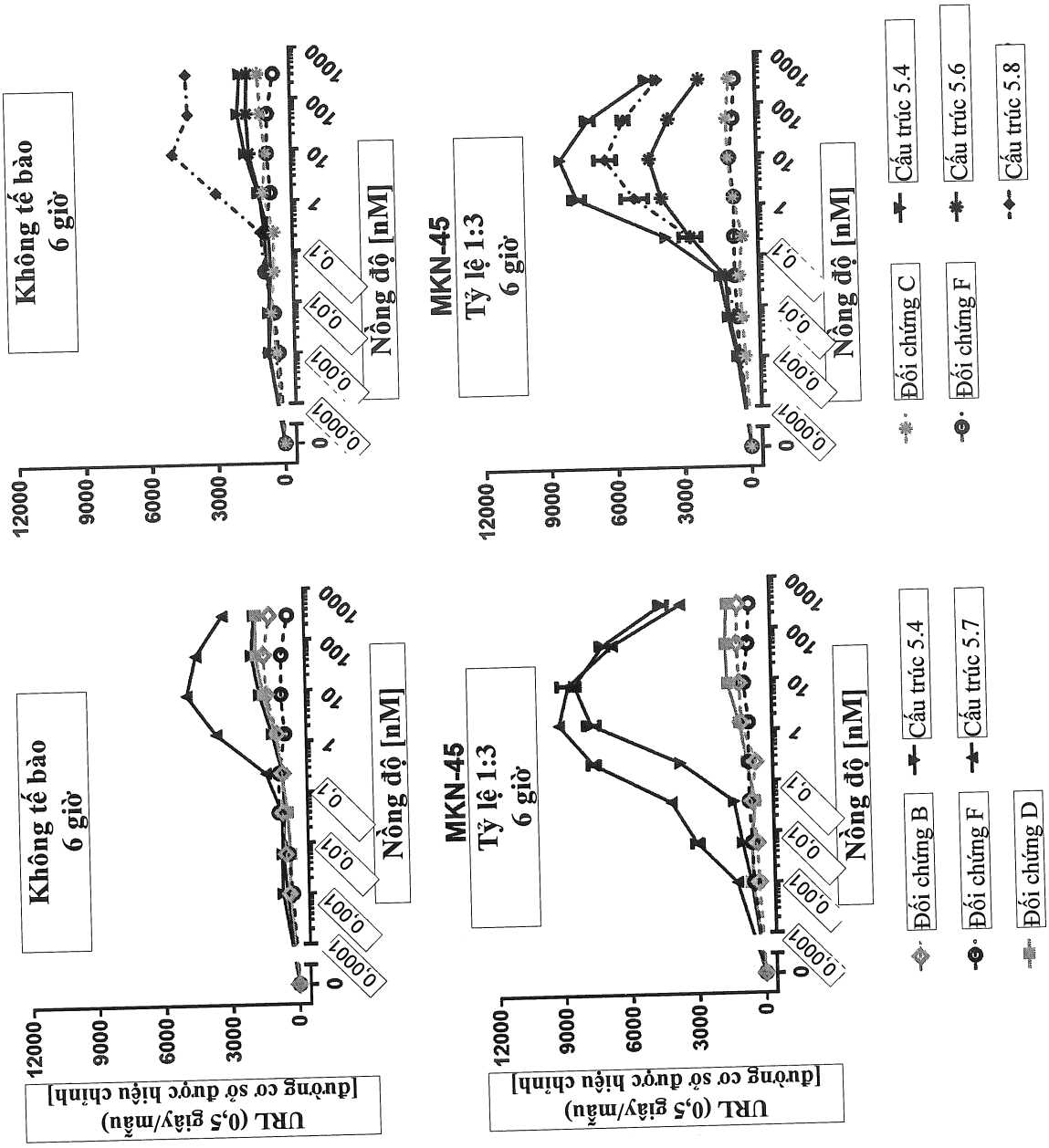

Không tế bào
6 giờ
MKN-45
Tỷ lệ 1:3
6 giờ
URL (0,5 giây/mẫu)
[đường cơ sở được hiệu chỉnh]
Nồng độ [nM]
0
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
1000
3000
6000
9000
12000
Đối chứng B
Đối chứng C
Đối chứng D
Đối chứng F
Cấu trúc 5.4
Cấu trúc 5.6
Cấu trúc 5.7
Cấu trúc 5.8

Fig. 46

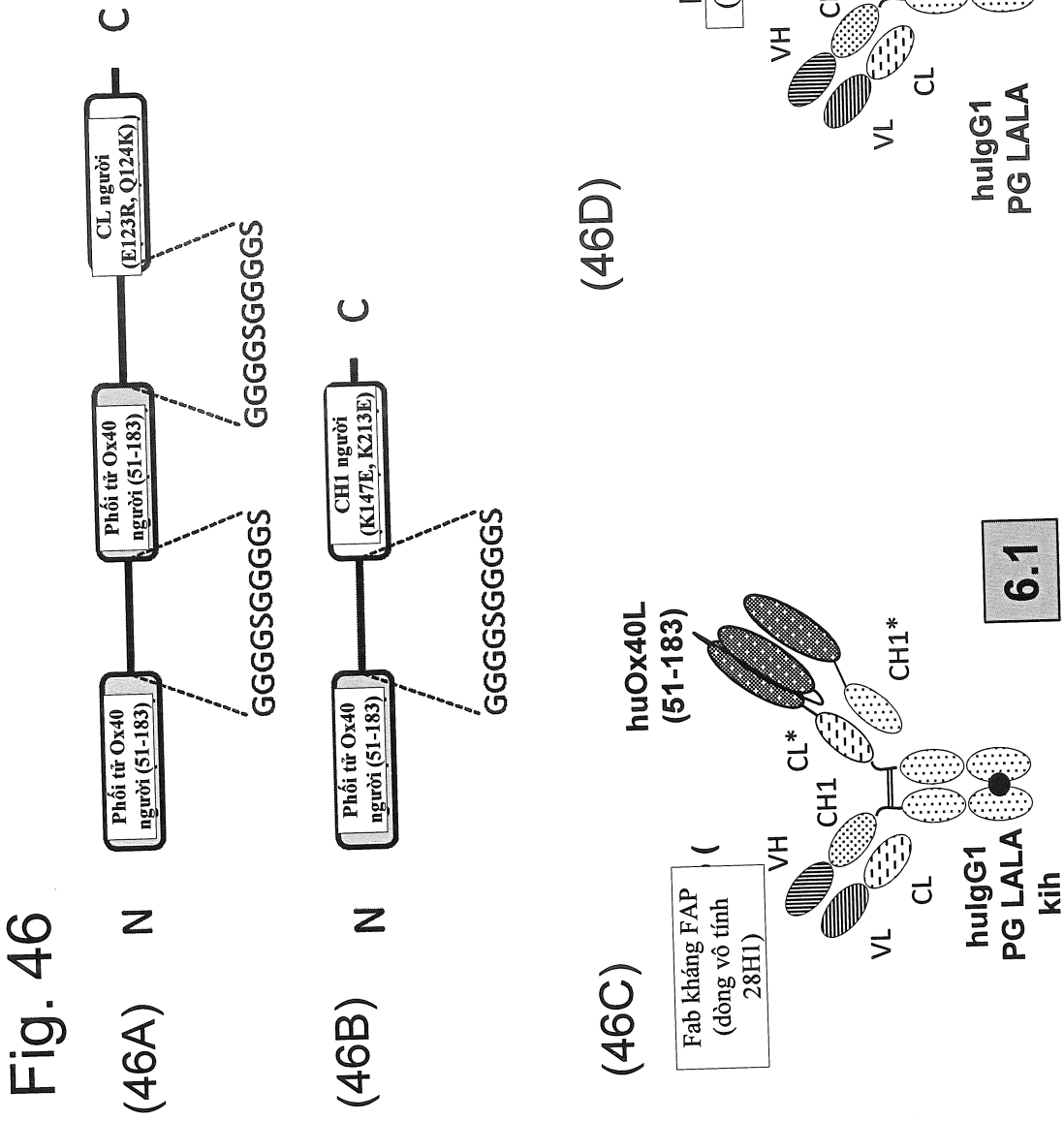

(46A)
N
Phối tử Ox40 người (51-183)
GGGGSGGGGS
Phối tử Ox40 người (51-183)
GGGGSGGGGS
CL người (E123R, Q124K)
C
(46B)
N
Phối tử Ox40 người (51-183)
GGGGSGGGGS
CH1 người (K147E, K213E)
C
(46C)
Fab kháng FAP (dòng vô tính 28H1)
VH
VL
CL
CH1
CL*
huOx40L (51-183)
CH1*
huIgG1 PG LALA kih
6.1
(46D)
DP47 (dòng mầm)
VH
VL
CL
CH1
huIgG1 PG LALA

Fig. 47A

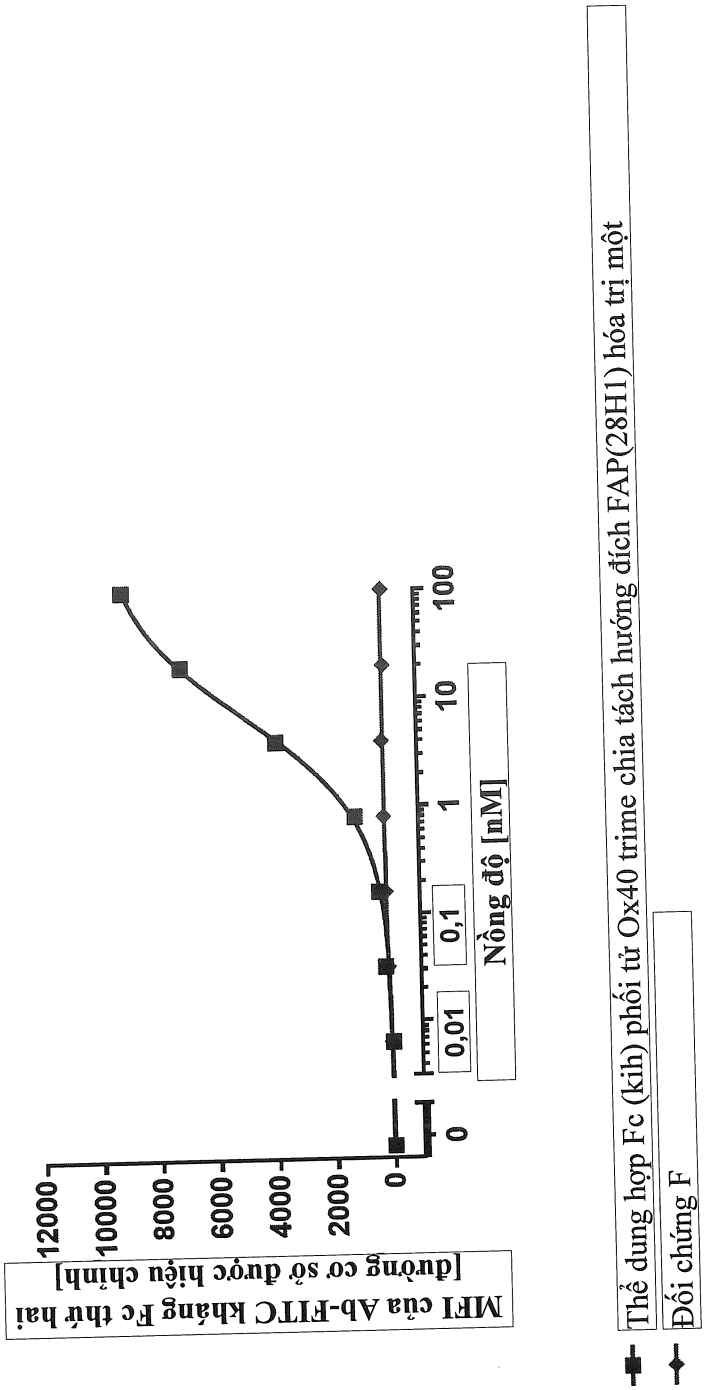

WM-266-4
MFI của Ab-FITC kháng Fc thứ hai
[đường cơ sở được hiệu chỉnh]
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ [nM]
Thể dung hợp Fc (kih) phối tử Ox40 trime chia tách hướng đích FAP(28H1) hóa trị một
Đối chứng F

Fig. 47B

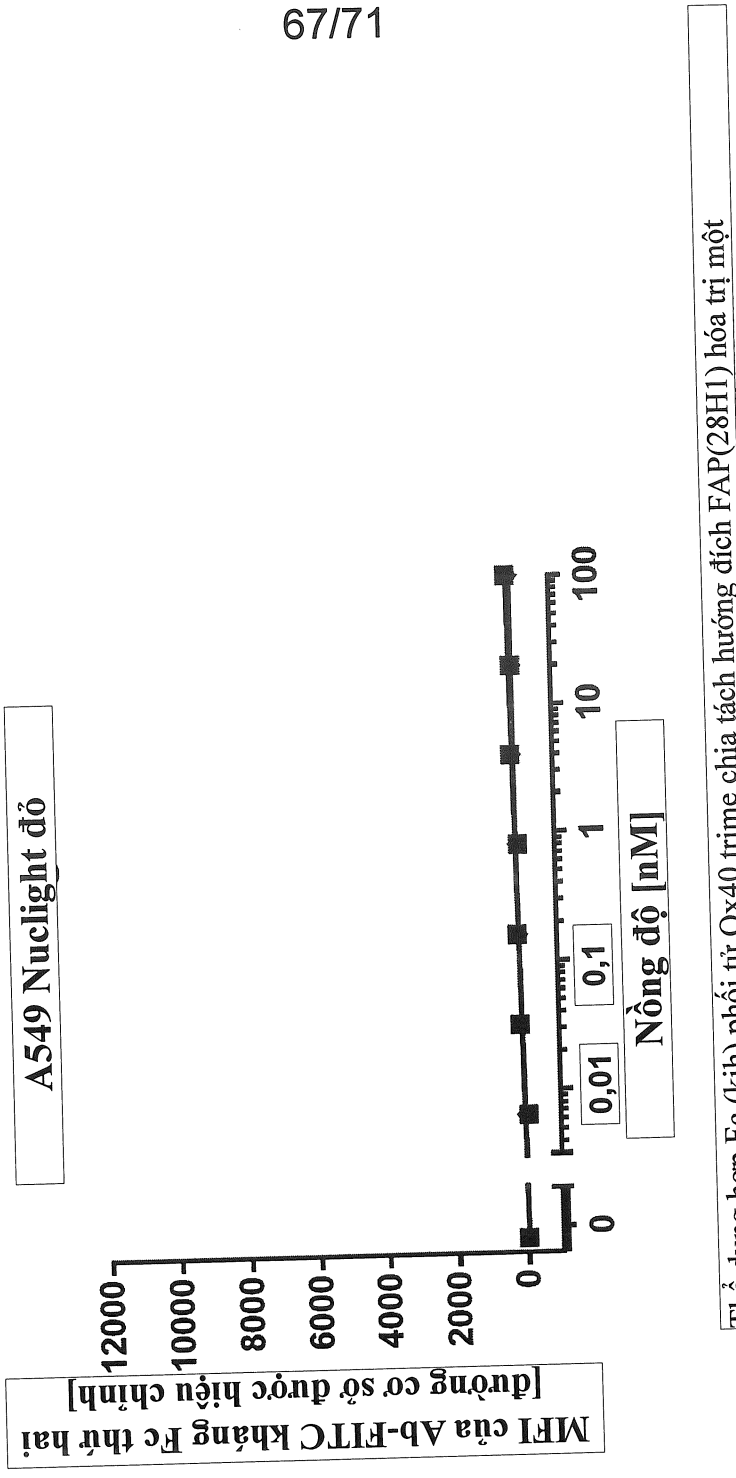

A549 Nuclight đỏ
MFI của Ab-FITC kháng Fc thứ hai
[dương cơ sở được hiệu chỉnh]
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ [nM]
Thể dung hợp Fc (kih) phối tử Ox40 trime chia tách hướng đích FAP(28H1) hóa trị một
Đối chứng F

Fig. 48

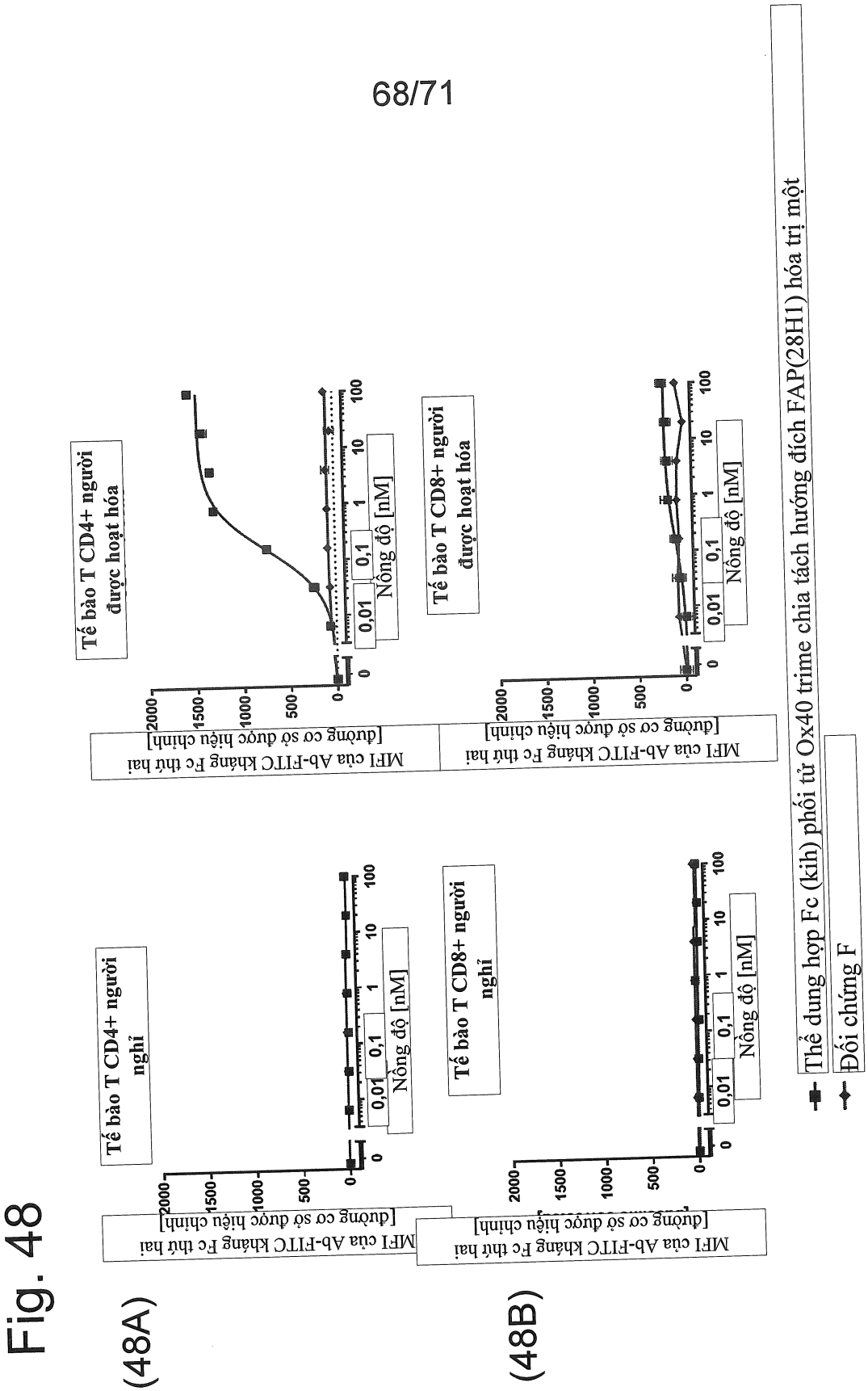

(48A)
Tế bào T CD4+ người nghỉ
Tế bào T CD4+ người được hoạt hóa
(48B)
Tế bào T CD8+ người nghỉ
Tế bào T CD8+ người được hoạt hóa
MFI của Ab-FITC kháng Fc thứ hai
[dương cơ sở được hiệu chỉnh]
2000
1500
1000
500
0
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ [nM]
Thể dung hợp Fc (kih) phối tử Ox40 trime chia tách hướng đích FAP(28H1) hóa trị một
Đối chứng F

Fig. 49

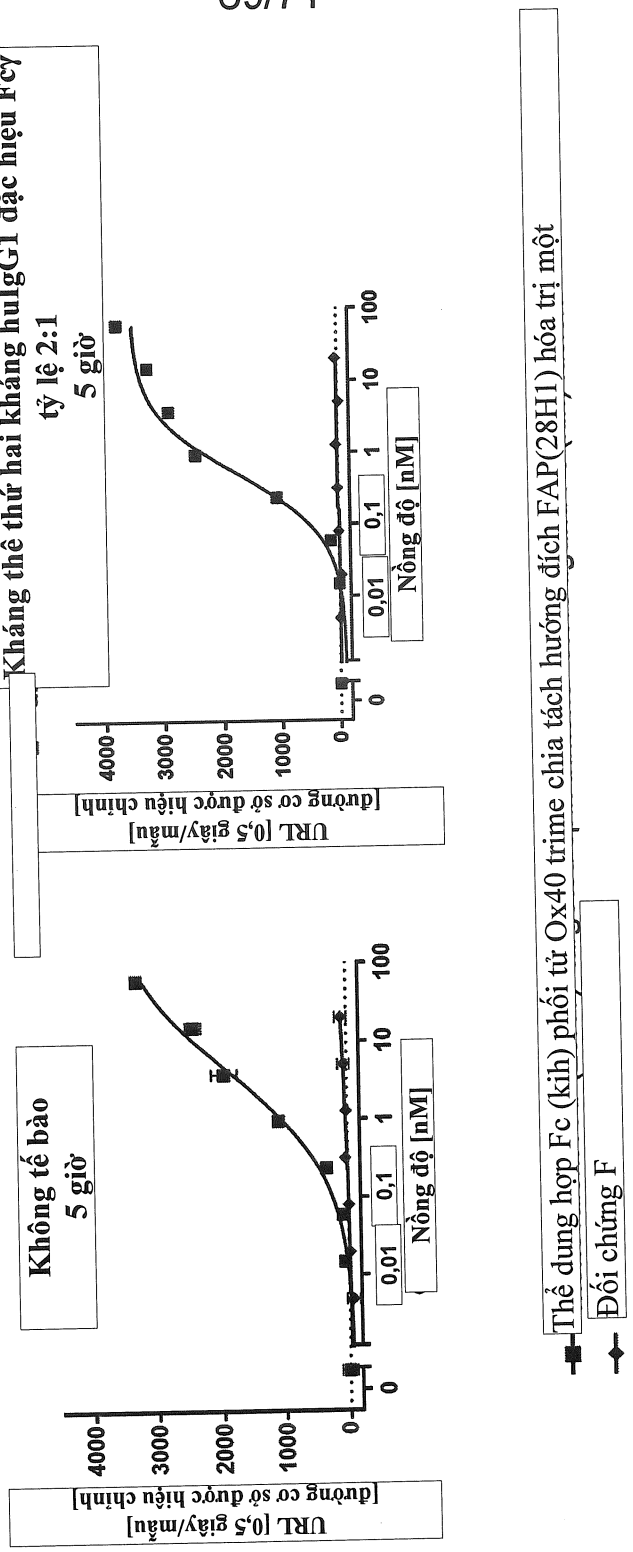
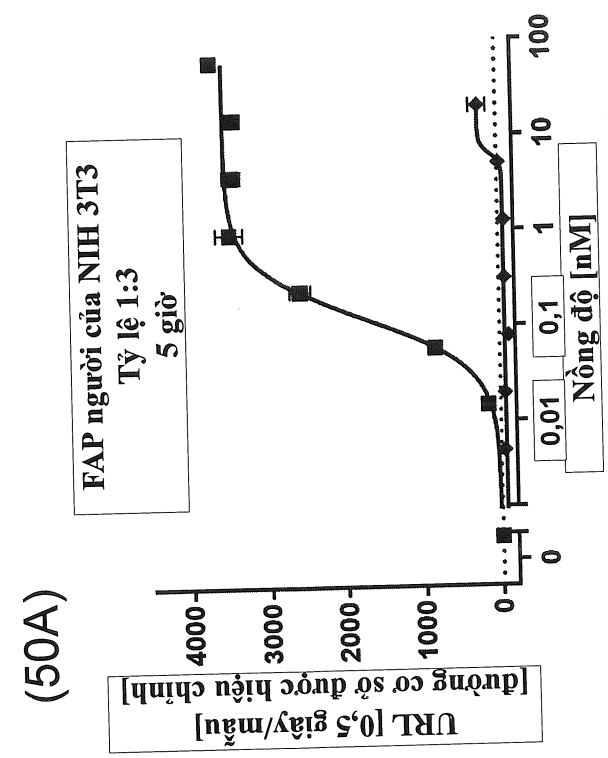

Không tế bào
5 giờ
URL [0,5 giây/mẫu]
[dương cơ sở được hiệu chỉnh]
4000
3000
2000
1000
0
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ [nM]
Kháng thể thứ hai kháng huIgG1 đặc hiệu Fcγ
tỷ lệ 2:1
5 giờ
Thể dung hợp Fc (kih) phối tử Ox40 trime chia tách hướng đích FAP(28H1) hóa trị một
Đối chứng F

Fig. 50


(50A)
URL [0,5 giây/mẫu]
[dường cơ sở được hiệu chỉnh]
4000
3000
2000
1000
0
0
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ [nM]
FAP người của NIH 3T3
Tỷ lệ 1:3
5 giờ

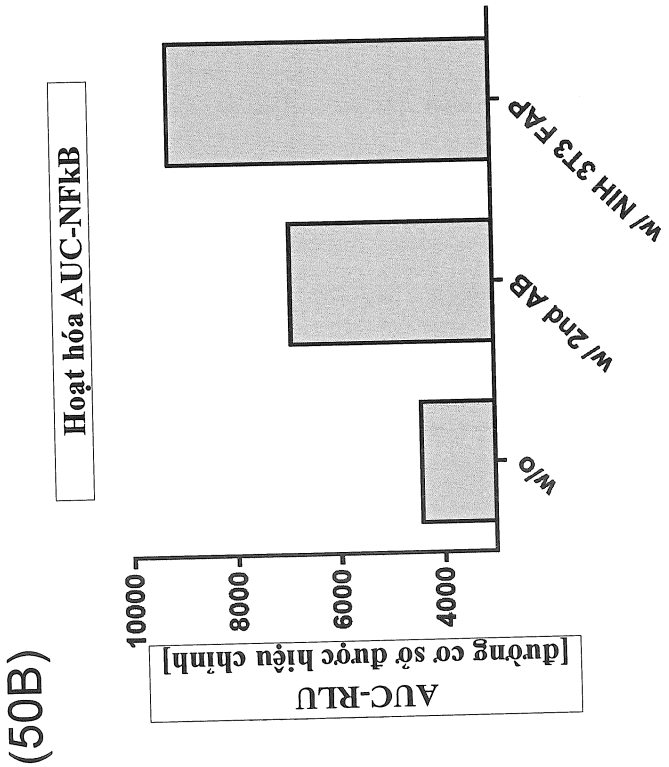
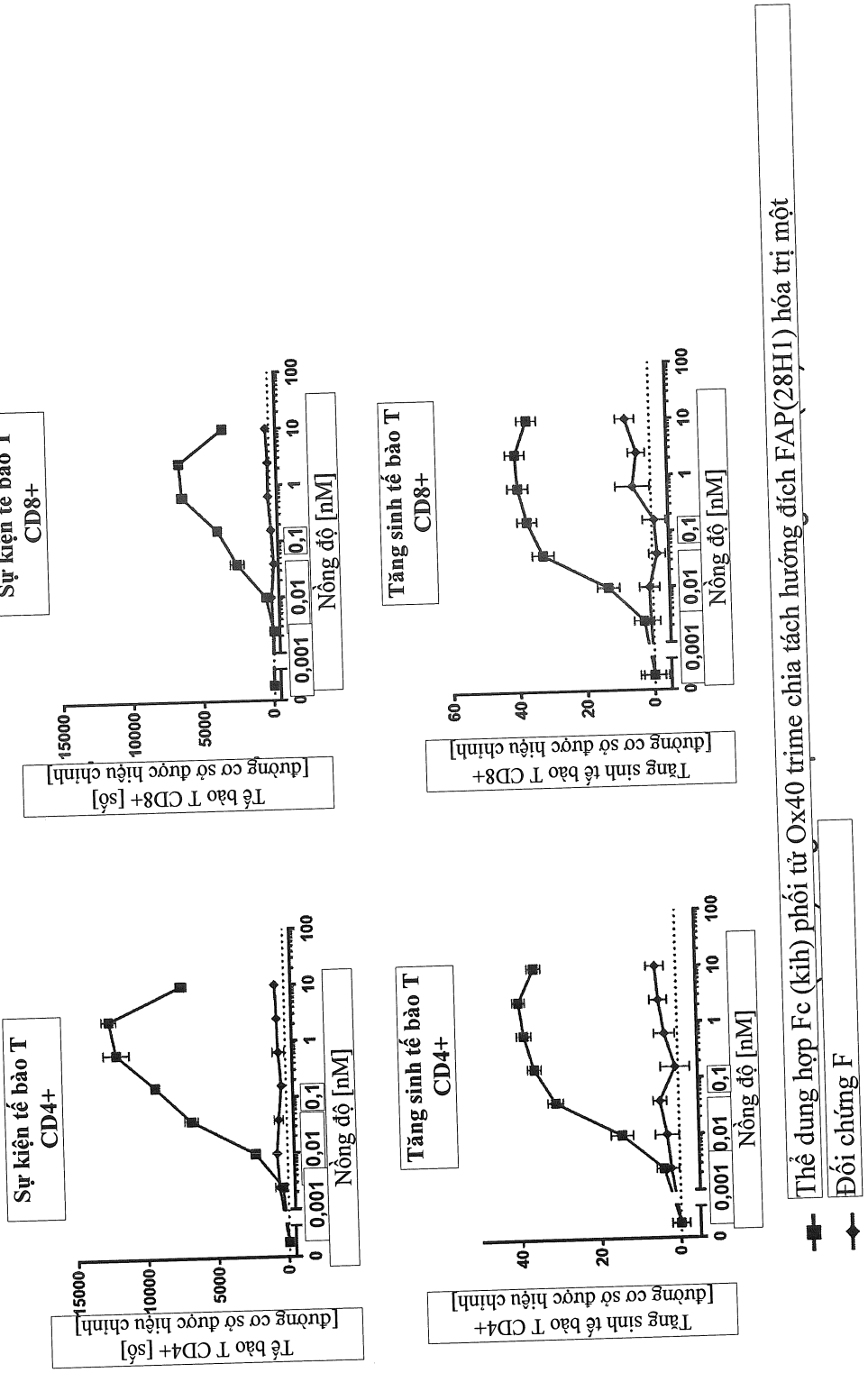

(50B)
AUC-RLU
[dường cơ sở được hiệu chỉnh]
10000
8000
6000
4000
w/o
w/ 2nd AB
w/ NIH 3T3 FAP
Hoạt hóa AUC-NFkB

Fig. 51


Sự kiện tế bào T CD4+
Tế bào T CD4+ [số] [đường cơ sở được hiệu chỉnh]
Nồng độ [nM]
Tăng sinh tế bào T CD4+
Tăng sinh tế bào T CD4+ [đường cơ sở được hiệu chỉnh]
Nồng độ [nM]
Sự kiện tế bào T CD8+
Tế bào T CD8+ [số] [đường cơ sở được hiệu chỉnh]
Nồng độ [nM]
Tăng sinh tế bào T CD8+
Tăng sinh tế bào T CD8+ [đường cơ sở được hiệu chỉnh]
Nồng độ [nM]
Thể dung hợp Fc (kih) phối tử Ox40 trime chia tách hướng đích FAP(28H1) hóa trị một
Đối chứng F